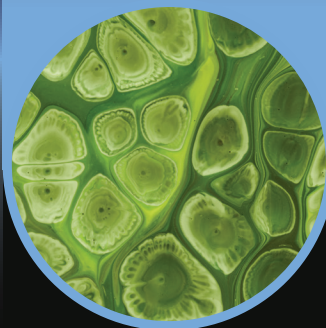
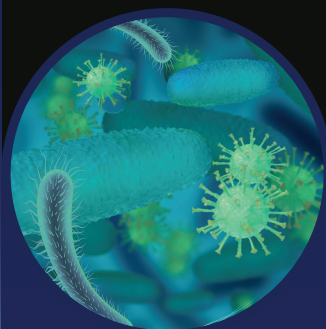
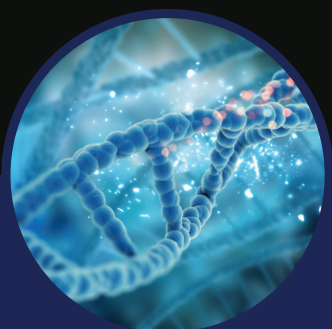


MOLEKULARNE TEHNOLOGIJE

Koncepti u genetici, mikrobiologiji, modeliranju
lijekova i sintetskoj biologiji biljaka

Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ, Aner MEŠIĆ, Amar OSMANOVIĆ, Asmir ALDŽIĆ



UNIVERZITET U SARAJEVU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET

Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ

Aner MEŠIĆ

Amar OSMANOVIĆ

Asmir ALDŽIĆ

MOLEKULARNE TEHNOLOGIJE

**Koncepti u genetici, mikrobiologiji, modeliranju
lijeakova i sintetskoj biologiji biljaka**

Sarajevo, 2025.

dr. sc. Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ

dr. sc. Aner MEŠIĆ

dr. sc. Amar OSMANOVIĆ

dr. sc. Asmir ALDŽIĆ

MOLEKULARNE TEHNOLOGIJE

Koncepti u genetici, mikrobiologiji, modeliranju lijekova i sintetskoj biologiji biljaka

Izdavač:

Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

Recenzenti:

dr. sc. Izet EMINOVIĆ, redovni profesor

Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

dr. sc. Samir ĐUG, redovni profesor

Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

dr. sc. Selma ŠPIRTOVIĆ-HALILOVIĆ, redovna profesorica

Univerzitet u Sarajevu – Farmaceutski fakultet

dr. sc. Renata BEŠTA-GAJEVIĆ, vanredna profesorica

Univerzitet u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet

Tehničko uređenje i DTP:

Irma MAHMUTOVIĆ-DIZDAREVIĆ, Aner MEŠIĆ

Lektura:

Boris LALIĆ, mr. komparativne književnosti

Naslovna strana:

Elma NUKIĆ, bachelor likovne umjetnosti-grafički dizajn

ISBN **978-9926-453-86-2**

CIP zapis dostupan u COBISS sistemu Nacionalne i univerzitetske biblioteke BiH pod ID brojem **64886278**

Predgovor



Razvoj molekularnih tehnologija u prethodnih nekoliko decenija doveo je do revolucionarnih pomaka u genetici, mikrobiologiji, molekularnom modeliranju i sintetskoj biologiji. Ove tehnologije produbljuju naše razumijevanje fundamentalnih bioloških procesa i otvaraju nove mogućnosti za primjenu u biomedicini, farmaciji, industriji, poljoprivredi i zaštiti životne sredine. Knjiga „MOLEKULARNE TEHNOLOGIJE Koncepti u genetici, mikrobiologiji, modeliranju lijekova i sintetskoj biologiji biljaka“ je osmišljena kao pregled savremenih metoda i pristupa u navedenim oblastima, a namijenjena je studentima bioloških, biotehničkih i farmaceutskih nauka, kao i svima koji žele da steknu dublji uvid u principe i primjenu molekularnih tehnologija.

U prvom dijelu knjige obrađeni su osnovni pojmovi klasične genetike, te je dat osvrt na moderni molekularni pristup. Drugo poglavlje je posvećeno tehnologiji rekombinantne DNK, koja predstavlja temelj modificiranja genetičkog materijala organizama. Potom su izloženi elementi polimerazne lančane reakcije koja predstavlja fundamentalno i aplikativno najvažniju tehniku amplifikacije nukleinskih kiselina, na što se nastavlja poglavlje o izotermalnim metodama amplifikacije koje su osobito korisne u specifičnim laboratorijskim uvjetima, te kod detekcije i identifikacije određenih mikroorganizama i virusa. Naredno poglavlje bavi se analizom genetske varijacije koja je važna u ispitivanju razlika između pripadnika iste vrste kao što je na primjer proučavanje rezistencije bakterija na antibiotike, u analizi humanih genetskih bolesti, te u forenzičkoj diferencijaciji između individua. Slijedi poglavlje o hibridizacijskim tehnikama, koje tretira osnovne pojmove in situ i tekućinske hibridizacije, te metode blottinga. Sljedeće poglavlje daje uvid u principe molekularnog modeliranja, računarski potpomognutog dizajna lijekova, eksperimentalnog određivanja 3D strukture makromolekula, te izazove u studijama molekularnog dockinga. Posljednje poglavlje odnosi se na najvažnije principe sintetske biologije biljaka, te moderna shvatanja biljnih resursa kroz aplikativne mogućnosti u smislu fitogene sinteze biljnih prirodnih produkata i nanočestica. Knjiga je strukturirana tako da čitaocima pruži jasan teorijski okvir, ali i praktične aspekte neophodne za razumijevanje i primjenu opisanih tehnologija.

Verujemo da će ova knjiga biti dragocjen resurs za studente, istraživače i stručnjake koji žele da steknu ili prošire svoje znanje u oblasti molekularnih tehnologija.

SADRŽAJ



1

Klasična genetika i moderni molekularni koncept 1

- 1.1 Genetički materijal – dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) 3
- 1.2 Osnovne karakteristike RNK 6
- 1.3 Opći koncepti replikacije DNK i novi trendovi u njenom istraživanju 7
- 1.4 Savremena istraživanja i nove molekularne tehnologije 8
- 1.5 Semikonzervativna replikacija 9
 - 1.5.1 Model replikona 11
- 1.6 Faze replikacije 13
 - 1.6.1 Inicijacija 13
 - 1.6.2 Elongacija 15
- 1.7 Terminacija 20
 - 1.7.1 Terminusne regije (Ter) u prokariotskoj replikaciji 21
 - 1.7.2 Evolucijska prednost terminacije replikacije 25
- 1.8 Prekursori u replikaciji DNK 26
- 1.9 Vrste metaboličkih puteva 27
- 1.10 Redukcija ribonukleotida u deoksiribonukleotide 29
- 1.11 Multienzimski kompleksi 29
- 1.12 Interakcija replikona i membrane 31
- 1.13 Razlike u interakcijama između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija 33
 - 1.13.1 *Escherichia coli* 33
 - 1.13.2 *Bacillus subtilis* 36
- 1.14 Plazmid RK2 36

2

Tehnologija rekombinantne DNK 40

- 2.1 Kloniranje gena pomoću vektora 40
- 2.2 Ekstrakcija i purifikacija nukleinskih kiselina 44
 - 2.2.1 Razaranje ćelija i tkiva 44
 - 2.2.2 Alkalna denaturacija 47
 - 2.2.3 Purifikacija kolonice 47

- 2.3 Detekcija i kvantifikacija nukleinskih kiselina 48
 - 2.3.1 Analitička gel elektroforeza 49
 - 2.3.2 Gel elektroforeza u pulsirajućem polju 53
 - 2.3.3 Preparativna gel elektroforeza 53
- 2.4 Restriksijski enzimi 55
- 2.5 Insercija DNK fragmenata u vektore i njihovo razmnožavanje unutar stanica domaćina 57
- 2.6 Biblioteke su kolekcije kloniranih fragmenata 59
- 2.7 Plazmidni vektori 62
 - 2.7.1 Replikacija plazmida 63
 - 2.7.2 Klonirajuća mjesta 65
 - 2.7.3 Selektivni markeri 67
 - 2.7.4 Insercijska inaktivacija 68
 - 2.7.5 Transformacija 69
- 2.8 Vektori zasnovani na lambda bakteriofagu 71
 - 2.8.1 Biologija lambda faga 71
 - 2.8.2 Lizogenija 74
 - 2.8.3 Litički ciklus 76
 - 2.8.4 In vitro pakovanje 78
 - 2.8.5 Insercijski vektori 79
 - 2.8.6 Zamjenski vektori 80
- 2.9 Kozmidi i supervektori 82

3

Lančana reakcija polimerazom 85

- 3.1 PCR amplificira definirane regione genoma 85
- 3.2 Long-range PCR 89
- 3.3 PCR reverznom transkriptazom 92
- 3.4 Real-time PCR 93
 - 3.4.1 SYBR Green 94
 - 3.4.2 TaqMan 96
 - 3.4.3 Molekularni svjetionici 98

4

Metode izotermalne amplifikacije 102

- 4.1 Amplifikacija zasnovana na nukleinsko kiselinskoj sekvenci 103
 - 4.1.1 RNK NASBA 103
 - 4.1.2 DNK NASBA 105
- 4.2 Izotermalna amplifikacija posredovana petljom 107
- 4.3 Amplifikacija premještanjem lanca 109
- 4.4 Rekombinazna polimerazna amplifikacija 110
- 4.5 Amplifikacija kotrljajućeg prstena 112

5

Analiza genetske varijacije 113

- 5.1 Jednonukleotidni polimorfizmi 116
 - 5.1.1 TaqMan testovi za genotipizaciju SNP-ova 119
- 5.2 Insercijsko/delecijski polimorfizmi 121
 - 5.2.1 Mikročipovi u detekciji insercija i delecija 122
- 5.3 Mikrosateliti i minisateliti 123
 - 5.3.1 Mikrosateliti u analizi humanog pedigreea 127
- 5.4 DNK profiliranje 128
- 5.5 Varijante broja kopija 129
- 5.6 Genomska Southern blot analiza: polimorfizmi dužine restrikcijskih fragmenata 131

6

Tehnike hibridizacije 134

- 6.1 In situ hibridizacija 134
- 6.2 Tekućinska hibridizacija 136
- 6.3 Southern blotting 137
- 6.4 Northern blotting 140
- 6.5 Western blotting 143

7

Molekularni docking 146

- 7.1 Otkriće lijekova 146
 - 7.1.1 Računarski potpomognut dizajn lijekova za otkriće novih lijekova i njihov razvoj 148

- 7.2 Osnove Molekularnog dockinga 151
- 7.3 Eksperimentalno određivanje 3D strukture makromolekula 159

- 7.4 Računarsko modeliranje 3D struktura proteina 161
- 7.5 Biomolekularno prepoznavanje 165
- 7.6 Različiti pristupi molekularnom dockingu 167
- 7.7 Rješavanje fleksibilnosti proteina u metodama dockinga 170
- 7.8 Procjena docking poza i funkcija bodovanja 171
- 7.9 Energija vezivanja 173
- 7.10 Ključne interakcije u vezivanju ligand-protein 178
- 7.11 Primjena dockinga u optimizaciji molekula potencijalnih lijekova 185
- 7.12 Izazovi u studijama molekularnog dockinga 190

8

Osnovni koncepti sintetske biologije biljaka 197

- 8.1 Najvažniji pristupi u sintetskoj biologiji biljaka 198
- 8.2 Sintetska biologija biljnih prirodnih produkata 208
- 8.3 Metabolički putevi biljnih prirodnih produkata i sekvenciranje 211
- 8.4 Sinteza biljnih prirodnih produkata u biljnim stanicama i genetičke modifikacije 212
- 8.5 Genetičko modificiranje plastida 217
- 8.6 Hloroplastna i nuklearna transformacija 217
- 8.7 Fitogena sinteza nanočestica 218
 - 8.7.1 Metode zelene sinteze 219
 - 8.7.2 Primjena fitogenih nanočestica 222

LITERATURA 227

1

Klasična genetika i moderni molekularni koncept

Asmir Aldžić

Savremena nauka o organskom nasljeđivanju nema naročito dugu povijest. Genetika je svoju ekspanziju započela tokom 20. stoljeća. Njen kontinuirani, neprekidni razvoj počeo je sa ponovnim otkrićem zakona o ponavljanju svojstava kroz generacije, zakona do kojih je prvobitno došao Gregor Mendel (1822-1884.), na osnovu svojih eksperimenata sa baštenskim graškom, izvedenih u drugoj polovini 19. stoljeća. Zahvaljujući Mendelu i njegovim posmatranjima ustoličen je koncept (pojam) gena, kao materijalne čestice koja leži u temelju pojava i procesa herediteta.

Koncept gena sačinjava središte genetičkih shvaćanja i istraživanja sve do današnjih dana. Na tom konceptu počiva cjelokupan napredak genetike. Jedinke u uzastopnim generacijama živih bića međusobno su slične po svojim najvažnijim biološkim karakteristikama. Pri tome liče na pretke po svom spoljašnjem izgledu, ali su još veće podudarnosti u pogledu mnogih biohemijskih procesa, putem kojih se odvija promet materije i energije metabolizma. Glavne crte metabolizma jednake su kod svih pripadnika iste vrste, a neki osnovni metabolički procesi imaju isti tok i kod sasvim različitih organizama, kao što su jednake u uzastopnim pokoljenjima. Ponavljanje ključnih, najznačajnijih struktura i funkcija kroz generacije organizama uslovljeno je **nasljednošću**. Pojave i zakonitosti organskog nasljeđivanja (herediteta), u živom svijetu proučava zasebna grana biologije - **genetika**.

Genetika kao nauka o organskom (ili biološkom) nasljeđivanju bavi se i sličnostima i razlikama koje postoje između živih bića i njihovih grupa. To je znanost koja nastoji utvrditi i objasniti pojave i uzroke kako stalnosti, tako i promjenljivosti organizama. Osnovu procesa od kojih zavisi sličnost i različitost organizama čine pojave i događaji na nivou molekularnih zbivanja, stvaranje i raspadanje molekula, njihovo spajanje i razdvajanje. To je oblast koju pokriva **molekularna genetika**, kao dio molekularne biologije. Molekularnobiološki podaci leže u osnovi genetičkih istraživanja koja se bave problemima djelovanja gena, te nasljednošću biohemijskih procesa u organizmima (**biohemijska genetika**) i nasljednim aspektima tokova razvića (**genetika razvića**).

Organizacijom i djelovanjem nadmolekularnih hereditarnih struktura u sastavu osnovnog živog sistema - ćelije (stanice) bavi se **citogenetika**, grana genetike okrenuta istraživanju herediteta na nivou ćelije. Najvažniji objekat citogenetičkih istraživanja su hromosomi, mikroskopski vidljive ćelijske strukture u kojima je smještena glavina gena. Specifični su zadaci i metodi genetike u proučavanju pojava herediteta na nivou cjelovitih organizama, bioloških jedinki (individua). Većina pravila, postupaka i znanja značajnih za ovu oblast spada u domen naučne grane koja se naziva **formalna genetika**. Formalna genetika prati i objašnjava ponavljanje osobina u generacijama živih sistema. Genetičku nauku interesiraju i nasljedne pojave u populacijama, prirodnim grupama jedinki u kojima se realno odvijaju životni procesi, uključivši i reprodukciju. Ovu oblast organskog nasljeđivanja proučava **populacijska genetika**. Iako su osnovne zakonitosti biološkog nasljeđivanja jednake za sva živa bića, postoje mnoge specifičnosti koje odlikuju pojedine organizme i vrste organizama, tako da je uobičajena podjela genetike s obzirom na skupinu živih bića kojom se bavi. Na toj osnovi možemo razlikovati zasebnu nauku o nasljeđivanju bilo koje sistematske grupacije, a vrlo se često spominju, zbog značajnih različitosti u hereditetu, genetika prokariota i genetika eukariota, zatim genetika mikroorganizama, te genetika biljaka, genetika životinja i genetika čovjeka.

Sa stanovišta organizacije i odvijanja procesa nasljeđivanja izuzetno je važna podjela živog svijeta na prokariote i eukariote. U isti mah, razlike u osnovnoj organizacijskoj strukturi dozvoljavaju podjelu prema stupnju složenosti bioloških objekata, a s obzirom na ćelijski (stanični, celularni) model njihove građe; to je podjela na jednoćelijske (jednostanične) i višećelijske (višestanične) organizme. Obje ove klasifikacije imaju veliki značaj za genetiku, te predstavljaju polazište za nastanak i razvoj njenih posebnih grana koje se bave prokariotima i mikroorganizmima. Upravo genetika prokariota i genetika mikroorganizama dale su odlučujući doprinos upoznavanju i razumijevanju mehanizama herediteta uopće.

Molekularna biologija proučava "protok informacija" u ćeliji i organizmu u cjelini. Ovaj protok informacija formulisan je u tzv. "centralnu dogmu molekularne biologije" koja se može shematski prikazati kao:

DNK $\longleftrightarrow$ DNK $\longrightarrow$ RNK $\longrightarrow$ PROTEIN

Molekularna biologija predstavlja pristup izučavanju elementarnih procesa u biologiji što se zasniva na prirodnim naukama, s ciljem da se na nivou molekula pronađu procesi koji bi odgovarali makromanifestacijama klasične biologije. Premda u sastav živih sistema ulazi veliki broj različitih molekula izdvajaju se samo one koje predstavljaju nosioce i prenosiocje informacije o nasljeđivanju i realizatore tih informacija. To su nukleinske kiseline, DNK i RNK kao i proteini.

1.1 Genetički materijal – dezoksiribonukleinska kiselina (DNK)

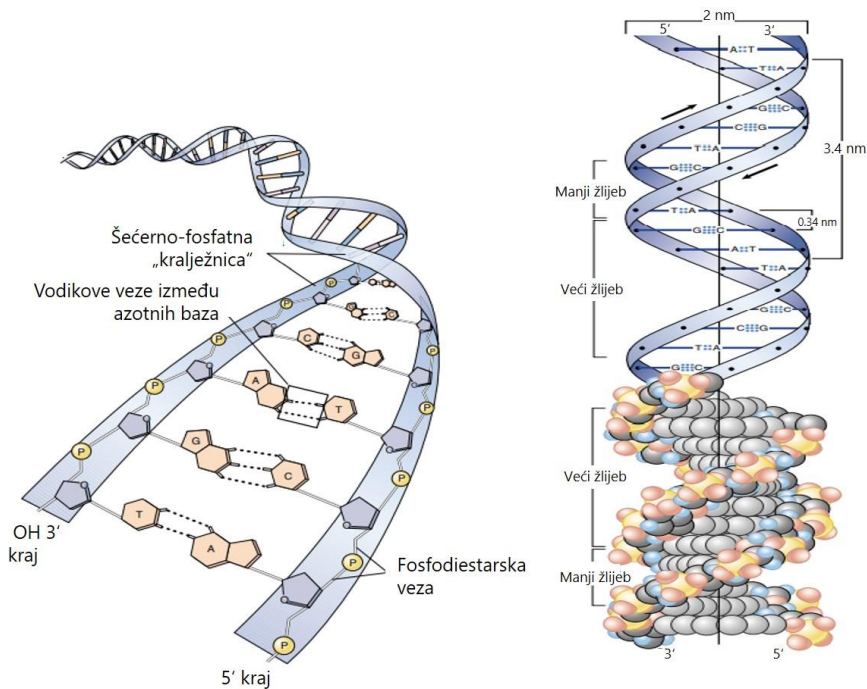
Nukleinske kiseline su otkrivene još u 19. stoljeću, kada ih je 1871. godine prvi put izolirao švicarski ljekar Friedrich Miescher. Međutim, tek su 1944. godine Oswald Avery, Colin MacLeod i Maclyn McCarty eksperimentalno dokazali da je **dezoksiribonukleinska kiselina (DNK)** primarni nosilac genetičkih informacija.

Ovim otkrićem, koje je predstavljalo prekretnicu u molekularnoj biologiji, osporena je ranija hipoteza da su hromosomski proteini odgovorni za nasljeđivanje. DNK je fundamentalna biomolekula koja kodira, prenosi i regulira ekspresiju genetičkih informacija kod svih poznatih živih organizama, kao i kod mnogih virusa. Stabilnost genetičkog materijala postiže se visokom vjernošću replikacije i sofisticiranim mehanizmima popravke oštećenja DNK, što osigurava kontinuitet genetičkih informacija kroz generacije (autokatalitička funkcija DNK).

Osim toga, DNK sadrži upute za sintezu proteina i regulaciju bioloških procesa u ćeliji (heterokatalitička funkcija). Strukturno, DNK je polimer sastavljen od **nukleotida** povezanih fosfodieterskim vezama, tvoreći dugačke polinukleotidne lance. Svaki nukleotid sastoji se od tri komponente: azotne baze (purinske baze - adenin (A) i guanin (G) te pirimidinske baze - citozin (C) i timin (T), pentoznog šećera dezoksiriboze i fosfatne grupe. Genetičku informaciju nose azotne baze, dok pentozni šećer i fosfatna grupa imaju primarno strukturnu ulogu u stabilizaciji molekule. Godine 1953. James Watson i Francis Crick, koristeći podatke dobivene rendgenskom difrakcijom od Rosalind Franklin i Mauricea Wilkinsa, predložili su model **trodimenzionalne strukture DNK** (**Slika 1.1**). Ključne karakteristike ovog modela su:

1. DNK je sastavljena od dva antiparalelna polinukleotidna lanca, koji se spiralno uvijaju oko zajedničke osi, formirajući dvolančanu zavojnicu.
2. Azotne baze su smještene unutar zavojnice, dok su dezoksiriboza i fosfatne grupe orijentirane prema vanjskoj strani molekule. Baze su raspoređene tako da su ravni njihovih prstenova približno okomite na osu zavojnice.
3. Promjer DNK zavojnice iznosi približno 2 nm. Razmak između susjednih baza duž osovine molekule je 0.34 nm, dok se jedna potpuna rotacija heliksa ponavlja na svakih deset parova baza (3.4 nm).

4. Komplementarno sparivanje baza odvija se putem vodikovih veza: adenin uvijek formira dvije vodikove veze s timinom (A-T), dok guanin formira tri vodikove veze s citozinom (G-C). Ova pravila sparivanja omogućavaju tačnu replikaciju DNK i stabilnost molekule.
5. Redoslijed nukleotida duž polinukleotidnog lanca nije unaprijed određen, što omogućava kodiranje genetičkih informacija koje determiniraju strukturu i funkciju proteina u organizmu.



Slika 1.1 Dvolančana zavojnica DNK, omjeri veličina i komplementarno sparivanje baza. (preuzeto i prilagođeno iz Postlethwait i Hopson, 2010)

Ribonukleinska kiselina (RNK) je esencijalni biološki makromolekul koji igra ključnu ulogu u kodiranju, prijenosu i ekspresiji genetičke informacije.

Za razliku od DNK molekule, koja služi kao dugotrajni čuvar genetičkih informacija, RNK djeluje kao dinamični posrednik u različitim ćelijskim procesima, uključujući sintezu proteina i regulaciju gena.

1.2 Osnovne karakteristike RNK

Ribonukleinska kiselina (RNK) je polinukleotidni lanac sastavljen od ribonukleotida, od kojih svaki sadrži ribozu (petouglični šećer), fosfatnu grupu i jednu od četiri azotne baze: adenin (A), citozin (C), guanin (G) ili uracil (U). Za razliku od DNK, gdje je timin (T) komplementaran adeninu, u RNK uracil zauzima tu ulogu. RNK molekule obično su jednolančane, ali mogu formirati složene sekundarne i tercijarne strukture putem intramolekularnih vodikovih veza, što im omogućava zauzimanje različitih funkcionalnih oblika.

U ćelijama postoje različiti tipovi RNK, od kojih svaki ima specifičnu ulogu:

- **Informaciona RNK (mRNK):** Prenosi genetičku informaciju iz DNK do ribosoma, gdje služi kao matrica za sintezu proteina.
- **Ribosomska RNK (rRNK):** Čini osnovnu strukturu ribosoma i katalizira formiranje peptidnih veza između aminokiselina tokom translacije.
- **Transportna RNK (tRNK):** Prenosi odgovarajuće aminokiseline do ribosoma u skladu sa kodonima na mRNK, omogućavajući pravilno sastavljanje polipeptidnog lanca.

Pored ovih, otkriveni su i drugi tipovi RNK s regulatornim funkcijama, kao što su **mikroRNK** (miRNK) i **male interferirajuće RNK** (siRNK), koje igraju ključnu ulogu u post-transkripcijskoj regulaciji gena.

Proces sinteze RNK, poznat kao **transkripcija**, odvija se pod djelovanjem enzima RNK polimeraze, koja koristi DNK kao matricu za sintezu komplementarnog RNK lanca. Kod eukariota, **primarni transkript** (pre-mRNK) prolazi kroz niz post-transkripcijskih modifikacija, uključujući dodavanje 5' kape, poliadenilaciju na 3' kraju i spajanje (splicing), gdje se introni uklanjaju, a eksoni spajaju kako bi formirali zrelu mRNK spremnu za translaciju. RNK molekule igraju centralnu ulogu u procesu **translacije**, gdje se genetička informacija prevodi u proteinske sekvence. mRNK nosi kodiranu informaciju, tRNK donosi odgovarajuće aminokiseline, dok rRNK, kao sastavni dio ribosoma, katalizira formiranje peptidnih veza.

Regulatorne RNK, poput miRNK i siRNK, utiču na stabilnost i translaciju mRNK, te igraju ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena i zaštiti genoma od stranih nukleinskih kiselina.

1.3 Opći koncepti replikacije DNK i novi trendovi u njenom istraživanju

Otkriće strukture DNK imalo je dalekosežne posljedice za razvoj molekularne genetike, omogućivši razumijevanje mehanizama replikacije, transkripcije i translacije genetičkih informacija. Savremena istraživanja u oblasti epigenetike, genomske editacije i sintetičke biologije dodatno produbljuju naša saznanja o ulozi DNK u regulaciji bioloških procesa, otvarajući nove perspektive u medicini, biotehnologiji i bioinformatici.

Razumijevanje strukture DNK ključno je za pravilno shvatanje njenih funkcija. U molekularnoj biologiji, funkcija i struktura su neodvojivo povezane. Međusobna povezanost ovih aspekata omogućava pravilno skladištenje i replikaciju genetičkih informacija, kao i regulaciju ćelijskih aktivnosti. Watson i Crick su 1953. godine prvi predložili strukturu DNK u obliku dvostruke spirale, koja se sastoji od šećerno-fosfatnih lanaca povezanih parovima purinskih i pirimidinskih baza (adenin-timin i guanin-citozin). Ova struktura omogućava stabilno i efikasno skladištenje genetičkih informacija, a redoslijed baza predstavlja šifru koja se koristi u sintezi proteina.

Replikacija DNK je složen proces u kojem dvije komplementarne spirale DNK služe kao matrice za stvaranje novih molekula DNK, uz pomoć specifičnih enzima i regulatornih proteina. Ovaj proces je poznat kao **semikonzervativna replikacija**, jer svaka od novih molekula DNK sadrži jedan originalni lanac i jedan novi. Međutim, kako bi replikacija bila precizna, mora doći do međusobne interakcije različitih molekula, uključujući enzime koji učestvuju u popravci i rekombinaciji DNK. Danas je jasno da su ovi procesi međusobno povezani, te da mnogi proteini mogu biti dio superporodica, koje dijele konzervirane motive za vezivanje DNK. Ove superporodice proteina igrale su ključnu ulogu u razumijevanju

mehanizama replikacije, a njihove strukture potvrđene su korištenjem rendgenske kristalografije i elektronske mikroskopije.

Nedavne studije iz oblasti molekularne mikrobiologije naglašavaju značaj novih tehnologija u analizi molekularnih interakcija tokom replikacije DNK. Tehnike poput **sekvenciranja sljedeće generacije** (eng. *Next-Generation Sequencing*, NGS) omogućile su istraživačima da dobiju uvid u složene procese replikacije i popravka DNK na nivou pojedinačnih molekula. Ova tehnologija omogućava identifikaciju mutacija i varijacija u genetskom materijalu, što može biti korisno u razumijevanju mehanizama za reparaciju DNK. Također, određene studije istražuju kako **epigenetski faktori** utiču na replikaciju i stabilnost genetskog materijala. Faktori poput metilacije DNK i histonskih modifikacija mogu modifikovati replikacijske procese, što otvara nova pitanja u vezi sa regulacijom genetičkih informacija i njihovim nasljeđivanjem.

Popravak DNK je još jedan ključan proces u održavanju stabilnosti genoma. U slučajevima oštećenja DNK, poput onih uzrokovanih UV zračenjem ili hemijskim supstancama, specifični enzimi intervišu kako bi ispravili oštećenja, vraćajući funkcionalnost molekule DNK. Ovaj proces obuhvata **nukleotidnu ekscizijsku reparaciju** (eng. *Nucleotide Excision Repair*, NER), **popravak sa homolognom rekombinacijom** (eng. *Homologous Recombination*, HR) i **nehomologno spajanje krajeva** (eng. *Non-Homologous End Joining*, NHEJ). Studije su pokazale da popravak DNK ne samo da održava stabilnost genoma, već i sprječava razvoj raznih bolesti, uključujući maligna oboljenja.

1.4 Savremena istraživanja i nove molekularne tehnologije

U kontekstu rekombinacije DNK, moderna istraživanja koriste tehnologije kao što su **CRISPR/Cas9** za precizno uređivanje genoma. Ova tehnologija omogućava direktno targetiranje specifičnih lokusa u DNK, čime se otvaraju nove mogućnosti za istraživanje genetičkih bolesti, ali i za terapijske primjene. Nedavna istraživanja pokazuju da replikacija DNK u eukariotskim organizmima ne slijedi uvijek standardni model

semikonzervativne replikacije. U određenim uvjetima, kao što su stresni odgovori ili promjene u ćelijskom ciklusu, može doći do nepotpunih ili greškom vođenih kopija DNK, što dovodi do mutacija. Ovaj fenomen istražuje se u kontekstu različitih tipova ćelijskih oštećenja i može pružiti nove uvide u mehanizme mutagenosti i njihovih implikacija na zdravlje organizama. Danas razumijemo da procesi kao što su replikacija, popravak i rekombinacija DNK nisu samo osnovni za očuvanje genetskog integriteta, već imaju i ključnu ulogu u razvoju bolesti, kao što su karcinomi, neurodegenerativne bolesti i genetske mutacije. Nova istraživanja, uključujući napredne tehnike sekvenciranja i genetskog uređivanja, omogućuju bolje razumijevanje ovih procesa i postavljaju temelje za nove terapijske pristupe. Razvijene tehnologije kao što su CRISPR/Cas9 i nove metode za analizu proteina igraju ključnu ulogu u molekularnoj mikrobiologiji, a buduća istraživanja sigurno će donijeti dodatna saznanja koja će unaprijediti naše razumijevanje strukture i funkcije DNK.

1.5 Semikonzervativna replikacija

Dokazivanje **semikonzervativnog modela replikacije DNK** predstavlja ključan trenutak u razumijevanju molekularne biologije. Prema Watsonu i Cricku, replikacija DNK prati mehanizam u kojem svaka nova DNK molekula sadrži jedan stari i jedan novi lanac. Ovo je u suprotnosti sa **konzervativnim modelom**, prema kojem bi oba lanca bila potpuno nova ili bi oba originalna lanca bila konzervirana, kao i s **disperzivnim modelom**, u kojem bi oba lanca bila podijeljena na male fragmente.

Eksperimenti koje su proveli Meselson i Stahl 1958. godine na bakteriji ***Escherichia coli*** bili su ključni za potvrdu semikonzervativne replikacije (**Slika 1.2**). Bakterije su kultivirane u mediju bogatom teškim izotopom azota (N^{15}), zbog čega je sva DNK u ćeliji bila označena ovim izotopom. Nakon prijenosa u medij s normalnim, lakšim izotopom azota (N^{14}), praćeno je razdvajanjem DNK pomoću centrifugiranja u gradijentu gustoće cezijum-hlorida. Rezultati su pokazali da su molekule DNK prve generacije bile hibridne, s jednim teškim i jednim lakim lancem, dok su u

sljedećoj generaciji bile prisutne molekule koje su sadržavale i hibridne i potpuno lake lance, što je jasno podržalo semikonzervativnu teoriju.

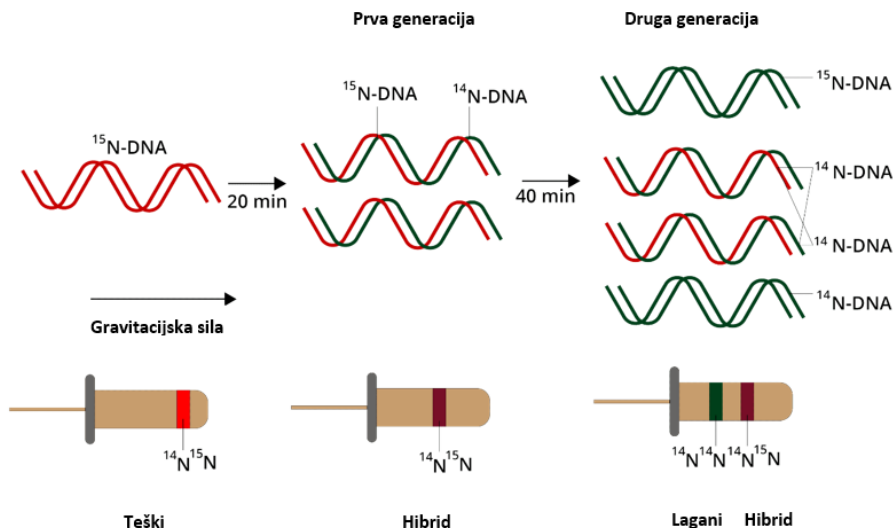
Dodatni eksperimentalni podaci koji su podržali ovu hipotezu uključuju separaciju hibridnih DNK lanaca pomoću alkalnog **cezijum-hloridnog gradijenta**, gdje se teški i laki lanci razdvajaju zahvaljujući njihovoj različitoj gustoći. Ovaj model replikacije DNK ima duboke implikacije za biološke procese, jer pokazuje kako se genetska informacija tačno kopira sačuvavajući integritet naslijeđenih gena, što je temelj za pravilnu funkciju živih organizama. Eksperiment je koristio cezijum-hloridnu (CsCl) ekvilibrijumsku gustoćinsku centrifugaciju kako bi se razlikovale DNK molekule različite gustoće.

U prvom koraku, bakterije *Escherichia coli* uzgajane su u mediju koji sadrži teški izotop azota (^{15}N), čime je njihova DNK postala teška ($\text{N}^{15}/\text{N}^{15}$). Nakon toga, prebačene su u medij koji sadrži lagani izotop azota (^{14}N), omogućavajući sintezu novih lanaca DNK koji su lakši. Uzastopnim ciklusima replikacije analizirane su formirane DNK molekule sedimentacijom u cezijum-hloridnom gustoćinskom gradijentu, čime su vizualizovani različiti oblici DNK:

Roditeljska DNK ($\text{N}^{15}/\text{N}^{15}$) - Nakon početne kulture u teškom azotu (^{15}N), DNK pokazuje najveću gustoću i nalazi se pri dnu epruvete.

1. Prva generacija ($\text{N}^{15}/\text{N}^{14}$, hibridna DNK) - Nakon jedne runde replikacije u mediju s laganim azotom (^{14}N), sva DNK je hibridna, s jednim teškim i jednim lakim lancem, što potvrđuje semikonzervativni model.
2. Druga generacija ($\text{N}^{14}/\text{N}^{14}$ i $\text{N}^{15}/\text{N}^{14}$) - Nakon druge runde replikacije, pojavljuju se dvije vrste DNK: 50% hibridne ($\text{N}^{15}/\text{N}^{14}$) i 50% potpuno lagane ($\text{N}^{14}/\text{N}^{14}$), što dodatno potvrđuje da se pri svakoj replikaciji svaka nova DNK molekula sastoji od jednog starog i jednog novog lanca.

Eksperiment predstavlja jedno od najznačajnijih otkrića u molekularnoj biologiji i temelj je za razumijevanje mehanizama genetičke replikacije i stabilnosti genoma.



Slika 1.2 Semikonzervativna replikacija DNK - Eksperiment Meselsona i Stahla prikazuje ključne dokaze koji su opovrgli konzervativni i disperzni model replikacije DNK, potvrđujući semikonzervativni mehanizam, gdje svaka novonastala DNK molekula nasljeđuje jedan stari i jedan novi polulanac. (preuzeto i prilagođeno iz [GeeksforGeeks](https://www.geeksforgeeks.org/2024/), 2024)

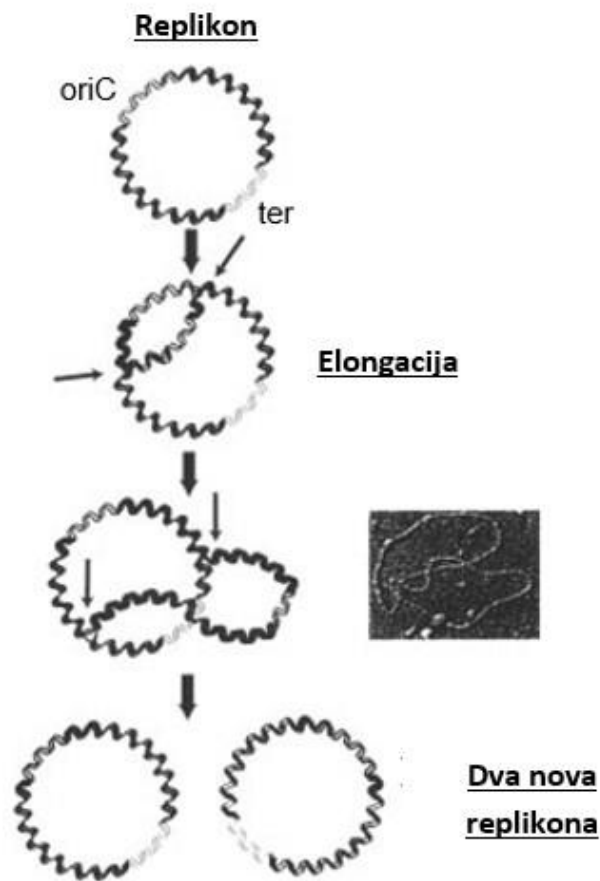
1.5.1 Model replikona

Replikacija DNK se sastoji od tri osnovne faze: **inicijacija**, **elongacija** i **terminacija**. Kroz dugogodišnja istraživanja, uključujući rad Maalaa i Hanawalta iz 1961. godine, otkriveno je da inicijacija zahtijeva sintezu novih proteina, dok elongacija samostalno napreduje bez potrebe za dodatnim inicijatorskim proteinima. Ranija istraživanja na bakteriji *Escherichia coli* i drugim organizmima postavila su temelje za razumijevanje kako započinje proces replikacije.

Cairns je 1963. godine koristio autoradiografske tehnike za mapiranje **replikacijskih viljuški** na DNK hromosomima *E. coli*, potvrdivši da postoji fiksno **ishodište replikacije** (eng. *origin of replication*), s početnim

razdvajanjem dvostrukog heliksa DNK. Genetske studije Yoshikawa i Sueoka također su pokazale prisustvo jednog porijekla replikacije u *Bacillus subtilis*, što je dalje podržalo ideju da bakterijski hromosomi imaju specifična mjesta početka replikacije.

Jacob i saradnici su iste godine razvili **model replikona** koji objašnjava kako se replikacija DNK u prokariotskim organizmima odvija od specifičnog ishodišta replikacije, pri čemu su formirane dvije replikacijske viljuške koje se šire u suprotnim smjerovima (**Slika 1.3**).



Slika 1.3 Bidirekciona replikacija hromosoma. Tanje crne strelice označavaju napredujuće replikacijske viljuške. Mikrografija prikazuje bakterijsku hromosomsku strukturu u procesu replikacije, uporedivu s figurom pored nje. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

Ovaj model se temelji na činjenici da replikacija hromosoma u bakterijama nije slučajna, već visoko regulirana, što omogućava precizno kopiranje genetske informacije. Replikon je stoga označen kao genetička jedinica replikacije koja obuhvata sve potrebne elemente, uključujući inicijaciju, elongaciju i završetak.

Dodatni istraživački radovi potvrdili su da se ovaj proces odvija uz prisustvo različitih **inicijacijskih proteina** koji aktiviraju replikaciju na određenim regijama genoma. U prokariotima, replikon je često vezan za ćelijsku membranu, što omogućava efikasnu segregaciju replikovanih hromosoma, kao što su istraživanja na *E. coli* pokazala. Ovaj koncept ostaje temelj za razumijevanje osnovnih procesa replikacije u svim živim organizmima, iako su kasnija istraživanja u eukariotima dodala složenost modelu replikona.

Pomenuti okvir za razumijevanje replikacije DNK od osnivanja je bio neprocjenjiv, a uprkos modifikacijama tokom vremena, on je i dalje od ključne važnosti za istraživanje molekularnih mehanizama koji omogućavaju tačno i precizno kopiranje genetske informacije.

1.6 Faze replikacije

1.6.1 Inicijacija

Replikacija genetskog materijala je fundamentalni proces u svim živim organizmima, koji omogućava prenošenje genetske informacije na kćerinske ćelije. U prokariotskim organizmima, kao što je *Escherichia coli*, replikacija počinje na specifičnom mjestu na hromosomu poznatom kao **ishodište replikacije**, ili **oriC**. Iako su svi organizmi podložni istim osnovnim principima replikacije, specifičnosti inicijacije mogu se značajno razlikovati među vrstama. Stoga je oriC kod *E. coli* jedan od najbolje istraženih modela za razumijevanje ovog procesa.

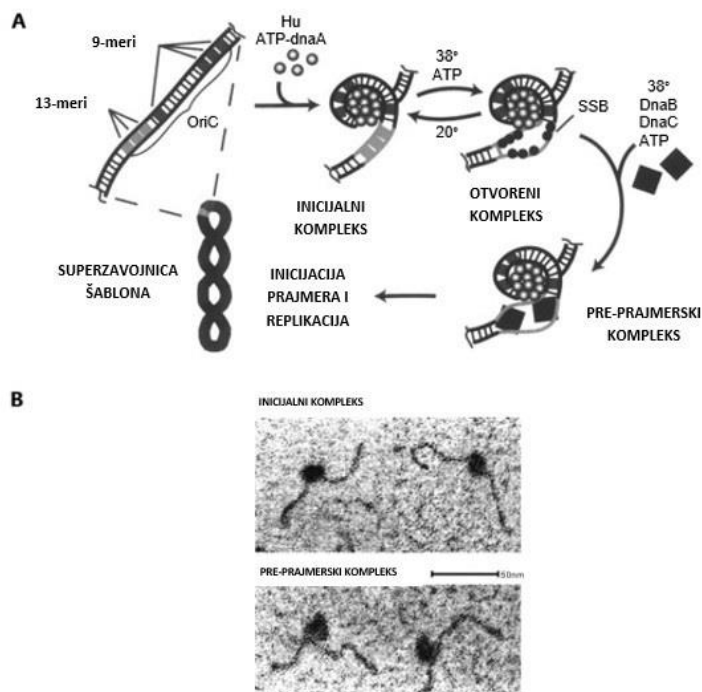
Minimalna oriC regija, koja je neophodna za **inicijaciju replikacije** in vitro, sastoji se od 245 baznih parova, organiziranih u dvije ključne sekvence: 9-merske (ponavljajuće sekvence od 9 baznih parova) i 13-merske (bogate AT parovima) sekvence.

Ove sekvence su od suštinske važnosti jer omogućuju specifičnu interakciju sa **DnaA proteinom**, centralnim regulatorom inicijacije replikacije. Kako je otkriveno u novijim istraživanjima, DnaA ne samo da prepoznaje 9-merske DnaA kutije, već može oblikovati DNK u jedinstvene konformacije koje olakšavaju dalju denaturaciju i destabilizaciju AT-bogatog regiona.

Proteini poput DnaA imaju univerzalnu ulogu u inicijaciji replikacije, a njihov mehanizam djelovanja nije ograničen samo na *E. coli*. Tako je DnaA također ključni element u inicijaciji replikacije u mnogim drugim prokariotskim vrstama, uključujući različite plazmide. Najnovija istraživanja ukazuju na mogućnost razvoja specifičnih inhibitora DnaA koji bi mogli poslužiti kao nova terapija za bakterijske infekcije izazvane patogenim sojevima kao što je *E. coli*.

Uz DnaA, drugi proteini poput **DnaB** i **DnaC** igraju ključnu ulogu u otvaranju i stabilizaciji **replikativnog "mjehurića"**. Ovi proteini omogućuju širenje replikacije, dok stabiliziraju jednolančane regije DNK pomoću proteina poput **proteina jednolančanog vezivanja** (eng. *Single-Stranded DNA-Binding Protein*, SSB). Proteini poput HU, koji se vežu na dvostruku zavojnicu DNK, također su važni za pravilnu strukturalnu organizaciju ishodišta replikacije. Novi pristupi genetičkog i biohemijskog istraživanja omogućili su preciznije praćenje procesa inicijacije replikacije.

Ultramikroskopija i primjena visokokvalitetnih elektronskih mikrografija (**Slika 1.4**) omogućuju detaljno vizualiziranje replikativnih kompleksa u živim ćelijama, što predstavlja značajan napredak u molekularnoj mikrobiologiji. Sa napretkom tehnologije sekvenciranja, omogućeno je detaljno mapiranje gena i proteina koji učestvuju u inicijaciji replikacije u različitim organizmima, uključujući humane stanice. Primjena visokopouz dane tehnologije CRISPR/Cas9 također omogućava preciznu modifikaciju gena odgovornih za inicijaciju replikacije, što može otvoriti nova istraživanja u terapiji genetskih bolesti.



Slika 1.4 A: Shema inicijacije na r C. DnaA protein veže četiri 9-mjerne sekvence, organizujući r C oko proteinskog jezgra kako bi formirao inicijalni kompleks. Tri 3-mjerne sekvence se zatim serijski otapaju od strane DnaA proteina kako bi se stvorio otvoreni kompleks. DnaB-DnaC kompleks sada može biti usmjeren prema 3-mjernoj regiji kako bi proširio otvaranje dupleksne strukture i generirao prepriming kompleks, koji odmotava matricu za priming i replikaciju; B: Elektronske mikrofografije proteinskih kompleksa na r C. Početni kompleks je formiran na superzavojnom r C plazmidu samo sa DnaA proteinom. Prepriming kompleksi su formirani uz pomoć DnaA, DnaB, DnaC i HU proteina. Kompleksi su međusobno povezani i D je isječen restriksijskom endonukleazom. Proteinski kompleksi su vidljivi na r C lokaciji, asimetrično smješteni na D fragmente. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

1.6.2 Elongacija

Elongacija DNK predstavlja ključnu fazu replikacije u kojoj se nova DNK sintetizira na osnovu postojeće matrice. Ovaj proces se odvija visokom efikasnošću zahvaljujući koordiniranom djelovanju brojnih enzima i pomoćnih proteina. U prokariotskim ćelijama, elongacija DNK odvija se brzinom od približno 6×10^4 baza po minuti, omogućavajući završetak sinteze tipičnog prokariotskog hromosoma od oko 4.8 megabaza u oba smjera u roku od 40 minuta.

Centralni enzimi odgovorni za elongaciju DNK su **DNK polimeraze**, među kojima su **DNK polimeraza I** i **DNK polimeraza III** od ključnog značaja (**Tabela 1.1**). DNK polimeraza III je glavni replikacijski enzim u prokariotskim organizmima, sastavljen od najmanje 10 podjedinica koje formiraju dimerne strukture, omogućavajući istovremenu sintezu dva DNK lanca. DNK polimeraza I, iako nije primarni enzim elongacije, igra značajnu ulogu u uklanjanju **RNK prajmera** i popunjavanju praznina između **Okazakijevih fragmenata** na zakašnjelom lancu.

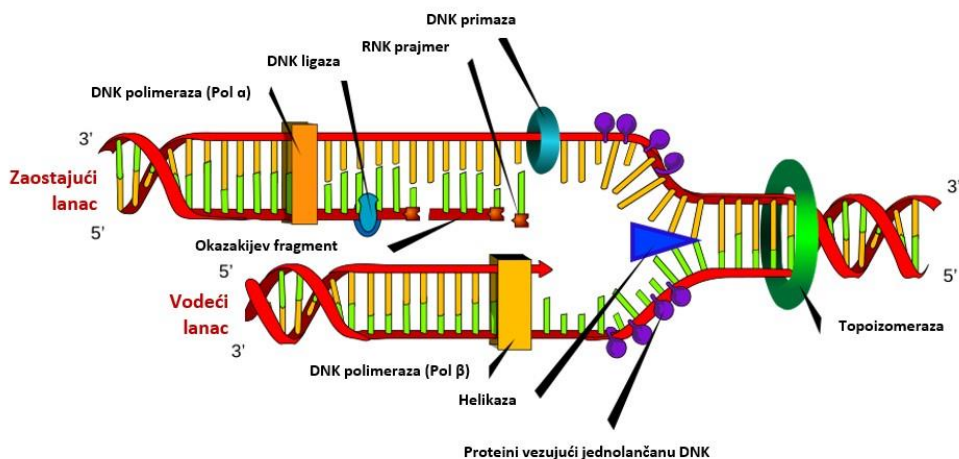
Tri glavna izazova elongacije DNK uključuju:

1. Antiparalelna orijentacija DNK lanaca – DNK molekula je dvolančana i njeni lanci su međusobno antiparalelni, što znači da jedan lanac ima orijentaciju 5'→3', dok drugi ima orijentaciju 3'→5'. Budući da DNK polimeraze mogu dodavati nukleotide samo u smjeru 5'→3', sinteza jednog lanca je kontinuirana (vodeći lanac), dok je sinteza drugog lanca diskontinuirana (zakašnjeli lanac), pri čemu se formiraju Okazakijevi fragmenti.
2. Potreba za prajmerima – DNK polimeraze ne mogu započeti sintezu DNK de novo; umjesto toga, potrebni su im kratki RNK prajmeri koje sintetizira enzim primaza. Ovi prajmeri pružaju slobodnu 3' OH grupu potrebnu za dodavanje novih nukleotida. Nakon elongacije, RNK prajmeri se uklanjaju, a nastale praznine popunjava DNK polimeraza I, dok DNK ligaza povezuje fragmente formirajući kontinuirani DNK lanac.
3. Koordinacija sinteze oba lanca – Iako se čini da se oba DNK lanca sintetiziraju istovremeno, njihova sinteza zahtijeva specifične mehanizme koordinacije. Na zakašnjelom lancu, replikacija se odvija u kratkim segmentima (Okazakijevi fragmenti), koji se naknadno spajaju u jedan kontinuirani lanac.

Uključenost RNK kao prajmera za elongaciju DNK lanca prvi put je demonstrirana osjetljivošću replikacije na rifampicin, inhibitor **RNK polimeraze**. Transkripcijska aktivacija regija uzvodno od tačke inicijacije pomaže DnaA proteinu da otvori dvolančanu DNK, omogućavajući vezivanje

primaze koja sintetiše kratke RNK prajmere. Postojanje **RNK-DNK hibridnih molekula** tokom elongacije potvrđeno je detekcijom kovalentnih fosfodiesterskih veza između ribonukleotida i dezoksiribonukleotida, čime je dodatno potvrđen značaj RNK u ranoj fazi DNK sinteze.

Savremena istraživanja potvrdila su koncept **kontinuirane** i **diskontinuirane** sinteze DNK (**Slika 1.5**), pri čemu vodeći lanac ($3' \rightarrow 5'$) služi kao matrica za kontinuiranu sintezu DNK, pri čemu DNK polimeraza III neprekidno dodaje nukleotide u smjeru $5' \rightarrow 3'$. Zakašnjeli lanac ($5' \rightarrow 3'$) služi kao matrica za diskontinuiranu sintezu, pri čemu se sinteza odvija segmentirano u obliku Okazakijevih fragmenata, koji se kasnije spajaju u jedan cjeloviti lanac uz pomoć DNK ligaze. Ovaj model omogućava simultanu sintezu oba DNK lanca, uprkos inherentnim ograničenjima enzima uključenih u elongaciju. Napredne tehnike, uključujući kriogenu elektronsku mikroskopiju, omogućile su preciznije praćenje dinamike elongacije DNK i interakcija između proteina replikacijskog kompleksa.



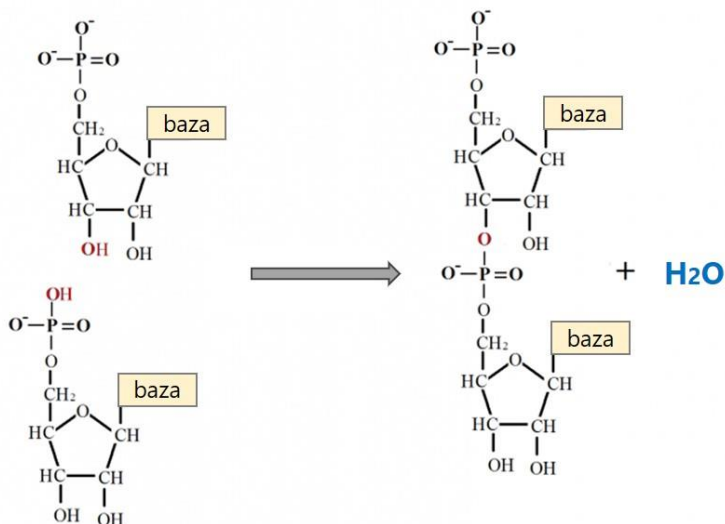
Slika 1.5 Prikaz replikacije DNK. Kontinuirana i diskontinuirana sinteza uz ulogu RNK prajmera. Proces replikacije DNK, uključujući inicijaciju sinteze pomoću RNK prajmera koji osigurava slobodnu 3'-OH grupu potrebnu za vezivanje DNK polimeraze. Kontinuirana sinteza vodećeg lanca prikazana je u smjeru otvaranja replikacione viljuške, dok je diskontinuirana sinteza zaostajućeg lanca prikazana putem serije Okazakijevih fragmenata. Prikazani su enzimski kompleksi koji omogućuju replikaciju i njihovu koordinaciju u procesu. (preuzeto i prilagođeno iz Cours-Pharmacie.com, 2008)

Elongacija je ključna faza u procesu replikacije DNK kod prokariota, tokom koje dolazi do sinteze novog lanca DNK komplementarnog s matrica-lancem. Ovaj proces se odvija zahvaljujući djelovanju enzima DNK polimeraze, koja katalizira dodavanje deoksiribonukleotida na 3'-OH kraj rastućeg lanca. Kod bakterija, kao što je *Escherichia coli*, glavnu ulogu u elongaciji ima DNK polimeraza III (DNK pol III), koja je visoko procesivna i omogućava brzo i precizno umnožavanje genetskog materijala.

DNK polimeraza je centralni enzim u procesu elongacije. Njena primarna funkcija je dodavanje deoksiribonukleotida na 3'-kraj rastućeg lanca, koristeći komplementarni lanac kao matricu. Pored polimerazne aktivnosti, mnoge DNK polimeraze posjeduju i 3'→5' egzonukleaznu aktivnost koja omogućava ispravljanje grešaka uklanjanjem pogrešno uparenih nukleotida, čime se povećava preciznost replikacije. Ova dvosmjerna funkcionalnost ključna je za održavanje genomske stabilnosti.

Proces elongacije započinje vezivanjem DNK polimeraze na jednolančanu DNK matricu, gdje prepoznaje slobodni 3'-hidroksilni kraj prajmera. Enzim katalizira formiranje fosfodieterske veze između 3'-OH grupe posljednjeg nukleotida u lancu i 5'-fosfatne grupe novog deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP) (**Slika 1.6**). Ovaj proces se ponavlja, omogućavajući rast lanca u 5'→3' smjeru. Brzina i tačnost elongacije su rezultat fine ravnoteže između polimerazne i egzonukleazne aktivnosti DNK polimeraze.

Nedavna istraživanja sugeriraju da je efikasnost replikacije određena koordinacijom između polimerizacije i egzonukleazne aktivnosti, gdje različiti modusi diskriminacije u egzonukleaznom putu mogu poboljšati tačnost uz minimalan utjecaj na brzinu replikacije. Pored DNK polimeraze, nekoliko drugih faktora doprinosi efikasnoj elongaciji: Helikaze: Enzimi koji razmotavaju dvolančanu DNK ispred replikacionog viljuška, omogućavajući pristup jednolančanoj matrici. **Proteini jednolančanog vezivanja** vezuju se za jednolančanu DNK nakon razmotavanja, stabilizirajući je i sprječavajući formiranje sekundarnih struktura koje bi mogle ometati replikaciju. **Topoizomeraze** uklanjaju superzavoynicu nastalu ispred replikacijske viljuške, sprječavajući prekomjerno uvijanje DNK koje bi moglo inhibirati napredovanje replikacije.



Slika 1.6 Proces povezivanja dva nukleotida u polinukleotidni lanac putem fosfodieterske veze između 3'-ugljičnog atoma jednog nukleotida i 5'-ugljičnog atoma sljedećeg nukleotida. Ovaj proces je ključan za formiranje dinukleotida, koji služi kao osnovna jedinica za dalje produžavanje polinukleotidnog lanca, što je temelj za sintezu DNK i RNK.

Precizna regulacija elongacije esencijalna je za održavanje genomske integriteta. Disfunkcija u komponentama uključenim u elongaciju može dovesti do genetičkih mutacija i različitih bolesti. Na primjer, mutacije u genima koji kodiraju DNK polimeraze povezane su s određenim vrstama karcinoma i sindromima nestabilnosti genoma. Razumijevanje mehanizama elongacije pruža osnovu za razvoj terapijskih strategija usmjerenih na ciljane inhibicije replikacije u patogenim organizmima ili kancerogenim stanicama. Elongacija DNK predstavlja kompleksan i visoko regulisan proces koji uključuje koordiniranu aktivnost DNK polimeraza, primaza, helikaza i drugih esencijalnih proteina. Unatoč brojnim izazovima, organizmi su razvili sofisticirane mehanizme za osiguravanje efikasne i tačne replikacije genetičkog materijala. Dalja istraživanja u oblasti molekularne mikrobiologije usmjerena su na razjašnjavanje dodatnih regulacijskih mehanizama ovog procesa i njihovih implikacija na genetičku stabilnost i replikacijsku preciznost. Koordinirana aktivnost DNK polimeraze i pomoćnih proteina omogućava održavanje genomske stabilnosti, a poremećaji u ovom procesu mogu imati ozbiljne posljedice po zdravlje organizma.

Tabela 1.1 Djelomičan popis gena uključenih u prokariotsku replikaciju DNK i popravak DNK kod *E. coli*.

Gen - Protein

polA - DNK polimeraza I (popravak i replikacija)

polB - DNK polimeraza II (popravak UV oštećenja)

dnaE, N, Q, X, holA, holB, holC, holD, holE

Podjedinice DNK polimeraze III (glavni enzim replikacije)

dnaG - Primaza (inicira RNK prajmere)

priA, priB, priC, dnaT - Podjedinice primazoma (sa DnaG, DnaB i DnaC)

dnaB, C - Helikaza i njen vezni protein

dnaA - Inicijacija

gyrA, B - Podjedinice giraze (relaksiraju superuvijene lance DNK)

lig - DNK ligaza (enzim za spajanje)

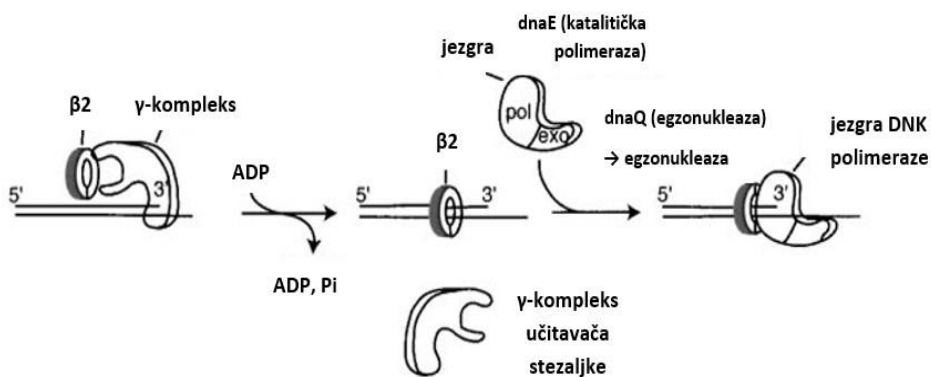
ssb - Proteini koji se vežu za jednolančanu DNK

rnha - Ribonukleaza H (razgrađuje jednolančanu RNK u RNK-DNK hibridnu molekulu)

1.7 Terminacija

Terminacija replikacije DNK kod prokariota predstavlja ključni događaj u procesima biološke reprodukcije, obuhvatajući seriju preciznih molekularnih mehanizama koji zaustavljaju replikacijske viljuške i omogućavaju razdvajanje hromosoma. Kada elongacija replikacije počne u bidirekcionom smjeru od fiksnog ishodišta na kružnom hromosomu, terminacija se obično dešava oko 180° od mjesta inicijacije. Kretanje replikacijskih viljuški mora biti precizno kontrolisano kako bi se spriječio njihov sudar, dok istovremeno postoji mehanizam koji omogućava razdvajanje dva završena hromosoma. Dvije bakterijske vrste, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, detaljno su proučavane u ovom kontekstu, pri čemu se iako generalne karakteristike slične, specifični detalji u regulaciji terminacije replikacije značajno razlikuju.

Kod oba mikroorganizma, inhibicija replikacijskih viljuški postignuta je primarno putem **DNK helikaza** (DnaB u *E. coli* i DnaC u *B. subtilis*) koje omogućavaju usmjeravanje aktivnosti enzima i sprječavaju premještanje proteina prema neslužbenim, prekomjernim lokusima replikacije. Ovaj mehanizam je ključan za preciznu kontrolu tempa replikacije, sprječavajući mogući sudar viljuški koji bi doveo do oštećenja DNK i genetske nestabilnosti. **β -klamp**, protein koji je ključan za stabilnost replikacije, ima strukturu u obliku prstena, sastavljen od dimerne glave i repa, sa šest domena (**Slika 1.7**).



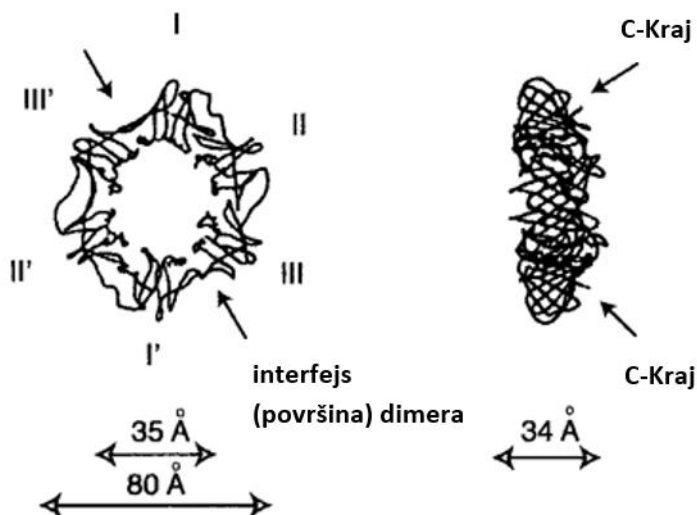
Slika 1.7 Dvostepena montaža procesivne polimeraze. γ -kompleks prepoznaje pripremljeni matricu i povezuje hidrolizu ATP-a za sastavljanje f3 na DNK. γ -kompleks lako disocira sa DNK i može nastaviti svoje djelovanje u učitavanju f3 stezaljki na druge DNK matrice. U drugom koraku dolazi do sastavljanja jezgra sa f3 stezaljkom u procesivnu polimerazu. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

Centralni otvor je dovoljno širok da može obuhvatiti dvostruku spiralu DNK (**Slika 1.8**), omogućavajući nesmetano kretanje replikacione viljuške. Ovo osigurava stabilnost enzimskih kompleksa tokom replikacije, a njegova uloga u eliminaciji nesavršene DNK strukture igra ključnu funkciju u prevenciji grešaka u kopiranju genoma.

1.7.1 Terminusne regije (Ter) u prokariotskoj replikaciji

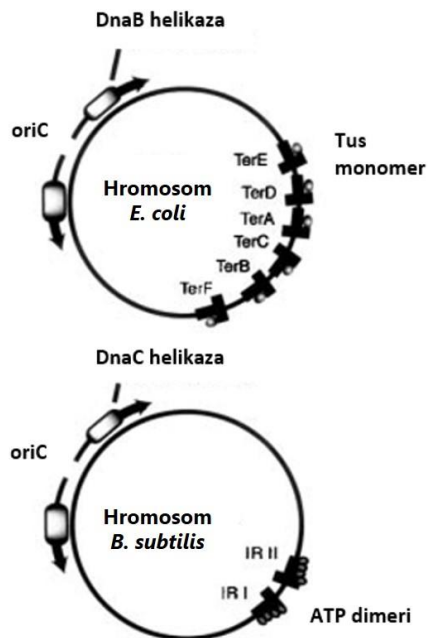
U *E. coli* i *B. subtilis*, **terminusne regije (Ter)** sadrže višestruke terminatore replikacije, koji se sastoje od specifičnih sekvenci koje vežu terminatorske proteine.

Na primjer, kod *E. coli* prisutan je **protein Tus**, koji prepoznaje i veže specifične **Ter lokuse**, čime se aktivira inhibicija replikacije u suprotnom pravcu (**Slika 1.9**). Ove regije postavljaju jasne fizičke prepreke za napredovanje replikacijske viljuške, sprječavajući nekontroliranu replikaciju.



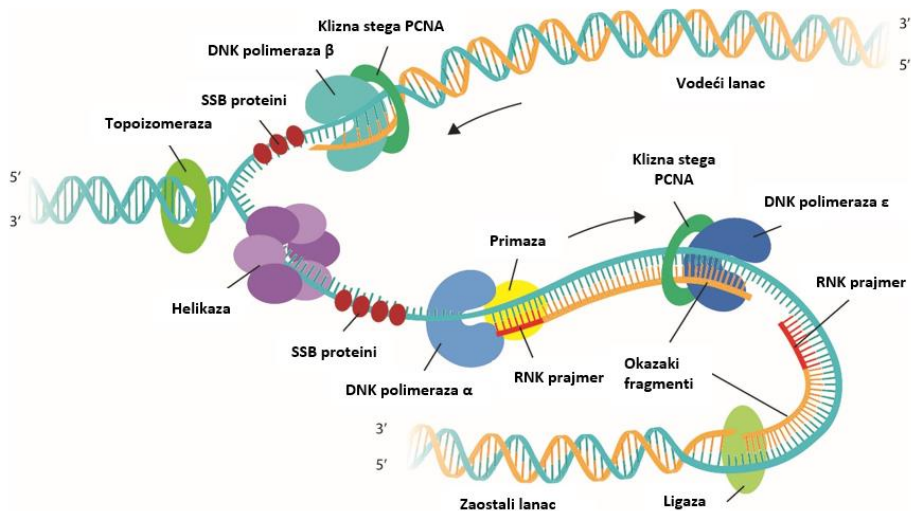
Slika 1.8 Molekularna struktura f3 stega. Prstenasta struktura koja se sastoji od dimera povezanih od glave do repa, sadrži šest domena i centralno otvaranje dovoljno veliko da primi dupleksnu DNK. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

U *B. subtilis*, prisutni su terminatori označeni kao **RTP** (eng. *Replication Terminator Protein*), koji prepoznaju specifične sekvence u Ter regijama i omogućavaju sličan mehanizam inhibicije. Iako postoji osnovna sličnost u funkciji ovih proteina, razlike u strukturi i sekvencama između ova dva organizma naglašavaju evolucijske prilagodbe specifičnih mehanizama inhibicije replikacije. Kod *E. coli*, Ter lokusi su dugi 22 bp, dok su kod *B. subtilis* lokusi duži, sa 30 bp nesavršeno invertovanim ponavljanjima. Ovi lokusi su orijentisani na način da omogućavaju selektivnu inhibiciju replikacije u jednom od smjerova. Na primjer, kod *E. coli*, replikacijska viljuška koja se kreće u smjeru kazaljke na satu susreće nekoliko Ter lokusa, koji ostaju neaktivni dok ne dođu do onog koji je orijentisan u odgovarajućem pravcu. Ovaj fenomen omogućava koordiniranu kontrolu završetka replikacije bez izazivanja genetske destabilizacije.



Slika 1.9 Organizacija inicijacijskih i terminacijskih mjesta replikacije na i 8 podhromosomima. Porijekla bidirekionalne replikacije su označena kao r C, a dvije replikacijske viljuške su predstavljene DnaB i DnaC helikazama. Terminacijska mjesta su označena kao Ter za i IR za 8 podhromosome. T-oblika označava polaritet mjesta; replikacijske viljuške koje se susreću sa ravnom stranom vrha T su zaustavljene. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

Jedan od interesantnih aspekata u terminaciji replikacije je interakcija Ter kompleksa sa **helikazama**. Prema modelu inaktivacije helikaze, postojanje inhibicijske površine u kompleksu protein-DNK može blokirati translokaciju helikaze u nepermisivnoj orijentaciji. Ovo sprječava dalji razvoj replikacije, dok u permisivnoj orijentaciji helikaza može nastaviti razmotavanje DNK i proces replikacije. Ovaj model postavlja temelje za dalje istraživanje specifičnih interakcija između različitih proteina u replikacionim viljuškama i njihovih uloga u regulaciji završetka replikacije. Pol III holoenzim, povezan s f3 stegom, omogućava procesivnu ekstenziju DNK u kontinuitetu (**Slika 1.10**). Zakašnjeli lanac zahtijeva dinamičnu interakciju između Pol III holoenzima, f3 stega i drugih faktora kako bi se omogućila efektivna sinteza Okazaki fragmenta (**Tabela 1.2**). Ovaj proces je ključan za održavanje integriteta genetskog materijala tokom replikacije.



Slika 1.10 Shema sinteze Okazaki fragmenta na zakašnjelom lancu: Uloga Pol III holoenzima i f3 stega u procesivnoj ekstenziji DNK. (preuzeto i prilagođeno iz [MBL Nacionalni univerzitet Singapur](#), 2023)

Tabela 1.2 Podjedinice i podsastavi DNK polimeraze III holoenzima.

Podjedinica | Gen | (kDa) | Funkcija | Podsklop

dnaE - 129,9 kDa - DNK polimeraza

dnaQ, mutD - 27,5 kDa - Korektivna 3'-5' egzonukleaza - jezgro

holE - 8,6 kDa - Stimulira egzonukleazu

dnaX - 71,1 kDa - Dimerizira jezgro. ATPaza zavisna od DNK

pol III -γ - 47,5 kDa - Veže ATP

holA - 38,7 kDa - Veže se za f3 - pol III

holB - 36,9 kDa - Kofaktor za γ ATPazu i stimulira učitavanje stezaljke - γ-kompleks

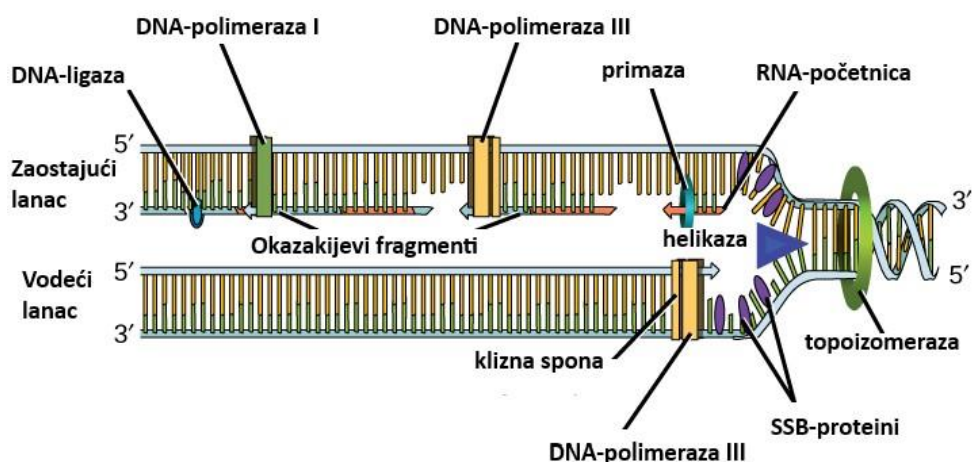
holC - 16,6 kDa - Veže SSB

holD - 15,2 kDa - Most između X i γ

f3 dnaN - 40,6 kDa - Stezaljka na DNK

Napomena: Ovaj gen sadrži dvije kodirajuće sekvence zbog pomaka okvira čitanja.

Prikaz molekularne strukture F3 stege (**Slika 1.11**), koja se sastoji od dimernih jedinica povezanih u glava-rep konfiguraciji. Svaki dimer obuhvata šest domena koji čine kompleksnu strukturu sposobnu za interakciju s duplesnom DNK. Ova struktura omogućava F3 stegi da efektivno povezuje DNK polimerazu i stabilizira proces sinteze DNK. Središnji otvor stege dovoljno je širok da primi duplesnu DNK, što je ključno za procesivnu sintezu Okazaki fragmenta.



Slika 1.11 Molekularna struktura F3 stege: Prikaz dimernih jedinica povezanih glava-rep konfiguracijom i njihovih interakcija s duplesnom DNK. (preuzeto i prilagođeno iz Pavlica, 2012)

1.7.2 Evolucijska prednost terminacije replikacije

Iako su neki eksperimenti pokazali da eliminacija Ter regije ne utiče značajno na preživljavanje organizama, u slučaju *B. subtilis* i *E. coli*, postoji mogućnost da ove regije imaju važnu evolucijsku funkciju. Naime, sistemi zaustavljanja replikacije kroz Ter regije mogu spriječiti „prekomjernu replikaciju“ DNK, što bi moglo dovesti do formiranja multimeričnih DNK struktura koje bi ometale normalnu segregaciju hromosoma i diobu ćelija. Ovo je naročito relevantno za organizme kao što je *E. coli*, gdje je specifični rekombinacijski lokus **dif** prisutan uz **Ter**, kako bi se spriječile neželjene rekombinacije koje bi dovele do genetske nestabilnosti. Razumijevanje molekularnih mehanizama terminacije replikacije u prokariotskim organizmima pruža ključne uvide u

biologiju ćelijske diobe i genetske stabilnosti. Iako postoje značajne razlike u mehanizmima inhibicije replikacijskih viljuški između različitih bakterijskih vrsta, opšti princip terminacije replikacije je duboko povezan s očuvanjem genetskog integriteta i stabilnosti u organizmu.

1.8 Prekursori u replikaciji DNK

Replikacija DNK je ključni biološki proces koji omogućava precizno kopiranje genetske informacije, a za njen ispravan tok neophodno je prisustvo **prekursora** koji se koriste u sintezi novih lanaca DNK.

Glavni prekursori u ovom procesu su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTPs), koji se vežu za replikacionu viljušku kako bi omogućili elongaciju DNK lanca. Osim njih, za početak replikacije potrebno je prisustvo ribonukleozid-trifosfata (rNTPs), koji služe za sintezu RNK prajmera, osnovnog okvira na kojem se nastavlja sinteza DNK. **Sekvestracija prekursora** na replikacijskoj viljuški predstavlja ključnu fazu koja omogućava uspješnu sintezu DNK i RNK. Ovi prekursori nisu slobodni u citoplazmi, već se transportuju do replikacijskih mjesta u preciznoj i balansiranoj koncentraciji. Ovo je neophodno kako bi se obezbijedila stabilnost i tačnost u procesu replikacije. S obzirom na brzinu ovog procesa, sama difuzija prekursora kroz citoplazmu nije dovoljna da objasni koncentraciju ovih molekula na replikacijskoj viljuški.

Umjesto toga, pretpostavlja se da postoje **multienzimski kompleksni sistemi** koji kinetički povezuju ove molekule s replikacijom, omogućavajući njihovu koordinaciju i tačnu lokalizaciju na ispravno mjesto u pravom trenutku. Ovaj fenomen je ključan za pravilno funkcioniranje mehanizama replikacije, a razumijevanje kako multienzimski kompleksi omogućavaju optimalnu dostupnost prekursora može otkriti nove aspekte kontrole genetske stabilnosti. U narednim odjeljcima biće razmotreni faktori koji utiču na ovaj proces, kao i uloga enzima i drugih molekula u pravilnoj sekvestraciji prekursora.

Prekursori dNTP-a i rNTP-a nisu slobodni u citoplazmi, već se transportuju i sekvestriraju u specifičnim oblastima unutar ćelije, čime se obezbjeđuje njihova tačna koncentracija u odgovarajućim fazama replikacije. Istraživanja su pokazala da se ovi prekursori nalaze u formi kompleksa sa određenim

enzimima koji omogućavaju njihovo povezivanje sa replikacijom u preciznim vremenskim intervalima, što sprječava pogrešno umnožavanje genetskog materijala. Multienzimski kompleksni sistemi, kao što su **helikaze**, **primazomeri** i **DNK polimeraze**, rade u sinergiji kako bi obezbjedili optimalnu koncentraciju prekursora na replikacijskoj viljušci i omogućili usmjereni tok sinteze. Upravo ove interakcije između enzima i prekursora omogućavaju precizno upravljanje svim fazama replikacije, uključujući inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Nove tehnologije, kao što su *real-time* PCR i visokopropusna sekvenciranja, omogućile su istraživanje dinamike ovih procesa u stvarnom vremenu, što je doprinijelo boljem razumijevanju mehanizama kontrole dostupnosti prekursora i njihove uloge u održavanju genetske stabilnosti.

Multienzimski kompleksi, kao što su **replisomi**, igraju ključnu ulogu u sinhronizaciji aktivnosti svih prekursora u procesu replikacije. Replisom je specifičan kompleks proteina koji uključuje DNK polimeraze, primazomere, helicaze i druge regulatore koji omogućavaju brzo i precizno umnožavanje DNK. U ovom kontekstu, studije su otkrile da promjene u funkciji ovih kompleksa mogu dovesti do genetske nestabilnosti, što može imati ozbiljne posljedice, uključujući mutacije i razvoj raka.

1.9 Vrste metaboličkih puteva

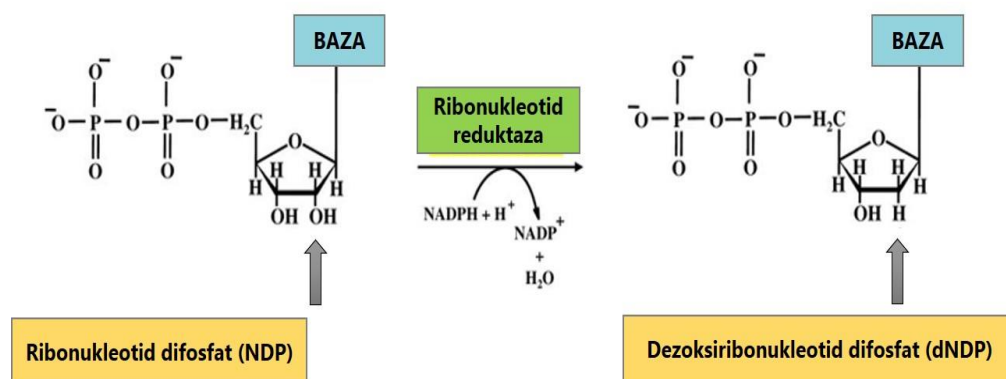
Metabolički putevi za sintezu prekursora DNK, kako je već spomenuto, obuhvataju **spasonosne** i **de novo puteve**. Ova podjela nije samo tehnička, već odražava ključne fiziološke strategije organizama u pogledu energetske efikasnosti i potreba za de novo sintezom genetskog materijala.

Spasonosni putevi su značajni zbog svoje sposobnosti da recikliraju nukleotidne derivate koji su prisutni u okolišu, bilo iz hrane ili iz endogenih izvora. Ovaj proces omogućava organizmu da štedi energiju, smanjujući potrebu za potpuno novom sintezom nukleotida. Prema nedavnim istraživanjima, spasonosni putevi postaju ključni u određenim uvjetima, kao što su stres ili starenje, kada je kapacitet za de novo sintezu smanjen. Jedan od najvažnijih enzima u ovom procesu je **deoksiribonukleozid-kinaza**, koja koristi ATP za dodavanje fosfatnih grupa. Najnovija istraživanja su otkrila da enzimi kao što su deoksiribonukleozid-kinaza (dNK) imaju značajnu ulogu u

održavanju ravnoteže između normalnih i mutiranih stanica u organizmu, što je relevantno u kontekstu terapije protiv tumora. Ovi enzimi mogu postati ciljevi za razvoj lijekova koji inhibiraju procese vezane za staničnu proliferaciju, uključujući terapije za rak.

De novo sinteza prekursora DNK je kompleksan proces koji se odvija u više koraka, od sinteze osnovnih aminokiselina poput glutaminske kiseline do stvaranja purinskih i pirimidinskih nukleotida (**Slika 1.12**). Iako ovaj put omogućava preciznu regulaciju genetskog materijala, novija istraživanja sugeriraju da metabolizam tih prekursora nije samo povezan sa sintezom DNK, već i sa regulacijom drugih ključnih bioloških funkcija, uključujući epigenetske modifikacije i razvoj samospoznaje stanica.

Na primjer, enzimi kao što je **PRPP sintetaza**, koji je ključni u formiranju riboznog derivata PRPP, podložni su preciznoj regulaciji u odgovoru na promjene u staničnoj energiji i potrebama za sintezom nukleotida. Nova istraživanja ukazuju na to da ovi enzimi mogu biti povezani s patološkim stanjima, uključujući metabolički sindrom i kancerogeneze, gdje nepravilna regulacija može izazvati akumulaciju mutacija i genetsku instabilnost.



Slika 1.12 Putanje biosinteze nukleotida: de novo sinteza i recikliranje purinskih i pirimidinskih nukleotida koji su ključni za sintezu DNK i RNK. De novo sinteza se oslanja na precizno sintetiziranje osnovnih nukleotida od jednostavnih molekula i recikliranje koje omogućava ponovnu upotrebu već postojećih nukleotida ili njihovih sastavnih jedinica. Ovi procesi omogućavaju efikasno održavanje staničnih funkcija, naročito u uslovima kada je dostupnost nukleotida ograničena.

1.10 Redukcija ribonukleotida u deoksiribonukleotide

Jedan od ključnih enzimskih procesa u sintezi DNK je redukcija ribonukleotida u deoksiribonukleotide, što je katalizirano **ribonukleotid reduktazom**. Novija istraživanja otkrivaju dodatnu ulogu ovog enzima u staničnoj signalizaciji i u obrani od oksidativnog stresa, što je posebno važno u kontekstu staničnog odgovora na karcinogene faktore.

Osim toga, nedavna istraživanja ukazuju na to da ribonukleotid reduktaza može biti regulator važnih metilacijskih ciklusa, čime direktno utječe na genetske promjene povezane s razvojem tumora i neurodegenerativnih bolesti. U kontekstu terapije, blokiranje sinteze deoksiribonukleotida postalo je privlačna strategija, osobito u liječenju kancerogenih oboljenja. Inhibitori poput metotreksata i hidroksiureje ciljaju enzime povezane s de novo sintezom nukleotida, čime se smanjuje sposobnost stanica za rast i podjelu. Nove klase lijekova, koje specifično inhibiraju različite oblike ribonukleotid reduktaza, razvijaju se u cilju targetiranog uništavanja tumorskih stanica bez velikog utjecaja na zdrave stanice.

1.11 Multienzimski kompleksi

Multienzimski kompleksi predstavljaju ključnu komponentu mnogih bioloških procesa, uključujući sintezu DNK, metabolizam nukleotida, i druge vitalne ćelijske aktivnosti. Prekursori DNK vjerovatno se sintetiziraju unutar multienzimskih kompleksa, koji su kinetički povezani s aktivnostima **DNK polimeraze III holoenzima (Slika 1.13)**. Ovi kompleksi omogućavaju koordiniranu sintezu DNK, gdje različiti enzimi, uključujući polimeraze, ligaze i kinaze, rade u sinergiji kako bi ubrzali procese umnožavanja i popravke DNK. Takvi kompleksi su posebno značajni u prokariotskim organizmima, gdje omogućavaju efikasno i brzo obavljanje ovih ključnih funkcija.

Postojanje ovih kompleksa u prokariotima podržano je brojnim istraživanjima. U eksperimentima sa *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus pneumoniae*, istraživači su koristili tehnike kao što su afinitetna hromatografija, gel elektroforeza i mutagenetske analize kako bi dokazali postojanje kinetički povezanih kompleksa. Na osnovu ovih istraživanja, utvrđeno je da multienzimski kompleksi mogu sadržavati deset ili više enzima,

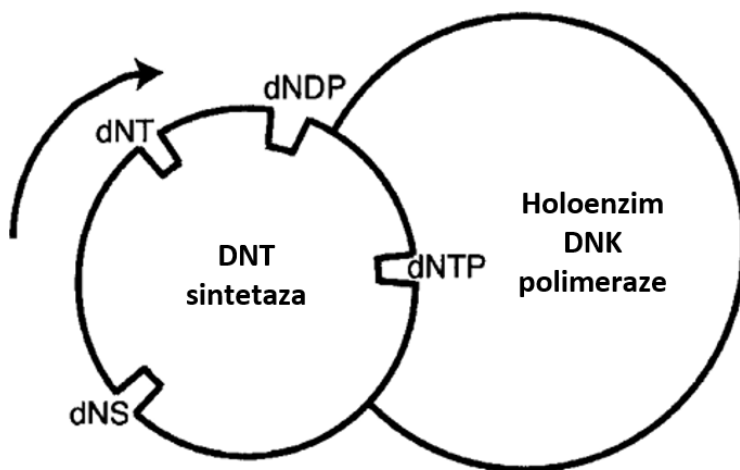
uključujući dezoksinukleozid kinaze, ribonukleozid-difosfat reduktazu, timidilat sintazu i nukleozid-difosfokinazu.

Koeluiranje nakon frakcioniranja cjelovitih ćelijskih ekstrakata putem afinitetne hromatografije: Ova metoda omogućava istraživačima da odvoje i identifikuju proteine koji su povezani unutar kompleksa. Koeluiranje pokazuje da se određeni enzimi pojavljuju zajedno u istom eluatu, sugerirajući da su povezani unutar istog funkcionalnog kompleksa.

Komigracija putem gel elektroforeze: Elektroforetska analiza proteina omogućava praćenje kretanja enzima kroz gelove, pri čemu komigracija enzima može ukazivati na njihovu fizičku povezanost u kompleksu. Identifikacija mutanata sa defektima u formiranju kompleksa: Mutantne varijante organizama koje ne mogu formirati ove kompleksne strukture pružaju uvid u važne uloge svakog enzima u sintezi DNK. Ovi mutanti mogu pokazati smanjenje efikasnosti ili potpuni gubitak aktivnosti u procesu umnožavanja DNK. Katalitička facilitacija u multienzimskim kompleksima, raniji prekursori efikasnije se obrađuju u odnosu na kasnije supstrate, što ukazuje na koordiniranu i ubranu obradu molekula unutar kompleksa. Ova katalitička facilitacija može povećati efikasnost sinteze DNK, smanjujući vrijeme i energiju potrebnu za obavljanje ovog procesa.

Model kinetičkog povezivanja između enzima unutar multienzimskih kompleksa zasniva se na koordiniranim interakcijama između enzima, što omogućava efikasniji rad. U istraživanjima, kao što je ono iz pneumokoka i *Bacillus subtilis*, pokazano je da su aktivnosti prekursora DNK povezane sa DNK polimerazom i DNK ligazom. Ovi enzimi omogućavaju formiranje stabilnih kompleksa koji koordiniraju sintezu DNK u prokariotskim organizmima.

U savremenim istraživanjima molekularne mikrobiologije, razvoj tehnologija poput cryo-EM (kriomikroskopija elektronske mikroskopije) omogućava detaljno proučavanje struktura multienzimskih kompleksa na molekularnom nivou. Ova tehnologija pruža visoku rezoluciju u vizualizaciji 3D struktura i interakcija enzima unutar kompleksa, omogućavajući istraživačima da bolje razumiju kako ovi kompleksi funkcionišu u realnom vremenu.



Slika 1.13 Model za kinetičko povezivanje i katalitičko olakšavanje. Dodavanje dezoksiribonukleozida, dT dezoksiribonukleotida ili dDP dezoksiribonukleozid difosfata omogućava da se prekursori bolje usmjere nego dTP dezoksiribonukleozid trifosfati, neposredni prekursori D, jer mogu lakše ući u kompleks. (preuzeto i prilagođeno iz Streips i Yasbin, 2002)

Također, napredak u tehnologijama sekvenciranja i masenoj spektrometriji omogućava identifikaciju novih komponenti multienzimskih kompleksa i njihovu ulogu u drugim biološkim procesima, kao što je popravka DNK i metilacija genoma. Korištenje ovih novih metoda dovodi do boljeg razumijevanja dinamike multienzimskih kompleksa i njihovog značaja za održavanje genomske stabilnosti u ćelijama. Multienzimski kompleksi su ključni za mnoge biološke procese, uključujući sintezu i popravku DNK. Najnovija istraživanja ukazuju na to da su ovi kompleksi visoko organizirani i kinetički povezani, čime omogućavaju efikasnu koordinaciju aktivnosti enzima. Razvoj novih tehnologija, kao što su cryo-EM i masena spektrometrija, omogućava detaljnije istraživanje ovih kompleksa, što može doprinosti napretku u razumijevanju mehanizama molekularne mikrobiologije i njihove primjene u biotehnologiji i medicini.

1.12 Interakcija replikona i membrane

Model replikona predložen od strane Jacoba i saradnika postavio je temelje za razumijevanje kako se replikacija DNK odvija u prokariotskim ćelijama, kao i način na koji su povezane komponente replikacije sa membranom. Iako se

originalni model zasnivao na ideji da je membrana mjesto replikacije, nova istraživanja ukazuju na kompleksnost ovih interakcija, uključujući povezanost proteina sa membranskim komponentama. Tehnološki napredak, poput mikroskopije visoke rezolucije i fluorescencije, omogućio je detaljniji uvid u to kako se replikacija DNK povezuje s membranom. Nedavne studije otkrile su da membrana ne samo da služi kao fizička platforma, već i kao aktivni regulator procesa replikacije putem specifičnih proteina koji se direktno povezuju s lipofilnim područjima membrane.

Razlike između **Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija** mogu uticati na način na koji se proteini replikacije integriraju u membranu. Istraživanja su pokazala da Gram-negativne bakterije koriste specifične proteine za interakciju sa spoljnim membranskim slojem, dok Gram-pozitivne bakterije često koriste unutrašnji membranski sloj za ovu funkciju. Uz bakterijske ćelije, interakcija sa membranom također igra ključnu ulogu u replikaciji plazmida i bakteriofaga. Na primjer, **plazmidi RK2** koriste membrane za inicijaciju replikacije, a novi nalazi sugeriraju da bakteriofagi, kao što je T4, koriste modificirane proteine za interakciju s membranom domaćina, što omogućava preciznu regulaciju početka replikacije.

Iako su proteini koji se povezuju s membranom ključni za replikaciju DNK, njihova funkcija nije uvijek u potpunosti razjašnjena. Studije su pokazale da mnogi inicijacijski proteini, kao što su DnaA iz *E. coli* i DnaB iz *B. subtilis*, posjeduju specifične domene koji omogućuju njihovu vezanost za membranu. Ovi proteini ne samo da omogućuju početak replikacije, već i obezbjeđuju stabilnost replikacijskog kompleksa kroz interakciju sa lipidnim slojem membrane.

Upotreba tehnika kao što su kriomikroskopija (cryo-EM) omogućila je precizno mapiranje membranskih interakcija sa replikacijskim proteinima, što je otkrilo da određeni proteini sadrže **lipidne prstene** koji olakšavaju njihovu interakciju sa membranom. Pomoću tehnika kao što su FRET (eng. *Fluorescent Resonance Energy Transfer*), utvrđeno je da interakcije između replikacijskih proteina i membrane nisu statične, već dinamične. Ove dinamičke promjene omogućavaju fine prilagodbe tokom različitih faza ciklusa replikacije.

1.13 Razlike u interakcijama između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija

Već spomenute razlike u interakcijama između bakterijskih vrsta otkrivaju dublje molekularne mehanizme kako membrana modulira procese replikacije. Gram-negativne bakterije često koriste kompleksnije sisteme za vezanje proteina replikacije na unutrašnje membrane, dok Gram-pozitivne bakterije koriste jednostavnije sisteme vezivanja sa spoljnim slojem membrane.

U *Escherichia coli*, proteini poput **DnaA** i **DnaC** se specifično vežu za **periplazmu**, dok se kod Gram-pozitivnih bakterija, poput *Staphylococcus aureus*, ove interakcije uglavnom javljaju na unutrašnjem sloju citoplazmatske membrane, što pokazuje razlike u strukturalnim potrebama za replikaciju u različitim bakterijama. Membrana ne samo da služi kao fizička barijera, već djeluje i kao selektivni regulator koji omogućava samo specifičnim replikacijskim proteinima da se vežu za odgovarajuće membrane. Ovaj proces osigurava visoku specifičnost u kontroliranju početka replikacije i segregacije novonastalog hromosoma.

1.13.1 *Escherichia coli*

Rani pokušaji razjašnjenja načina na koji se DNK *E. coli* veže na membranu bili su temeljeni na identifikaciji membranskih proteina koji mogu utjecati na replikaciju DNK. Međutim, ključni napredak postignut je tek izolacijom i detekcijom početka replikacije. Brojne studije su izvijestile da je DNK početne regije bila obogaćena u membranskim frakcijama ekstrahovanim iz *E. coli*, posebno u vanjskim membranskim frakcijama, čime su potvrđene inicijalne teorije o ulozi membrane u inicijaciji replikacije.

Iako je početno smatrano da se samo hemimetilirana DNK veže na vanjsku membranu, novija istraživanja pokazala su da ovo povezivanje ovisi o specifičnim postavkama metilacije, pri čemu potpuno metilirana ili nemetilirana DNK ne pokazuju istu interakciju. Ovaj mehanizam uključuje **GATC siteove**, koji su prepoznati od strane **adeninske metilaze** i od ključne su važnosti za interakciju između početka replikacije i membrane. Daljnja istraživanja u in vitro uvjetima, pokazala su inhibiciju replikacije DNK u grubom **oriC** plazmidnom sustavu samo kada je oriC plazmid bio

hemimetiliran, što je otvorilo prostor za teoriju negativne kontrole koja se temelji na interakcijama između membrane i replikacijskog kompleksa. **SeqA** protein, koji se veže za hemimetilirane početke, sprječava preranu reinicijaciju replikacije, čime se usmjerava preciznost u organizaciji replikacije. Nedavna istraživanja sugeriraju da SeqA protein igra važnu ulogu u inhibiciji formiranja otvorenog kompleksa tijekom inicijacije replikacije, čime se doprinosi usmjeravanju aktivnosti DnaA proteina. Mnoge studije su pokazale da SeqA interferira sa stvaranjem otvorenog kompleksa, dodatno ilustrirajući složenost mehanizama vezivanja i deaktivacije tih proteina u membranskom okruženju.

U posljednjim istraživanjima, korištenje naprednih tehnologija, kao što su mikroskopske tehnike u stvarnom vremenu i napredne metode za detekciju molekularnih interakcija, omogućile su dublje razumijevanje uloge membranskih lipida u inicijaciji replikacije. Neke studije sugeriraju da anionski fosfolipidi igraju ključnu ulogu u održavanju aktivnosti DnaA proteina. Na temelju tih saznanja, može se pretpostaviti da replikacija *E. coli* počinje u membranskom okruženju, uz interakcije sa unutrašnjom membranom, čime se omogućuje specifična kontrola nad inicijacijom replikacije. Iako su ovi uvidi značajno unaprijedili naše razumijevanje inicijacije replikacije, brojna pitanja ostaju neodgovorena. Primjerice, gdje se tačno odvija inicijacija replikacije nakon što hemimetilirani oriC DNK napusti vanjsku membranu? Kako bi se dobio odgovor na ovo pitanje, potrebna su dalja istraživanja korištenjem sofisticiranih in vitro sistema koji mogu replicirati DNK u uvjetima koji se najbliže približavaju fiziološkim uvjetima u živim organizmima.

Escherichia coli, kao modelni organizam, bila je predmet mnogih istraživanja u molekularnoj mikrobiologiji, posebno u pogledu vezivanja DNK za membranu i inicijacije replikacije. Rani pokušaji da se razjasni kako se DNK *E. coli* veže za membranu fokusirali su se na identifikaciju membranskih proteina koji mogu utjecati na replikaciju DNK. Tek izolacija i detekcija početnih regija replikacije omogućila je dalji napredak. Brojne grupe izvještavaju da je DNK početnih regija bila obogaćena u membranskim frakcijama ekstrahovanim iz *E. coli*, ali da je to bila vanjska membranska frakcija koja je bila uključena. Važan dodatak u razumijevanju ovog procesa bio je otkriće da DNK početne regije vežu vanjsku membranu samo kada je u hemimetiliranom stanju, tj. kada je samo jedan od dva komplementarna DNK

lanca metiliran. Potpuno metilirana ili nemetilirana DNK ne pokazuje ovu interakciju. Ova regija sadrži mnoge GATC siteove koje prepoznaje adeninska metilaza (dam siteovi) i koji su ključni za medijaciju interakcije početak-membrana.

Nedavna istraživanja pokazuju da protein SeqA može imati dodatne inhibicijske funkcije u vezi s metiliranjem i hemimetiliranjem početaka replikacije. Ovaj protein ne samo da ometa formiranje otvorenog kompleksa tokom inicijacije, već i premješta DnaA proteine sa njihovog vezivanja za početak. Ove funkcije SeqA proteina značajno doprinose kontroli replikacije u *E. coli* i sugeriraju složeniju interakciju između metilacije, membranske veze i inicijacije replikacije. Studije su pokazale da se DnaA inicijacijski protein ponaša kao membranski povezan protein, čiji je aktivni oblik zavistan od anionskih fosfolipida. Važno je napomenuti da replikacija može biti inicirana u membranskom okruženju, ali s promjenama u lokaciji. Chakraborty i saradnici su primijetili vezivanje oriC u unutrašnjim membranskim subfrakcijama, što sugerira da bi premještanje oriC između unutrašnje i vanjske membrane moglo igrati ključnu ulogu u kontroli inicijacije.

Istraživanja ukazuju na to da bi replikacija mogla biti regulisana kroz interakciju između vanjske membrane, unutrašnje membrane i proteina vezanih za membranu, uz kontrolu stanja metilacije. Ovaj mehanizam se i dalje proučava, ali istraživanja sugeriraju da SeqA protein i promjene u fosfolipidnoj strukturi mogu imati ključnu ulogu u kontroliranju replikacije. Nova istraživanja iz oblasti molekularne mikrobiologije i mikroskopije visokih rezolucija nastoje dodatno razjasniti ove mehanizme u živim organizmima. Razvijeni su i novi in vitro sistemi za proučavanje replikacije *E. coli*, koji omogućuju bolje razumijevanje uloge proteina kao što su SeqA u membranskom okruženju. Takođe, napredak u tehnologijama poput CRISPR/Cas9 pruža nove alate za istraživanje tačnih molekularnih interakcija na nivou pojedinačnih molekula DNK, što otvara mogućnost novih terapijskih pristupa za kontrolu bakterijske replikacije.

1.13.2 *Bacillus subtilis*

U usporedbi s *E. coli*, gdje su dva sloja membrane ključna za proces replikacije DNK, *B. subtilis* posjeduje jedinstvenu membransku strukturu koja se bitno razlikuje. Ova razlika može utjecati na dinamiku i preciznost replikacije. Iako *B. subtilis* nema metilacijske siteove u *oriC* regiji kao *E. coli*, novija istraživanja sugeriraju da struktura i fizička svojstva membrane mogu imati ključnu ulogu u vezanju DNK i inicijaciji replikacije. Gen **dnaB** kod *B. subtilis* se smatra ključnim u procesu vezivanja *oriC* regije za membranu. Iako prethodna istraživanja ukazuju na njegovu važnost, najnovija saznanja sugeriraju da interakcija ovog proteina s membranom može biti složenija nego što se prethodno pretpostavljalo. Nove studije, koristeći visokoprecizne tehnike poput kristalografije i NMR spektroskopije, pružile su dodatne uvide u način na koji DnaB protein intereagira s membranskim lipidima i DNK.

Jedan od ključnih izazova u molekularnoj mikrobiologiji je razumijevanje mehanizama kako membrana posreduje u replikaciji DNK. Razvijeni su novi pristupi koji uključuju in vitro replikaciju, koristeći membranske frakcije *B. subtilis* kao sistem za proučavanje inicijacije i elongacije DNK. Ova istraživanja su omogućila otkrivanje novih proteina koji mogu regulirati početak replikacije, uključujući one koji djeluju kao inhibitori inicijacije, čime se direktno povezuje metaboličko stanje bakterije s procesima replikacije DNK. U novijim istraživanjima, korištenje membranskih frakcija kao izvora za enzime potrebne za replikaciju DNK postalo je standardizirani pristup. Pomoću ove metodologije istraživači su uspjeli detektirati ključne proteine uključene u proces replikacije, uključujući **piruvat dehidrogenazu**, čiji je inhibitorni utjecaj na inicijaciju replikacije otkriven kao nova interakcija između metabolizma i ekspresije gena. Ovo otkriće pruža važne uvide u to kako bakterijski metabolizam može utjecati na gensku ekspresiju i replikaciju.

1.14 Plazmid RK2

Plazmid RK2, jedan od najistraživanijih plazmida širokog domaćina, pruža značajna saznanja o mehanizmima plazmidne replikacije i interakciji s membranskim komponentama bakterijskih ćelija. Istraživanja su pokazala da ovaj plazmid sadrži jedinstvenu membransku subfrakciju koja se specifično vezuje za njegovo ishodište replikacije (**oriV**), a ovo vezivanje je posredovano

inicijacijskim proteinima koje kodira plazmid, što rezultira specifičnom sintezom plazmidne DNK na način koji je sličan semikonzervativnoj replikaciji. Za razliku od ranijih istraživanja koja su se bavila plazmidnim kompleksima i njihovom vezom s membranama, novija istraživanja su omogućila bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji uključuju inicijacijske proteine plazmida. Proteini **TrfA**, koji imaju masu od 33 kDa i 43 kDa, ključni su za vezivanje s membranskim frakcijama, ali nisu integralni membranski proteini. Ovi proteini sadrže samo jedan kratak hidrofoban aminokiselinski domen, koji je presudan za njihovu funkciju, iako nije dovoljno dug da bi prešao kroz membranu.

Nadalje, istraživanja sa miniplazmidnim derivatima RK2, uključujući 60 kb plazmide koji su kultivirani u *Escherichia coli*, pokazala su da miniplazmidni DNK/membranski kompleksi mogu sintetizirati superspiralnu DNK semikonzervativnim načinom. Ovaj mehanizam omogućava specifičnu plazmidnu replikaciju unutar bakterijske ćelije, što predstavlja ključnu tačku za razumijevanje plazmidne dinamike i replikacije u bakterijama koje sadrže širok spektar plazmida. Slični eksperimenti s četiri druge Gram-negativne bakterijske vrste koje posjeduju plazmid potvrdili su da vezivanje TrfA proteina za membranske frakcije ima ključnu ulogu u sintezi plazmidne DNK, dok vanjski membranski slojevi ostaju u većini slučajeva neaktivni. Istraživanje je također pokazalo da je unutrašnja membrana ta koja je aktivna u sintezi plazmidne DNK, dok su vanjski slojevi prisutni, ali ne pokazuju istu aktivnost u pogledu replikacije. Kroz flotaciju u sukroznim gradijentima i centrifugaciji otkriveno je da su inicijacijski proteini TrfA specifično povezani sa unutrašnjim i vanjskim membranskim frakcijama. Međutim, testiranja su pokazala da samo subfrakcije unutrašnje membrane, koja čini samo 10% ukupne membrane, imaju visok nivo aktivnosti u vezivanju oriV i sintezi plazmidne DNK, dok su vanjske frakcije bile daleko manje aktivne u tom procesu.

Ovi rezultati pružaju dodatnu potporu teoriji da je mjesto replikona plazmida u bakterijskoj ćeliji specifično za određene membranske domene, što je značajno za razumijevanje kako bakterije repliciraju plazmide i održavaju plazmide u svojoj populaciji. U posljednjim godinama, napredak u tehnologijama sekvenciranja genoma i analizi proteoma omogućio je

detaljniju identifikaciju i karakterizaciju molekularnih mehanizama plazmidne replikacije.

Novi pristupi, poput sljedeće generacije sekvenciranja i proteomske analize, omogućili su uvid u specifične interakcije proteina plazmida s membranskim komponentama i pružili uvid u dinamiku njihovih interakcija u stvarnim uslovima bakterijske ćelije. Smatra se da je unutrašnja membrana ključna za plazmidnu replikaciju zbog svoje sposobnosti da usmjeri aktivnost TrfA proteina prema oriV regiji plazmida. Osim toga, nedavni radovi su pokazali da postoje dodatne molekularne interakcije koje se dešavaju između plazmida i bakterijske ćelije, što otvara mogućnosti za dalja istraživanja u oblasti plazmidne biologije i bakterijske adaptacije. U posljednjim decenijama, molekularna mikrobiologija je postigla značajan napredak, naročito u području razumijevanja replikacije DNK kod prokariota. Nova istraživanja u ovoj oblasti ukazuju na usavršavanje metoda sekvenciranja DNK i upotrebu naprednih tehnologija, poput CRISPR/Cas sistema, koji omogućavaju precizno istraživanje replikacijskih mehanizama i regulacije gena na molekularnom nivou.

1. Napredak u razumijevanju replikacije DNK u prokariotima - prvo, replikacija DNK u prokariotima, naročito kod bakterija, predstavlja jedan od ključnih procesa koji omogućava pravilnu diobu i rast ćelija. Kao što je već ranije spomenuto, DNK polimeraza III holoenzim je ključni enzim za ovaj proces, i njegova struktura je detaljno analizirana u posljednjem desetljeću. Recentna istraživanja proučavaju specifične interakcije između subjedinica ovog enzima, što je dovelo do boljeg razumijevanja njegove funkcionalne dinamike.
2. Replikacija DNK i organizacija prokariotskih genoma - Kao i kod eukariota, prokarioti posjeduju specifične regije DNK koje iniciraju proces replikacije. Za razliku od eukariotskih organizama, koji imaju složene nukleosome, prokarioti posjeduju jednostavniji genetski okvir, što omogućava bržu i efikasniju replikaciju. Mehanizam inicijacije replikacije uključuje AT-bogate regije koje omogućavaju lakšu denaturaciju DNK, što olakšava pristup proteinima odgovornim za inicijaciju replikacije.

3. Model replikona i koordinacija sa ćelijskom podjelom - model replikona ostao je temelj za mnoge eksperimente u molekularnoj mikrobiologiji. Ovaj model pretpostavlja da su replikacijska mjesta u prokariotnim ćelijama organizirana u specifičnim područjima koja korespondiraju sa ćelijskom membranom. Najnovija istraživanja pokazuju da su ove oblasti, uz pomoć proteina odgovornog za diobu, direktno povezane s procesima koji osiguravaju pravilnu podjelu i genetiku tokom diobe ćelija.
4. Genetska kontrola i razlike među prokariotskim grupama - iako je osnovni mehanizam replikacije sličan kod svih prokariota, razlike između Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija pokreću značajne varijacije u regulaciji ovog procesa. U Gram-negativnim bakterijama, replikacija se često događa u blizini periplazme, dok kod Gram-pozitivnih bakterija ovo područje ima drugačiju organizaciju zbog debljeg peptidoglikanskog sloja. Istraživanje ovih razlika omogućava dublje razumijevanje specifičnosti u bakterijskim adaptacijama i patogenosti.
5. Tehnološki napreci u molekularnoj mikrobiologiji - napredak u tehnologijama poput NGS-a omogućio je bržu i precizniju analizu genetskih materijala prokariota. Upotreba CRISPR/Cas9 sistema također je otvorila vrata za nove eksperimente u genetskoj modifikaciji bakterija, čime se povećava razumijevanje uloge specifičnih gena u replikaciji DNK i interakcijama sa ćelijskom membranom. Ove tehnologije ne samo da olakšavaju istraživanje već i omogućavaju nove terapijske pristupe, naročito u kontekstu bakterijskih infekcija.

2

Tehnologija rekombinantne DNK

Aner Mešić

Irma Mahmutović-Dizdarević

Rekombinacija podrazumijeva rezanje i lijepljenje segmenata DNK kako bi se proizveli novi aranžmani. **Tehnologija rekombinantne DNK** predstavlja upotrebu in vitro molekularnih tehnika za manipulisanje DNK fragmentima i stvaranje novih aranžmana. Tehnologija rekombinantne DNK i kloniranje gena omogućili su genetičarima ispitivanje odnosa između genskih sekvenci i fenotipskih ishoda te su stoga bili fundamentalni za naše razumijevanje strukture i funkcije gena. Većina istraživača molekularne genetike upoznata je s tehnologijom rekombinantne DNK i često je primjenjuje u svom radu. Razvijene su i značajne praktične primjene rekombinantne DNK tehnologije, uključujući napredak u genskoj terapiji, screeningu humanih oboljenja, rekombinantnim vakcinama i proizvodnji transgenih biljaka i životinja u poljoprivredi, u kojima se klonirani gen iz jedne vrste prenosi na neke druge vrste. Transgeni organizmi su također važni i u bazičnim istraživanjima.

2.1 Kloniranje gena pomoću vektora

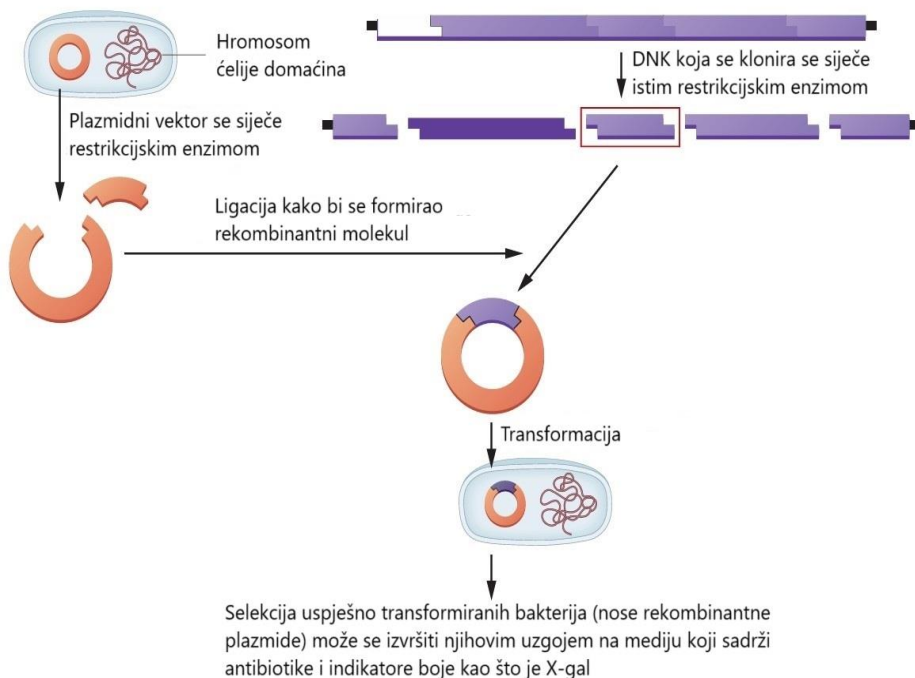
Molekularni biolozi žele razumjeti kako molekuli unutar živih stanica doprinose ćelijskoj strukturi i funkciji. Budući da su proteini radne molekule ćelija i budući da predstavljaju produkte gena, mnogi molekularni biolozi usmjeravaju svoju pažnju na strukturu i funkciju proteina ili gena koji ih kodiraju. Istraživači mogu usredotočiti svoje napore na proučavanje samo jednog ili možda nekoliko različitih gena ili proteina.

Kod eukariotskih vrsta, bilo koja ćelija može da eksprimira hiljade različitih proteina, čineći proučavanje bilo kojeg pojedinačnog gena ili proteina izuzetno izazovnim. Kako bi prevladali ovu, zaista veliku prepreku, istraživači često koriste pristup kloniranja gena koji kodiraju proteine od interesa. Termin **kloniranje gena** odnosi se na fenomen stvaranja velikog broja kopija gena. Ukoliko introducujemo strani gen u bakteriju ili bilo koji drugi tip ćelije, na način da će biti kopiran kada se ćelija replicira, tada će se stvoriti veliki broj ćelija koje će imati identične kopije tog dijela DNK. Stvaranjem brojnih kopija, ovu DNK sekvencu možemo potom sekvencirati ili označiti kao probu kako bi proučavali njenu ekspresiju u organizmu iz kojeg potječe. Jednako tome, moguće je ekspimirati njen proteinski produkt u bakterijskoj ili eukariotskoj ćeliji. Nadalje, moguće ju je mutirati kako bi proučavali promjene koje ta mutacija uzrokuje u genu, njegovom proteinskom produktu ili ćeliji koja ga nosi. Čak je moguće purificirati gen iz bakterijskog klona i injektirati ga u jaje miša te tako stvoriti liniju transgenih miševa koji ga ekspimiraju. U osnovi svih ovih primjena leži proces kloniranja sa istim bazičnim koracima.

Neke bakterijske vrste prirodno „kupe“ DNK procesom poznatim kao transformacija. Ipak, većina bakterija mora biti podvrgnuta određenim hemijskim ili fizičkim tretmanima prije nego DNK uđe u ćeliju. U svim slučajevima, DNK neće biti replicirana od strane ćelije domaćina ukoliko se ne rekombinira sa hromosomom ćelije domaćina (npr. umetnuta u njega) ili nije inkorporirana u molekulu koja je prepoznata od strane ćelije domaćina kao supstrat za replikaciju. Za većinu primjena, druga strategija je relevantna. U tom smislu, koriste se **vektori** za prijenos DNK što omogućava njezinu replikaciju. Postoji mnogo različitih tipova vektora koji se mogu koristiti sa bakterijama, ali za početak ćemo se osvrnuti na **plazmide** koji predstavljaju male cirkularne dijelove DNK prirodno prisutne u mnogim bakterijskim sojevima i povremeno u eukariotskim ćelijama, a koji se repliciraju nezavisno od hromosoma.

Naime, DNK koju želimo klonirati umeće se u odgovarajući vektor stvarajući **rekombinantnu molekulu** koja se sastoji od vektora i inserta (**Slika 2.1**). Ova rekombinantna molekula će biti replicirana od strane bakterijske ćelije, tako da će sve ćelije koje potječu od tog početnog transformanta sadržavati kopiju ovog dijela rekombinantne DNK.

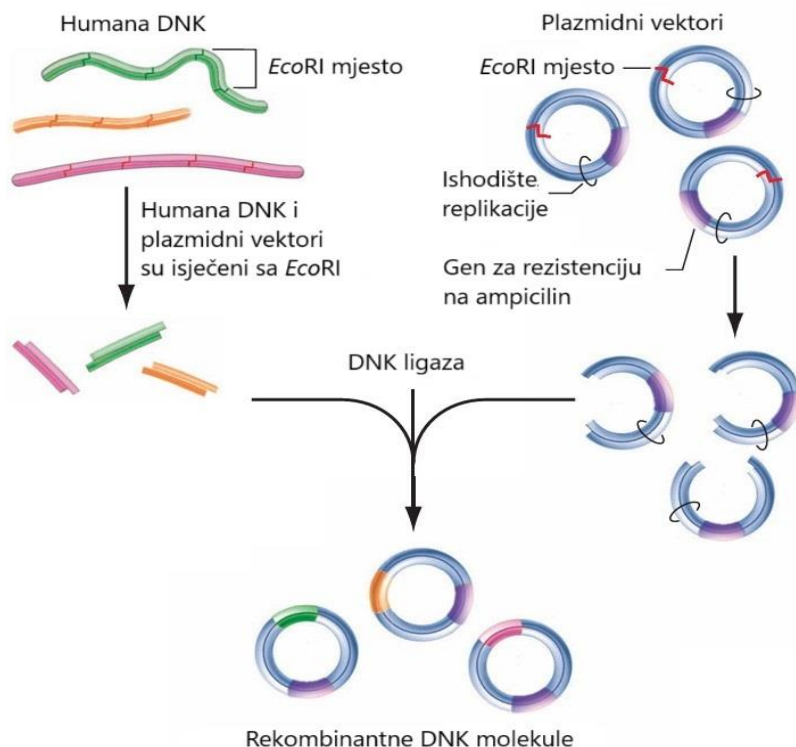
Bakterija kao što je *E. coli* može se replicirati vrlo brzo u laboratorijskim uvjetima, udvostručujući veličinu svoje populacije otprilike svakih 20 minuta. Ovakav eksponencijalan rast doprinosi nastanku velikog broja ćelija. Tako npr., nakon 30 generacija (10 sati), teoretski broj potomačkih ćelija iznosi 10^9 od inicijalnog transformanta i svaka ćelija nosi kopiju rekombinantne DNK molekule (stvoren ogroman broj kopija klonirane DNK).



Slika 2.1 Osnovni prikaz kloniranja gena. Kloniranje plazmidnim vektorom uključuje isijecanje i plazmida i DNK za kloniranje istim restriktionskim enzimom. DNK koja se klonira, spaja se u vektor i prenosi u bakterijskog domaćina radi replikacije. Bakterijske ćelije koje nose plazmide sa DNK insertima mogu se identificirati selekcijom i potom izolirati. Klonirana DNK se zatim ekstrahira iz bakterijskog domaćina za dalju analizu. (preuzeto i prilagođeno iz Klug i sar., 2012)

Kako bismo umetnuli dio DNK u vektor, potrebna nam je metoda za spajanje dijelova DNK, kao i način isijecanja vektora kako bi se omogućilo spajanje između vektora i umetnute DNK. Prema tome, za razvoj tehnologije genskog kloniranja ključno je bilo otkriće enzima koji će omogućiti precizno izvođenje ovih reakcija.

Enzimi koji su neophodni za proces kloniranja su **restriktivske endonukleaze** koje prekidaju šećerno-fosfatni kostur DNK molekula na preciznim mjestima, kao i **DNK ligaze** koje imaju sposobnost spajanja DNK fragmenata dobivenih na ovaj način (**Slika 2.2**).



Slika 2.2 Isijecanje i spajanje DNK pri konstruiranju rekombinantnih DNK molekula. (preuzeto i prilagođeno iz Hartwell i sar., 2018)

Kada je dio DNK umetnut u plazmidni vektor (rekombinantni plazmid), onda je neophodno izvršiti njegovo unošenje u bakterijskog domaćina procesom **transformacije**. Generalno, ovaj proces nije veoma efikasan te samo mali broj bakterijskih ćelija pokupi plazmid. Mnogi prirodni plazmidi nose gene koji daju otpornost na antibiotike ili druge toksične supstance. Ovi plazmidi se označavaju kao **R faktori**. Ukoliko koristimo plazmidni vektor koji nosi gen za rezistenciju na određeni antibiotik, možemo jednostavno zasijati transformiranu bakterijsku kulturu na agar ploče koje sadrže antibiotik te će samo ćelije koje su pokupile plazmid moći rasti i formirati kolonije.

Plazmidi također sadrže sekvencu DNK, poznatu kao **ishodište replikacije** (eng. *origin of replication*), koju prepoznaju replikacijski enzimi ćelije domaćina i omogućuje joj replikaciju. Sekvenca ishodišta replikacije određuje da li se vektor može replicirati u određenom tipu stanice domaćina. Neki plazmidi imaju ishodišta replikacije sa širokim rasponom domaćina. Takav plazmid se može replicirati u ćelijama mnogih različitih vrsta. S druge strane, mnogi vektori korišteni u eksperimentima kloniranja imaju ograničen raspon ćelija domaćina. U eksperimentima kloniranja, istraživači moraju odabrati vektor koji se replicira u odgovarajućim vrstama ćelija za svoje eksperimente. Na primjer, ako želimo da se klonirani gen propagira u *E. coli*, vektor koji koristimo mora imati ishodište replikacije koji prepoznaje ova vrsta bakterije. Ishodište replikacije također određuje broj kopija plazmida. Za neke se plazmide kaže da imaju jaka ishodišta jer mogu postići veliki broj kopija - možda 100 do 200 kopija plazmida po ćeliji. Drugi imaju slabije ishodište, sa samo jednim ili dva plazmida pronađena po ćeliji.

2.2 Ekstrakcija i purifikacija nukleinskih kiselina

Prvi korak za većinu molekularnih procedura o kojima se govori u ovoj knjizi jeste izvršiti ekstrakciju DNK (ili za neke svrhe RNK) iz ćelije te je purificirati odvajanjem od drugih ćelijskih komponenti. Shodno tome, u ovom dijelu ćemo dati pregled koncepata koji leže u osnovi najčešće korištenih metoda purifikacije i frakcioniranja nukleinskih kiselina.

2.2.1 Razaranje ćelija i tkiva

Ukoliko počinjemo sa kulturom bakterijskih ili eukariotskih ćelija, prvi korak bi bio separirati ćelije od medijuma za rast. Kadgod je moguće, materijal bi trebao biti svježije prikupljen ili zamrznut dok nije spreman za dalju manipulaciju, a kako bi se izbjegla degradacija enzimima prisutnim u ćelijskom ekstraktu.

U nastavku bi ćelije trebale biti lizirane kako bi oslobodile svoje komponente. Tipična bakterijska ćelija zatvorena je citoplazmatskom membranom i okružena rigidnim ćelijskim zidom. *Escherichia coli* (i slične bakterije) također posjeduju vanjsku membranu koja ima ulogu u sprječavanju pristupa ćelijskom zidu. Prema tome, liza bakterijske ćelije zahtijeva upotrebu

kombinacije jakih hemikalija. Na primjer za *E. coli*, liza ćelije se postiže primjenom kombinacije etilen diamin tetra acetata (eng. *Ethylene Diamine Tetra Acetate*, EDTA), lizozima i natrij dodecil sulfata (eng. *Sodium Dodecyl Sulphate*, SDS). Preciznije, lizozim digestira polimere koji izgrađuju ćelijski zid, dok EDTA eliminira dvovalentne katione destabilizirajući vanjsku membranu, a što omogućava lizozimu pristup ćelijskom zidu. Dodatna prednost upotrebe EDTA leži u tome da inhibira djelovanje DNaze koja bi u suprotnom pokazivala tendenciju razgradnje DNK koju želimo izolirati. Konačno, uloga deterdženta ogleda se u solubiliziranju membranskih lipida, čime se oslobađa ćelijski sadržaj.

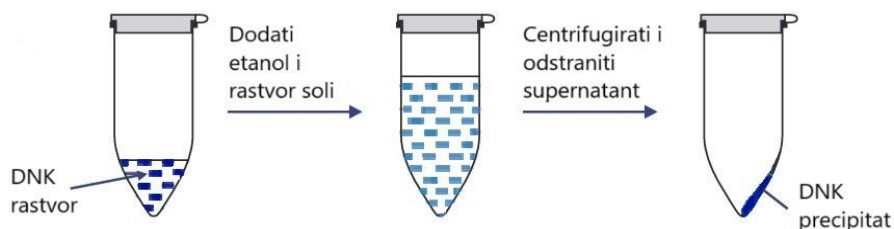
Ćelije biljaka i gljiva posjeduju ćelijske zidove koji se razlikuju od onih kod bakterijskih ćelija te zahtijevaju upotrebu alternativnih tretmana bilo mehaničkih ili enzimatskih. S druge strane, animalne ćelije (ne posjeduju ćelijski zid) obično mogu biti lizirane primjenom blažih tretmana (npr. pomoću otopine blagog deterdženta). Ukoliko počinjemo sa mnogo kompleksnijim uzorkom tkiva, neophodno ga je prvo homogenizirati kako bi dispergovali tkivo na manje skupine ćelija, tako da pojedinačne ćelije mogu biti podvrgnute procesu lize.

Sirovi ekstrakt dobiven nakon lize sadrži kompleksnu mješavinu DNK, RNK, proteina, lipida i ugljikohidrata. Važno je napomenuti da će iznenadna liza ćelija rezultirati fragmentacijom hromosomske DNK. Kada želimo dobiti veliku (čak i netaknutu) hromosomsku DNK, neophodno je primijeniti blage uvjete za lizu ćelija. Ipak, bakterijski plazmidi se lako dobijaju u svom izvornom, cirkularnom stanju pomoću standardnih uvjeta lize. Sljedeći korak bi bio razdvajanje željene nukleinske kiseline od ostalih komponenti. Uklanjanje RNK tokom DNK ekstrakcije se vrlo elegantno postiže tretmanom pomoću ribonukleaze (RNaze).

Budući da je RNaza izrazito toplotno-stabilan enzim, veoma je lako osloboditi je od tragova dezoksiribonukleaze (DNaze), koja bi u suprotnom degradirala željenu DNK, jednostavnim zagrijavanjem prije same upotrebe. U novije vrijeme, rutinski je moguće izvršiti kupovinu RNaze bez DNaze, kao i DNaze bez RNaze (neophodna za uklanjanje DNK prilikom ekstrakcije RNK).

Uklanjanje proteina posebno je važno budući da ćelija posjeduje veliki broj enzima koji će degradirati nukleinske kiseline, kao i drugih proteina koji će ometati naknadne procedure vezivanjem sa nukleinskim kiselinama. Najefikasniji način uklanjanja proteina jeste ekstrakcijom sa tečnim fenolom ili hloroformom. Kada se mješavina podvrgne snažnom miješanju, proteini će biti denaturirani i precipitirani u interfazi, dok se nukleinske kiseline mogu dobiti iz vodene faze. Ukoliko se provede postupak ekstrakcije sa netretiranim (kiselim) fenolom, DNK će se izdvojiti u organskoj fazi, a što će omogućiti dobijanje čiste RNK iz vodene faze. Ipak, ako (kao što je to češći slučaj) želimo dobiti DNK procesom ekstrakcije, esencijalno je da fenol bude kalibriran neutralnim ili čak baznim puferom, što omogućava izdvajanje DNK u vodenoj fazi. Važno je istaknuti da je fenol veoma opasan za upotrebu. S tim u vezi, mnogo je sigurnije i prikladnije koristiti afinitetnu hromatografiju ili digestiju proteolitičkim enzimima kao što je proteinaza K. Danas su dostupni komercijalni kitovi za ovu namjenu.

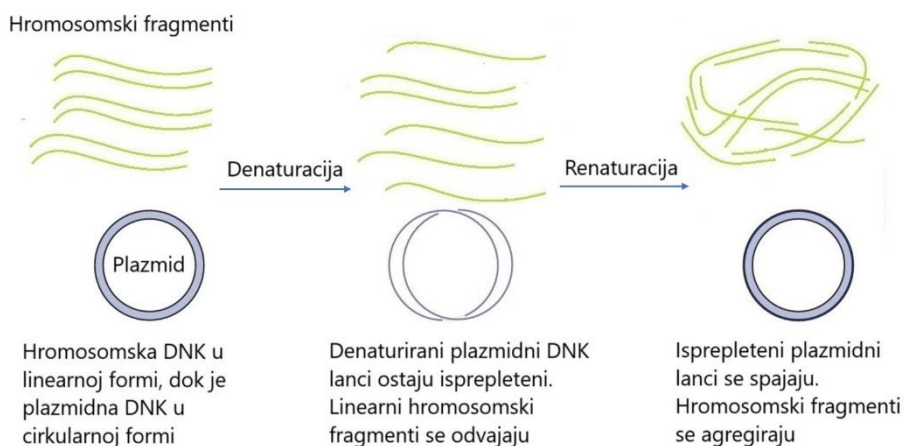
Nakon postupka uklanjanja proteina, dobijamo uzorak nukleinskih kiselina oslobođen od proteina. Ipak, ovakav uzorak će biti razrijeđeniji nego što to želimo. Odgovor na ovakvu situaciju obično bi bio koncentrirati (i dalje purificirati) rastvor precipitacijom nukleinskih kiselina. Ovo se postiže dodavanjem isopropanola ili etanola sa jednovalentnim kationima (Na^+ , K^+ ili NH_4^+) koji će zajedno dovesti do formiranja precipitata (taloga) nukleinskih kiselina. Konačno, precipitat može biti sakupljen na dnu tubice postupkom centrifugiranja (**Slika 2.3**). Male količine soli će također biti precipitirane te lako mogu biti uklonjene naknadnim ispiranjem taloga pomoću 70% etanola.



Slika 2.3 Etanolna precipitacija. Tubice se centrifugiraju, tako da se talog nalazi na strani donjeg dijela tubice.

2.2.2 Alkalna denaturacija

Prethodno opisana procedura omogućava izolaciju ukupne DNK iz bakterijske ćelije. Sljedeći korak bio bi separacija plazmida iz hromosomske DNK, a što je moguće uraditi procesom **alkalne denaturacije**. Kao što je gore opisano, hromosomska DNK se fragmentira na linearne fragmente tokom lize ćelije. Podizanje pH vrijednosti narušava vodonične veze i omogućava linearnim lancima da se razdvoje. Plazmidi su mnogo manje sklони fragmentiranju i nisu ometeni tokom ćelijske lize, tj. ostaju u formi intaktne, supernamotane cirkularne DNK. Iako će visoka pH vrijednost prekinuti vodonične veze, dva cirkularna lanca neće se fizički razdvojiti i ostat će međusobno povezani. Kada se smanji pH vrijednost, međusobno povezani lanci plazmida će se privući kako bi ponovno formirali dvolančani plazmid (**Slika 2.4**). Nasuprot tome, razdvojeni linearni hromosomski fragmenti će se agregirati nakon čega ih je moguće ukloniti centrifugiranjem, ostavljajući plazmide u otopini. Ostale ćelijske komponente, uključujući ostatke ćelijskog zida i mnoge proteine također je moguće ukloniti pomoću ove procedure, smanjujući potrebu za fenolnom ekstrakcijom.



Slika 2.4 Postupak alkalne denaturacije za purifikaciju plazmida.

2.2.3 Purifikacija kolonice

Dvije vrste purifikacije kolonice se često koriste prilikom prečišćavanja nukleinskih kiselina. U hromatografiji odabira veličine, uzorak se propušta kroz matriks malih poroznih kuglica. Manje molekule, kao što su soli i

neinkorporirani nukleotidi, ući će u kuglice, dok će one veće poput dužih lanaca nukleinskih kiselina proći tačno kroz kolonicu. Ova vrsta purifikacije predstavlja brzu i jednostavnu alternativu purifikaciji pomoću alkoholne precipitacije.

U purifikaciji afinitetnom hromatografijom, makromolekule u uzorku vežu se za resin u kolonici. Obično se radi o anionskom **resinu** koji se veže za negativno nabijene fosfatne skupine u okosnici nukleinske kiseline; ali može biti i sofisticiraniji, kao što je resin obložen sa oligo-dT sekvencama, koje se specifično vežu za poli(A) repove eukariotskih iRNK molekula. U oba slučaja, nepoželjne molekule mogu se isprati sa kolonice, nakon čega se mijenjaju uvjeti strogosti i eluiraju vezane nukleinske kiseline.

2.3 Detekcija i kvantifikacija nukleinskih kiselina

Ukoliko je ekstrakcija DNK izvršena na način da se dobije razumno čista DNK, onda je moguće izvršiti procjenu koncentracije DNK mjerenjem **absorbance rastvora** u ultravioletnom (UV) spektrofotometru na 260 nm. Ovo se pokazalo vrlo prikladnim, s tim da razrjeđenje potrebno za mjerenje uzoraka u standardnom spektrofotometru značajno smanjuje senzitivnost.

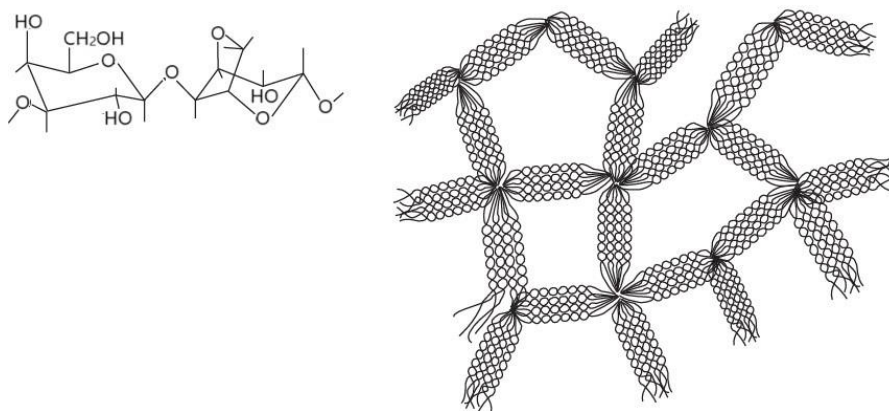
Danas je istraživačima dostupna oprema koja omogućava mjerenje UV absorbance veoma malih uzoraka nukleinskih kiselina (mikrolitarski ili čak nanolitarski volumeni). Važno je istaknuti da će prisustvo proteina ili fenola značajno utjecati na procjenu, kao i da se absorbanca od 280 nm često koristi za procjenu takve kontaminacije. Omjer absorbance 260 : 280, u rasponu 1,75 - 2 ukazuje na razumno čist uzorak. Treba imati na umu da UV absorbanca ne daje informaciju o integritetu DNK. S tim u vezi, DNK može biti totalno degradirana, a da još uvijek dobijemo očitavanje na spektrofotometru.

Određene boje, kao npr., **etidium bromid**, obično se koriste i za detekciju i za kvantifikaciju nukleinskih kiselina. Etidium bromid posjeduje ravnu prstenastu strukturu koja ima sposobnost umetanja između baza nukleinskih kiselina, a sam proces je poznat kao **interkalacija**. Boja se može detektirati na osnovu svoje fluorescencije kada je izložena UV. Ovo predstavlja najšire korištenu proceduru za bojenje elektroforetskih gelova, kao i za procjenu količine DNK ili RNK u svakom bendu na osnovu poređenja intenziteta

fluorescencije sa uzorkom poznate koncentracije na istom gelu. Treba napomenuti da je etidium bromid mutagen te je iznimno važno preduzeti sve mjere opreza, a kako bi se eliminirali potencijalni rizici na zdravlje. Alternativno, danas se koriste manje opasne boje u ove svrhe.

2.3.1 Analitička gel elektroforeza

Analiza sastava i kvaliteta uzorka nukleinske kiseline može se provesti pomoću **agarozne gel elektroforeze**. Agarozni gelovi uglavnom se koriste kada je potrebno dobiti velike pore za analizu molekula promjera $>10\text{nm}$. Agaroz je polisaharid koji se dobiva iz crvenih morskih algi. Veličina pora zavisi od koncentraciji agaroze (obično se odnosi na težinu agaroze i volumen vode). Neizbježni gubici vode koji se javljaju tokom zagrijavanja mogu varirati, tako da u praksi ova vrijednost ne može biti tačna. Obično se koriste gelovi s veličinom pora od 150 nm pri 1% (w/v), do 500 nm pri 0,16%. Agaroz se otapa u kipućoj vodi, koja zatim hlađenjem stvara gel. Tokom ovog procesa nastaju dvostruke spirale koje se bočno spajaju u relativno debele filamente (**Slika 2.5**).



Slika 2.5 Hemijska struktura agaroze i struktura polisaharidnih polimera nakon stvaranja gela. (preuzeto i prilagođeno iz Westermeier., 2016)

Za razdvajanje DNK, gelovi debljine 1-10 mm izlivaju se na UV-prozirne posude budući da su bendovi obično obojeni fluorescentnim bojama kao što su etidij bromid ili *SYBR Green*. Etidij bromid je molekula koja ima odgovarajuću veličinu kako bi inerkalirala između naslaganih parova baza

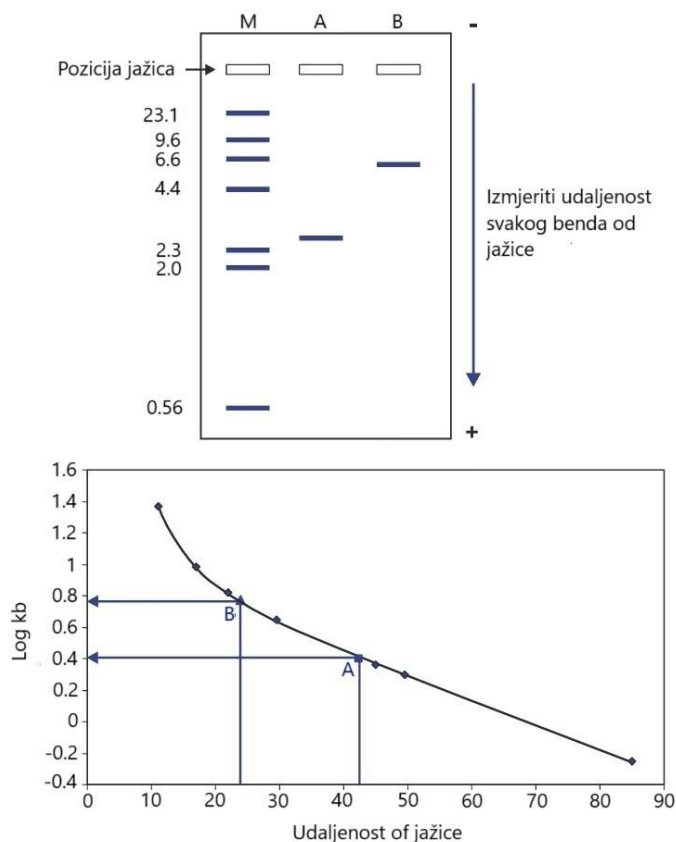
dvolančane DNK. Osjetljivost se kreće između 100 pg i 1 ng po liniji. Gelovi se mogu izliti s već uključenom bojom ili se mogu obojiti nakon elektroforeze. Budući da boje interkaliraju u heliks, osjetljivost zavisi od veličine fragmenta DNK i manja je za detekciju RNK. S ovim bojama treba pažljivo rukovati jer su mutagene. Novije boje, kao što je *DNA Stain D*, nisu mutagene i umjesto interkaliranja, vežu se za fosfatne skupine. Agarozni gelovi se stavljaju direktno u pufer kako bi se spriječilo isušivanje usljed elektroendosmoze. Bendovi se potom vizualiziraju pod UV svjetlom na transiluminatoru. Za trajno zapisivanje, uglavnom se snimaju fotografije gelova u tamnoj komori. Sistemi za video dokumentaciju snimaju slike, ispisuju rezultate ili ih unose u računar.

Za elektroforezu proteina, gelovi se pripremaju oblaganjem ravnih staklenih ploča ili filmova otopinom agaroze. Debljina gela obično iznosi 1-2 mm i određena je volumenom otopine i površinom koju pokriva. Ujednačene debljine gela postižu se izlivanjem otopine u prethodno zagrijane kalupe. Razdvojeni proteinski bendovi uglavnom se detektiraju bojenjem gelova sa *AmidoBlack* ili *Coomassie Brilliant Blue* nakon sušenja. Kako bi se poboljšala detekcije proteina, razvijena je prva tehnika bojenja srebrom za agarozne gelove za detekciju oligoklonalnog imunoglobulina G (IgG) u cerebrospinalnoj tekućini.

Agarozna gel elektroforeza predstavlja standardni metod za određivanje veličine DNK fragmenata dobivenih restrikcijskom digestijom ili veličine PCR produkata. U tu svrhu, neophodno je kalibrirati gel pomoću standardnog markera koji sadrži fragmente poznatih veličina. Na **Slici 2.6** je prikazana DNK iz lambda bakteriofaga dobivena restrikcijskom digestijom pomoću *HindIII*. Na prikazu se može vidjeti da u velikom dijelu raspona veličina postoji linearni odnos između logaritma veličine fragmenta i udaljenosti koju je prešao. Iz ovog kalibracijskog grafikona, moguće je procijeniti veličinu nepoznatih fragmenata, pretpostavljajući da su u pitanju linearne, dvolančane DNK.

Razlog za ne-linearnost krive sa većim DNK molekulama leži u tome da se ove molekule kreću na drugačiji način kroz gel. Iako su velike, one su istovremeno i veoma tanke te mogu lako skliznuti sa gela na kraju. Ovim

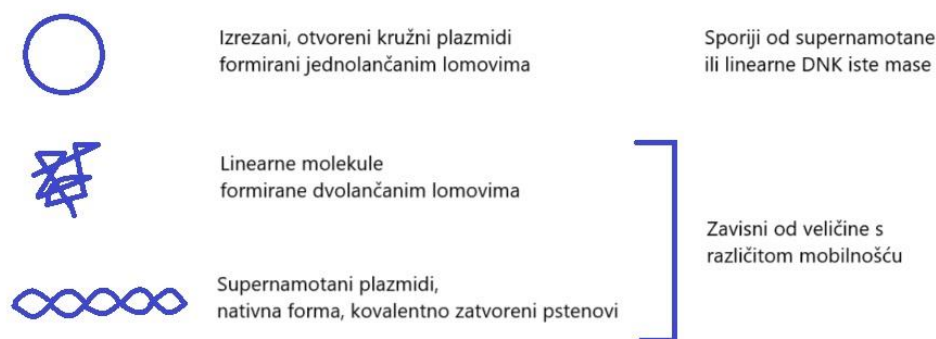
molekulama je potrebno izvjesno vrijeme da se poslože, ali jednom kada to urade, onda je stopa kojom se kreću u velikoj mjeri nezavisna od njihove veličine. Dakle, za određeni gel, sve molekule iznad određene veličine će imati gotovo istu mobilnost. Na prikazanom gelu, sve DNK molekule veće od oko 20 kb neće biti razdvojene, s tim da će korištenje gelova sa nižom koncentracijom agaroze proširiti raspon veličina. S tim u vezi, danas su dostupne posebne tehnike koje uključuju česte promjene smjera električnog polja za razdvajanje veoma velikih DNK molekula, kao što je gel elektroforeza u pulsirajućem polju (eng. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (vidi sekciju 2.3.2). Ako je potrebna preciznija potvrda prirode uzorka, tada se gel stavlja na membranu i hibridizira sa probom nukleinske kiseline (npr. Southern blotting).



Slika 2.6 Analitička gel elektroforeza. Pomoću standardnog markera za izradu kalibracijske krive, veličina fragmenta A procijenjena je na 2.5 kb i fragmenta B na 6.0 kb. (preuzeto i prilagođeno iz Dale i sar., 2012)

S druge strane, nisu sve DNK molekule linearne. Nativni plazmidi su supernamotane cirkularne molekule i ukoliko je plazmid izrezan (npr. jedan od lanaca je prekinut), tada su krajevi slobodni da se rotiraju te on poprima relaksiranu, otvoreno cirkularnu formu. Nadalje, dvolančani lom će za posljedicu imati stvaranje linearne forme plazmida (**Slika 2.7**). Prema tome, prilično je normalno da purificirani plazmid pokaže dva ili tri benda na gelu (to ne znači nužno da je prisutno više od jednog plazmida).

Daljnja komplikacija može se ogledati u mogućem prisustvu dimernih ili multimernih formi plazmida. Relaksirani i supernamotani plazmidi pokazuju različite obrasce relativne mobilnosti i obje su drugačije u odnosu na linearne molekule. Osim ako se plazmidi ne lineariziraju digestijom restrikcijskim enzimima prije same elektroforeze, tada je nužno koristiti poseban supernamotani molekularni marker.



Slika 2.7 Elektroforetska mobilnost formi plazmidne DNK.

Većina RNK molekula jesu jednonančane, s tim da u nekim slučajevima možemo susresti i jednonančane DNK molekule. Imajući ovo u vidu, potrebno ih je posebno razmotriti. Naime, jednonančane nukleinske kiseline pokazuju sklonost ka savijanju u složene sekundarne strukture kako bi uklonile hidrofobne baze iz vodene sredine. Pokretljivost molekule će u velikoj mjeri zavisiti od načina savijanja. Ukoliko želimo dobiti stvarnu sliku njene veličine, moramo se pobrinuti da oстане u razmotanom stanju. Kako bismo to postigli, koristimo **denaturirajuće gelove** koji sadrže denaturirajuće agense kao što su urea ili formaldehid, a koji preveniraju da RNK ili jednonančane DNK molekule formiraju sekundarne strukture.

2.3.2 Gel elektroforeza u pulsirajućem polju

Za razdvajanje hromosoma koristi se **elektroforeza u pulsirajućem polju** (eng. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE). Molekule DNK velike molekularne težine (veće od 20 kb) poredaju se po dužini tokom konvencionalne elektroforeze i migriraju istom pokretljivošću tako da se ne postiže razdvajanje.

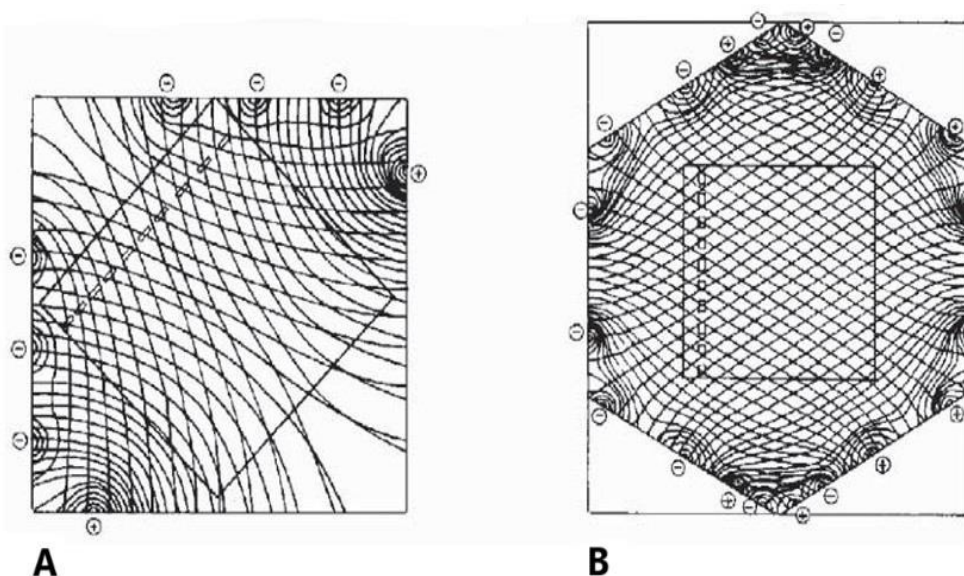
Tokom elektroforeze u pulsirajućem polju, molekule moraju mijenjati svoju orijentaciju s promjenama u električnom polju, a njihova helikalna struktura prvo se rasteže, a zatim steže. "Vrijeme visokoelastične relaksacije" zavisi od molekularne težine. Osim toga, malim molekulama treba manje vremena da se preorijentiraju za razliku od velikih. To znači da nakon ponovnog rastezanja i preusmjeravanja, većim molekulama ostaje manje vremena za stvarnu elektroforetsku migraciju. Rezultirajuća elektroforetska mobilnost stoga zavisi od vremena pulsa ili od trajanja električnog polja: dobiva se razdvajanje prema molekularnoj težini do veličine od 10 Mb. Za kraće fragmente DNK, rezolucija s PFGE-om također je veća nego s konvencionalnom elektroforezom.

Za analizu hromosoma, priprema uzorka uključujući razbijanje stanica, vrši se u blokovima agaroze koji se stavljaju u prethodno oblikovane jažice. Ove bi molekule bile izlomljene silama smicanja (sile koje su različitih pravaca). Za odvajanje se koriste 1,0–1,5% agarozni gelovi. Električna polja trebaju imati ugao od najmanje 110° u odnosu na uzorak. To se postiže, na primjer, nehomogenim poljem s tačkastim elektrodama postavljenim na ortogonalnu konfiguraciju ili homogenim poljem u heksagonalnoj konfiguraciji (**Slika 2.8**). Vrijeme pulsa je ~1s do 90min za ove tehnike, zavisno od dužine DNK molekula koje treba razdvojiti. Velike molekule se bolje separiraju kada je vrijeme pulsa dugo, dok razdvajanje malih molekula zahtijeva kratko vrijeme pulsa. Razdvajanja mogu trajati nekoliko dana.

2.3.3 Preparativna gel elektroforeza

Gel elektroforeza predstavlja važan alat u procesu **purifikacije** fragmenta nukleinske kiseline iz kompleksne mješavine. Nakon razdvajanja uzorka, isti se vizualizira etidij bromidom. Naime, dok je gel još uvijek na transiluminatoru,

bendovi koji trebaju biti purificirani izrežu se žiletom ili skalpelom. DNK se zatim ponovno može dobiti i prečistiti iz fragmenta gela, korištenjem standardnih postupaka purifikacije DNK. Potencijalni problem koji se može pojaviti kod ovakvog pristupa jeste taj da UV zračenje oštećuje DNK uzrokujući stvaranje unakrsnih veza, a što posljedično može smanjiti efikasnost kasnijih procedura kloniranja.



Slika 2.8 Linije polja za dvije vrste PFGE elektroforeze. A: Ortogonalna nehomogena polja; B: Homogeno polje za heksagonalno raspoređene tačkaste elektrode. (preuzeto iz Westermeier., 2016)

Kako bi se reduciralo stvaranje unakrsnih veza, moguće je koristiti nekoliko strategija. Jedna od njih jeste upotreba UV transiluminatora duže talasne dužine koji su manje štetni za DNK, kao i skraćeno vrijeme izlaganja gela UV zračenju. Ipak, procedura koja se sve više koristi jeste ona koja podrazumijeva potpuno uklanjanje potrebe za izlaganjem UV zračenju. U tom smislu, specifične boje kao što je kristal violet omogućavaju vizualizaciju DNK na agaroznom gelu nakon izlaganja normalnoj svjetlosti. Nedostatak takvih boja je da su mnogo manje osjetljive od etidijevog bromida, što znači da je potrebno nanijeti više DNK na gel kako bi se vizualizirala. Međutim, u kontekstu kloniranja gena, potrebne količine DNK obično su unutar raspona koji se lako može vizualizirati ovim bojama.

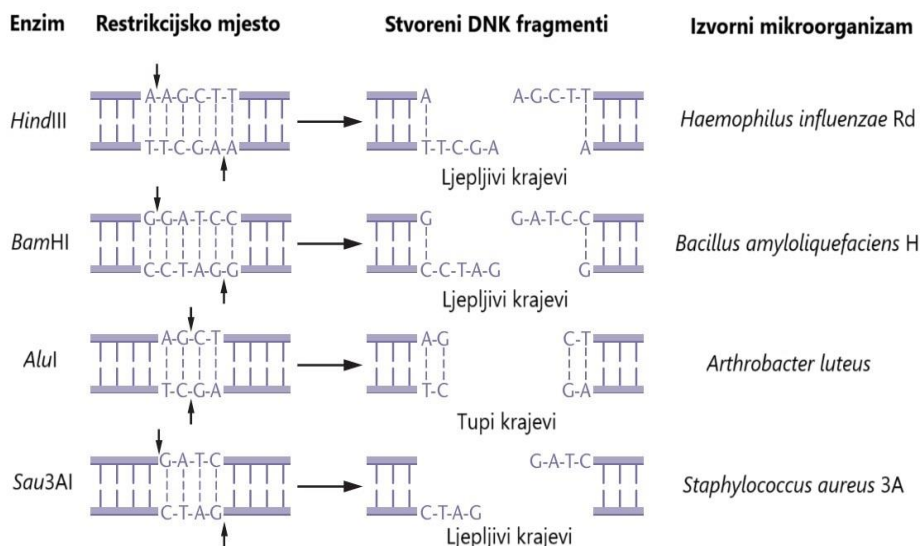
2.4 Restriksijski enzimi

Ključni moment u eksperimentu kloniranja jeste umetanje hromosomske DNK u plazmid ili virusni vektor. U prvom koraku, to zahtijeva isijecanje DNK fragmenata te potom njihovo lijepljenje. Za isijecanje DNK istraživači koriste enzime poznate kao **restriksijske endonukleaze** ili **restriksijski enzimi**. Restriksijske enzime proizvode bakterije kao odbrambeni mehanizam u borbi protiv invazije stranom DNK, posebno onom od strane bakteriofaga.

Na primjer, ograničavanje ili sprječavanje virusne infekcije omogućeno je mehanizmom razgradnje DNK virusa koji vrši invaziju. Restriksijski enzim prepoznaje i veže se za DNK na specifičnoj sekvenci nukleotida koja se naziva **restriksijsko mjesto** (**Slika 2.9**). Enzim zatim siječe oba lanca DNK unutar te sekvence cijepanjem fosfodieterskih veza u DNK molekuli. Naučnici to obično nazivaju "digestijom" DNK. Primjenjivost restriksijskih enzima u kloniranju proizilazi iz njihove sposobnosti da precizno i reproducibilno sijeku genomsku DNK na fragmente. Restriksijski enzimi predstavljaju vrlo sofisticirane molekularne makaze za rezanje DNK na fragmente željene veličine. Restriksijska mjesta su nasumično prisutna u genomu. Enzimi sa sekvencom prepoznavanja koje posjeduju četiri baze kao što je enzim *AluI*, a koji prepoznaje sekvencu AGCT, sjeći će, u prosjeku, svakih 256 parova baza ($4^n = 4^4 = 256$), ukoliko su sva četiri nukleotida prisutna u jednakom omjeru, proizvodeći tako mnogo malih fragmenata. Stvarne veličine fragmenata proizvedenih digestijom DNK sa datim restriksijskim enzimom variraju obzirom da broj i pozicija sekvenci prepoznavanja nisu uvijek nasumično raspoređeni u DNK.

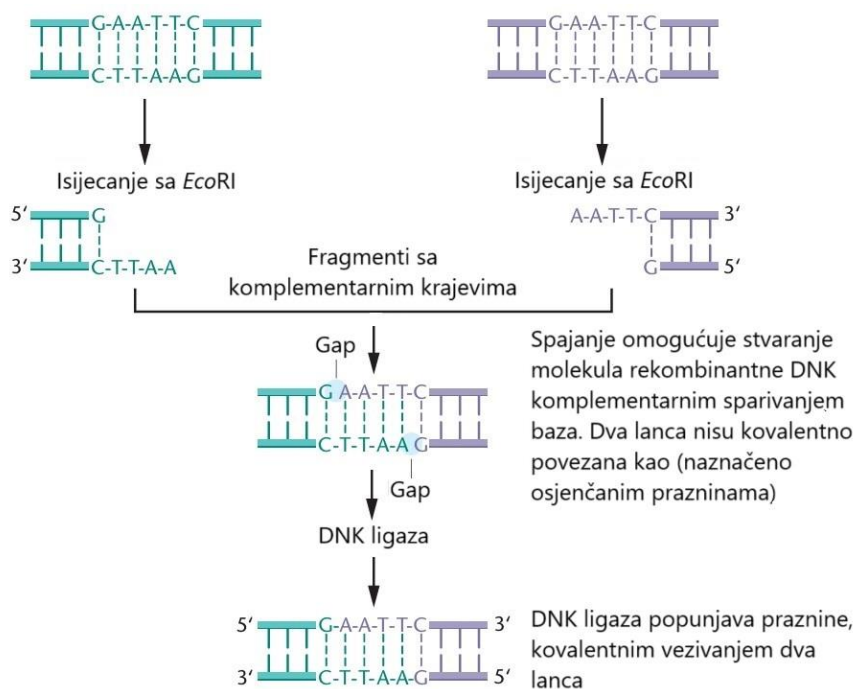
Većina sekvenci za prepoznavanje pokazuje oblik simetrije opisan kao **palindrom**. Zapravo, palindromna sekvenca nukleotida podrazumijeva identično čitanje sekvence na oba lanca DNK, kada se čitanje vrši u smjeru 5'-3'. Svaki restriksijski enzim prepoznaje svoju specifičnu sekvencu prepoznavanja i siječe DNK u karakterističan obrazac isijecanja. Najčešće sekvence za prepoznavanje duge su četiri ili šest nukleotida, ali neke sadrže osam ili više nukleotida. Enzimi kao što su *EcoRI* i *HindIII* sijeku lance DNK sa pomakom, stvarajući tako fragmente s jednostrukim krajevima koji se nazivaju **kohezivnim (ljepljivim) krajevima**, dok drugi enzimi kao što su *AluI*

i *BalI* sijeku oba lanca na istom paru nukleotida, stvarajući DNK fragmente sa dvolančanim krajevima koji se označavaju kao **tupi krajevi**. Četiri uobičajena restrikcijska enzima, njihova restrikcijska mjesta i izvorni mikrobi iz kojih su izolirani prikazani su na **Slici 2.9**.



Slika 2.9 Uobičajeni restrikcijski enzimi sa svojim restrikcijskim mjestima, obrascima isijecanja DNK i izvorima. Strelice označavaju poziciju u DNK izrezanu od strane svakog enzima. (preuzeto i prilagođeno iz Klug i sar., 2012)

Jedan od prvih restrikcijskih enzima koji je identificiran izoliran je iz *Escherichia coli* soja R i označen je kao *EcoRI*. Fragmenti DNK stvoreni *EcoRI* digestijom (**Slika 2.10**) imaju **ljepljive krajeve** jer se mogu spariti s komplementarnim jednonančanim krajevima na drugim DNK fragmentima također izrezanim pomoću *EcoRI*. Kada se pomiješaju, jednonančani krajevi fragmenata DNK iz različitih izvora izrezani istim restrikcijskim enzimom mogu se spojiti zajedno obrazovanjem vodikovih veza između komplementarnih baza u jednonančanim krajevima. Međutim, ova interakcija nije stabilna jer uključuje samo nekoliko vodikovih veza između komplementarnih baza. Osnovno pitanje koje se postavlja jeste kako ovu interakciju učiniti trajnijom? Odgovor je da okosnice šećera-fosfata unutar DNK lanaca moraju biti međusobno kovalentno povezane. Ovo povezivanje katalizira enzim **DNK ligaza** (**Slika 2.10**).



Slika 2.10 DNK iz različitih izvora je isječena sa *EcoRI* i pomiješana kako bi se dozvolilo spajanje. Enzim DNK ligaza formira fosfodiesterne veze između ovih fragmenata kako bi se formirao intaktni rekombinantni DNK molekul. (preuzeto i prilagođeno iz Klug i sar., 2012)

2.5 Insercija DNK fragmenata u vektore i njihovo razmnožavanje unutar stanica domaćina

Nakon što smo se upoznali sa osnovnim materijalima i koracima, sada možemo istaći generalne principe koji se slijede u tipičnom eksperimentu kloniranja. U proceduri prikazanoj na **Slici 2.11**, cilj je klonirati hromosomski gen od interesa u plazmid koji već nosi *amp^R* gen. Za početak ovog eksperimenta, hromosomska DNK se izolira i digestira restrikcijskim enzimom. Ovaj enzim siječe hromosome na mnogo malih fragmenata. Plazmidna DNK je također isječena istim restrikcijskim enzimom. Međutim, plazmid ima samo jedno jedinstveno mjesto za restrikcijski enzim. Nakon isijecanja, plazmid ima dva kraja koja su komplementarna ljepljivim krajevima hromosomskih DNK fragmenata. Digestirana hromosomska DNK i plazmidna DNK se izmiješaju i inkubiraju u uvjetima koji promoviraju vezivanje ovih komplementarnih ljepljivih krajeva. Zatim se dodaje DNK ligaza kako bi katalizirala stvaranje

kovalentne veze između fragmenata DNK. U nekim slučajevima, dva kraja vektora jednostavno se ponovno povezuju, vraćajući vektoru njegovu prvobitnu strukturu. Ovakav vektor se zove **recirkularizirani vektor**. U drugim slučajevima, fragment hromosomske DNK može biti ligiran na oba kraja vektora. Na ovaj način, segment hromosomske DNK je ubačen u vektor. Vektor koji sadrži dio hromosomske DNK naziva se **rekombinantnim vektorom**. Nakon ligacije, DNK se unosi u žive ćelije tretirane agensima koji ih čine propusnima za molekule DNK. Ćelije koje mogu pokupiti DNK iz ekstracelularnog medija nazivaju se kompetentne ćelije. Ovaj korak u proceduri obično se naziva **transformacija** (vidi sekciju 2.7.5). U eksperimentu prikazanom na **Slici 2.11**, plazmid je introducirani u bakterijske ćelije koje su prvobitno bile osjetljive na ampicilin. Bakterije se zatim nanose na ploče koje sadrže medij za rast bakterija i ampicilin. Bakterija koja je pokupila plazmid koji nosi *amp^R* gen nastavlja da se dijeli i formira koloniju bakterija koja sadrži desetine miliona ćelija. Budući da je svaka ćelija unutar pojedinačne kolonije izvedena iz iste izvorne ćelije, sve ćelije unutar kolonije sadrže isti tip plazmidne DNK.

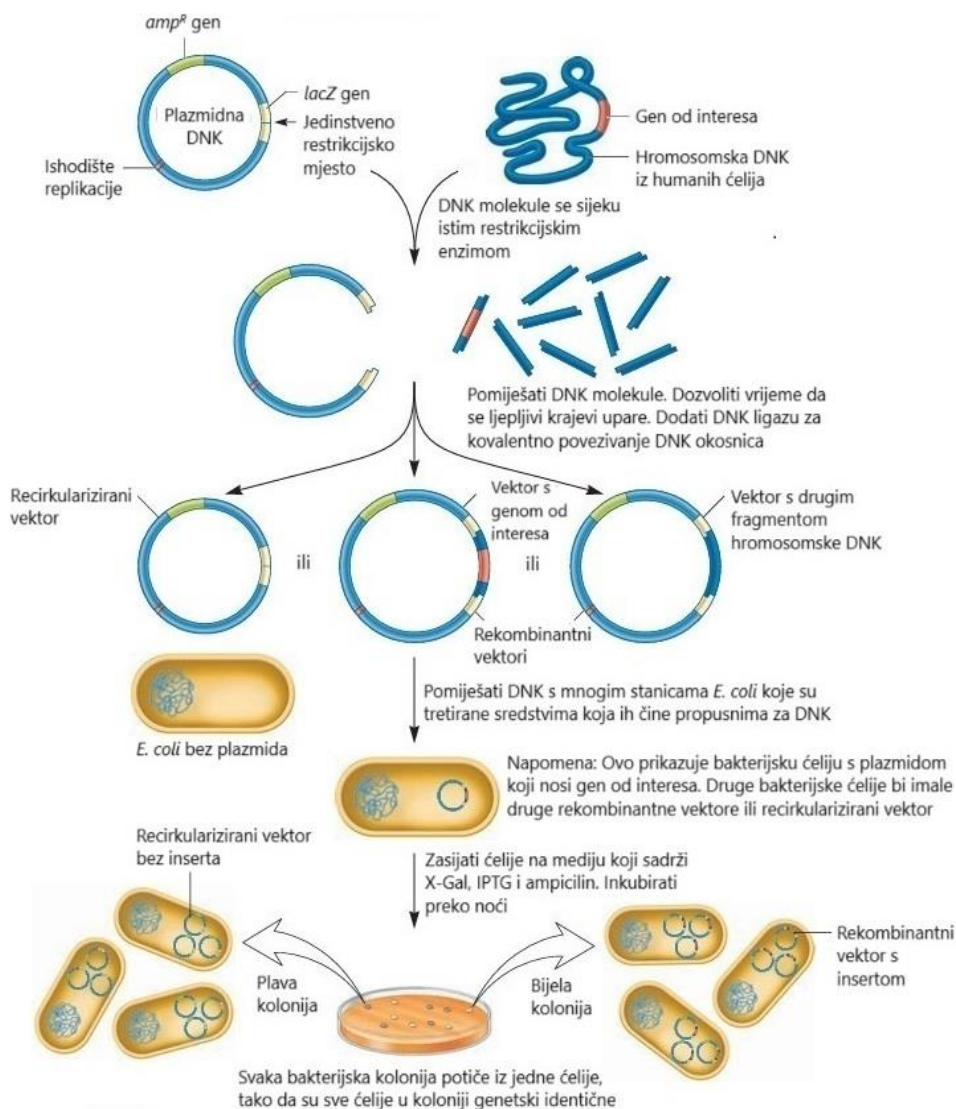
Jedno od osnovnih pitanja jeste kako istraživač može razlikovati kolonije bakterija koje sadrže recirkularizirani vektor od onih s rekombinantnim vektorom koji nosi dio hromosomske DNK? Kao što je prikazano u eksperimentu na **Slici 2.11**, hromosomska DNK je umetnuta u region vektora koji sadrži *lacZ* gen, koji kodira enzim β -galaktozidazu. Insercija hromosomske DNK u vektor remeti *lacZ* gen tako da on više nije u stanju proizvoditi funkcionalan enzim. Poređenja radi, recirkularizirani vektor ima funkcionalni *lacZ* gen. Funkcionalnost *lacZ* se može odrediti dodavanjem u podlogu za rast bezbojnog jedinjenja, X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid), koje β -galaktozidaza cijepa u plavo obojenje. Bakterije uzgojene u prisustvu X-Gal i IPTG (induktor *lacZ* gena) formiraju plave kolonije ako imaju funkcionalan *lacZ* gen i bijele kolonije ako nemaju. U ovom eksperimentu, dakle, kolonije bakterija koje sadrže recirkularizirane vektore formiraju plave kolonije, dok su kolonije koje sadrže rekombinantne vektore bijele. Jedna od bijelih kolonija sadrži ćelije s rekombinantnim vektorom koji nosi humani gen od interesa (segment koji sadrži humani gen prikazan je crvenom bojom). Cilj kloniranja gena je proizvesti veliki broj kopija

rekombinantnog vektora koji nosi gen od interesa. Tokom transformacije jedna bakterijska ćelija obično preuzme pojedinačnu kopiju rekombinantnog vektora. Međutim, dva naknadna događaja dovode do umnožavanja kloniranog gena. Prvo, budući da vektor ima ishodište replikacije, bakterijska ćelija replicira rekombinantni vektor kako bi proizvela mnogo kopija po ćeliji. Drugo, bakterijske ćelije se dijele otprilike svakih 20 minuta. Nakon rasta preko noći dobiva se populacija od nekoliko miliona bakterija. Svaka od ovih bakterijskih ćelija sadrži mnogo kopija kloniranog gena. Na primjer, bakterijska kolonija može se sastojati od 10 miliona ćelija, a svaka ćelija sadrži 50 kopija rekombinantnog vektora. Dakle, ova kolonija bakterija sadržavala bi 500 miliona kopija kloniranog gena.

Prethodni opis prikazuje korake potrebne za kloniranje gena. Ono što se može pogrešno zaključiti sa **Slike 2.11** jeste to da se čini da digestija hromosomske DNK restrikcijskim enzimima daje samo nekoliko fragmenata DNK, od kojih jedan sadrži gen od interesa. Međutim, u stvarnom eksperimentu kloniranja, digestija hromosomske DNK restrikcijskim enzimom proizvodi desetine hiljada različitih dijelova hromosomske DNK, a ne samo njih nekoliko. Tehnologija rekombinantne DNK također se može koristiti za kloniranje fragmenata DNK koji ne kodiraju gene. Na primjer, sekvence kao što su telomere, centromere i visoko repetitivne sekvence su klonirane ovim postupkom.

2.6 Biblioteke su kolekcije kloniranih fragmenata

Dobivanje purificiranog DNK fragmenta iz molekule DNK bilo kojeg organizma dug je i zamoran proces. Ipak, istraživači se ne moraju vraćati na početak svaki put kada trebaju prečistiti novi DNK fragment iz istog organizma. Umjesto toga, mogu kreirati **DNK biblioteku** koja predstavlja kolekciju rekombinantnih vektora. Kada je početni materijal hromosomska DNK, biblioteka se naziva **genomska biblioteka**. Genomska biblioteka predstavlja dugovječnu zbirku ćelijskih klonova koja sadrži kopije svake sekvence u cijelom genomu umetnute u odgovarajući vektor. Poput tradicionalnih biblioteka knjiga, genomske biblioteke pohranjuju velike količine informacija koje su dostupne za preuzimanje kada se za takvo nešto ukaže potreba.



Slika 2.11 Koraci u kloniranju gena. X-Gal se odnosi na bezbojni spoj 5-brom-4-hlor-3-indolil- β -d-galaktozid. IPTG je akronim za izopropil- β -d-tiogalaktopiranozid, koji je nemetabolizirajući analog laktoze koji može inducirati *lac* promotor. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2024)

Zapravo, one omogućuju pokretanje novog procesa kloniranja u naprednoj fazi, kada je početni korak konstrukcije rekombinantne DNK već dovršen i jedini težak zadatak koji preostaje je odrediti koji od mnogih klonova u biblioteci sadrži DNK sekvencu od interesa. Jednom kada je određeni ćelijski klon identificiran, može se amplificirati kako bi se dobila velika količina

željenog genomskog fragmenta. Ako digestiramo genom jedne ćelije restrikcijskim enzimom i ligiramo svaki fragment u vektor sa 100% učinkovitosti, a zatim transformiramo sve te rekombinantne DNK molekule u ćelije domaćina također sa 100% učinkovitosti, rezultirajući set klonova bi predstavljao cijeli genom u fragmentiranom obliku. Hipotetska kolekcija ćelijskih klonova koja uključuje jednu i samo jednu kopiju svake sekvence u cijelom genomu bila bi pojedinačna **kompletna genomska biblioteka**. Pitanje koje se opravdano može postaviti jeste, koliko je klonova prisutno u ovakvoj hipotetskoj biblioteci? Ako smo započeli s 3.000.000 kb DNK iz haploidne ljudske sperme i pouzdano je isjekli u seriju restrikcijskih fragmenata od 100 kb, generirali bismo $3.000.000/100 = 30.000$ genomijskih fragmenata. Kada bismo svaki od ovih fragmenata stavili u BAC vektore za kloniranje koji su zatim transformirani u stanice domaćina *E. coli*, stvorili bismo savršenu biblioteku od 30.000 klonova koji zajedno nose svaki lokus u genomu. Broj klonova u ovoj savršenoj biblioteci definira **genomski ekvivalent**. Kako bismo pronašli broj klonova koji čine jedan genomijski ekvivalent za bilo koju biblioteku, jednostavno podijelimo dužinu genoma (ovdje 3.000.000 kb) s prosječnom veličinom inserta koje nosi vektor (u ovom slučaju 100 kb).

Ipak, u stvarnosti je nemoguće dobiti savršenu biblioteku. Svaki korak kloniranja daleko je od 100% učinkovitosti, a DNK jedne ćelije ne osigurava dovoljno sirovog materijala za proces. Istraživači stoga moraju prikupiti DNK iz miliona ćelija u određenom tkivu ili organizmu. Ako napravimo genomsku biblioteku s ovom DNK, prikupljanjem samo jednog genomskog ekvivalenta (30.000 klonova za humanu biblioteku u BAC vektorima), tada će se slučajno neki humani fragmenti DNK pojaviti više puta, dok drugi uopće neće biti prisutni. Uključivanje četiri do pet genomijskih ekvivalenata proizvodi prosječno četiri do pet klonova za svaku regiju (lokus) genoma i 95% vjerojatnosti da će bilo koji pojedinačni lokus biti prisutan barem jednom.

Također je uobičajeno da istraživači kreiraju **cDNK biblioteku** koja sadrži rekombinantne vektore s insertima cDNK. Budući da se cDNK proizvodi iz zrele mRNK putem reverzne transkriptaze, nedostaju joj introni. cDNK biblioteku je bilo moguće napraviti jer su istraživači željeli eksprimirati kodirani protein od interesa u ćeliji koja ne bi pravilno izdvojila introne. Kao

što je već spomenuto, cDNK se prvo stvara putem reverzne transkriptaze. Za umetanje cDNK u vektore, kratki oligonukleotidi koji se nazivaju **linkeri** su pričvršćeni na cDNK putem DNK ligaze. Linkeri sadrže sekvence DNK s jedinstvenim mjestom za restrikcijski enzim. Nakon što se linkeri pričvrste na cDNK, cDNK i vektori se sijeku restrikcijskim enzimima i zatim povezuju jedan s drugim. Ovo stvara biblioteku cDNK.

2.7 Plazmidni vektori

Plazmidi su često korišteni, versatilni vektori s kojima je moguće lako manipulirati. Nalaze se u većini bakterijskih vrsta kao ekstrahromosomalne DNK molekule, koje su najčešće cirkularne, dvolančane i super-spiralizirane. Plazmidi se značajno razlikuju po veličini, od onih koji posjeduju nekoliko hiljada baznih parova, do onih koji su veličine nekoliko stotina kilobaza. Oni su genetički homogeni, konstantne monomerske veličine i repliciraju se neovisno od hormosoma. Ipak, plazmidi koji se koriste kao vektori u kloniranju gena su uglavnom mali (2-5 kb). Većina često korištenih plazmidnih vektora je zasnovana na plazmidu pod imenom ColE1 koji se prirodno pojavljuje kod *E. coli*. Ovaj plazmid specificira produkciju baktericina (kolicin E1), te nosi gene koji determiniraju imunitet ćelije domaćina na kolicin E1. Sama riječ „prirodni“ plazmid indicira da on nije svrsishodno konstruiran in vitro. Najpoznatija odlika plazmida stoji u vezi sa njihovom mogućnosti za diseminiranje gena za antibiotsku rezistenciju. Ipak, potrebno je naglasiti da plazmidi koji se koriste za kloniranje gena gotovo nikada nemaju mogućnost širenja iz jedne bakterije u drugu, te postoje ograničenja eksperimentalnih procedura s ciljem sprečavanja dodavanja novih gena za rezistenciju klinički važnim patogenim bakterijama tokom eksperimenta. Antibiotika rezistencija ne predstavlja ograničenje mogućnosti plazmida, niti je razlog njihovog postojanja. Brojni plazmidi prirodnog porijekla kodiraju za druge odlike, iako se ponekad čini da ih je teško dovesti u vezu sa nekom očiglednom karakteristikom. Plazmidi postoje zbog toga što se mogu replicirati unutar bakterija, i ponekad širiti iz jedne bakterije u drugu. Sa tog stanovišta, plazmidi predstavljaju svojevrsne parazite DNK. Svaka prednost koju pružaju bakteriji domaćinu predstavlja dobru okolnost za sam plazmid koji na taj način opstaje tj. preživljava. Postoje dva osnovna tipa

plazmida: **konjugativni** i **nekonjugativni**, koji se razlikuju u odnosu na to da li nose set transfer gena (*tra* geni), koji omogućavaju bakterijsku konjugaciju. *Tra* region posjeduje gene koji kodiraju proteine uključene u DNK transfer i replikaciju, kao i brojne druge. Prisustvo *tra* regiona u plazmidu može imati važnu ulogu ukoliko dođe do integracije plazmida u hromosom. U tom slučaju, plazmid može mobilizirati hromosomsku DNK, koja se potom može transferirati iz ćelije u ćeliju. Nadalje, plazmidi se mogu podijeliti i na višekopijske (relaksirane) plazmide koji su prisutni u ćeliji sa više kopija, te nerelaksirane (stringentne) plazmide koje karakteriše ograničen broj kopija. Na primjer, *Borrelia burgdorferi* (uzročnik Lajmske bolesti) posjeduje 17 različitih cirkularnih i linearnih plazmida. Mogućnost dva različita plazmida da se repliciraju unutar iste ćelije je kontrolirana plazmidnim genima koji reguliraju DNK replikaciju. Ukoliko se plazmid transferira u ćeliju koja već posjeduje drugi plazmid, drugi plazmid može biti izgubljen tokom subsekventnih replikacija. Ukoliko se ovo dogodi, dva plazmida postaju „**inkompatibilna**“. Poznat je veliki broj grupa inkompatibilnosti (Inc). Plazmidi koji pripadaju istoj Inc grupi isključuju jedan drugog iz replikacije u istoj ćeliji, ali mogu koegzistirati sa plazmidima iz drugih grupa. Plazmidi svake Inc grupe dijele zajedničke mehanizme reguliranja replikacije i stoga su povezani jedan sa drugim. Stoga, iako bakterija može sadržavati različite tipove plazmida, svaki je genetički različit.

2.7.1 Replikacija plazmida

Gotovo svi plazmidi se sastoje od dvolančane DNK. Većina ih je cirkularna, ali poznati su i linearni plazmidi. Većina plazmidne DNK izolirane iz ćelija je super spiralizirane konfiguracije, što je ujedno i najkompaktnija forma u postojanju DNK unutar ćelije. Enzimi potrebni za replikaciju plazmida su normalni ćelijski enzimi. Stoga, geni koji se nalaze na samom plazmidu su povezani sa kontrolom inicijacije replikacije i particije repliciranih plazmida između kćerki ćelija. Mogućnost repliciranja plazmida koristi se u genetičkom inženjerstvu jer omogućava inserciju dijelova DNK koji se potom kopiraju kao dio plazmida, a potom prenose na potomstvo tokom diobe ćelije. Stoga se fundamentalnom odlikom plazmida smatra njihova mogućnost da se repliciraju unutar bakterijskog domaćina. Kod jednostavnijih plazmida, većina

ili svi enzimi i drugi produkti potrebni za replikaciju su već prisutni u ćeliji domaćinu; količina informacija koju mora obezbijediti plazmid je svega nekoliko stotina baznih parova. Ovaj region plazmida koji je potreban za replikaciju se generalno označava kao **ishodište replikacije** (eng. *origin of replication, ori*), iako je konkretno ishodište, odnosno mjesto na kojem replikacija počinje zapravo jedna specifična baza.

Većina plazmida kod Gram-negativnih bakterija replicira se na sličan način, koji uključuje inicijaciju na ishodištu replikacije i bidirekcionu replikaciju oko prstena čime nastaje teta-intermedijer. Ipak, neki plazmidi imaju unidirekcionu replikaciju, sa jednom replikacijskom viljuškom. S obzirom na malu količinu plazmidne DNK u poređenju sa hromosomom, plazmidi se repliciraju brzo, otprilike za jednu desetinu vremena potrebnog za ciklus ćelijske diobe. Najveći broj plazmida kod Gram-pozitivnih bakterija replicira se mehanizmom kotrljajućeg prstena, koji podrazumijeva jednolančani intermedijer.

Plazmidi koji koriste ishodište replikacije od ColE1 ili njegovih srodnika su poznati pod imenom više-kopijski plazmidi. Divlji tip ColE1 je prisutan u oko 15 kopija po stanici, ali većina inženjersanih vektora koji se danas koriste prisutna je u velikom broju i može ih biti i nekoliko stotina kopija po ćeliji. Ovo je na određeni način pogodno jer olakšava purificiranje velike količine plazmida, s obzirom da postoje višestruke kopije unutar svake bakterije. Nadalje, ukoliko je potrebno eksprimirati klonirani gen, prisustvo njegovih brojnih kopija vodi ka većem nivou genskog produkta. Ipak, ova činjenica može biti i nepovoljna. Naime, čak i bez ekspresije kloniranog gena, velika količina plazmidne DNK koja se treba replicirati u bakteriji domaćinu može usporiti rast ćelije. Taj učinak ne mora biti veliki, ali može dovesti do nestabilnosti, s obzirom da će svaka ćelija koja je izgubila plazmid prerasti one koje ga i dalje posjeduju. Ovo će se dodatno zakomplicirati i predstavljati otežavajuću okolnost ukoliko je klonirani gen ili njegov produkt na bilo koji način štetan po bakteriju. U ekstremnim slučajevima, može biti veoma teško izolirati željeni klon. Stoga je za neke osobite svrhe poželjno koristiti alternativne vektore koji postoje u manjem broju kopija ili čak koristiti potpuno drugačiji tip vektora. Neki plazmidi se mogu replicirati u širokom spektru bakterijskih vrsta, ali većina onih koji se koriste za kloniranje gena

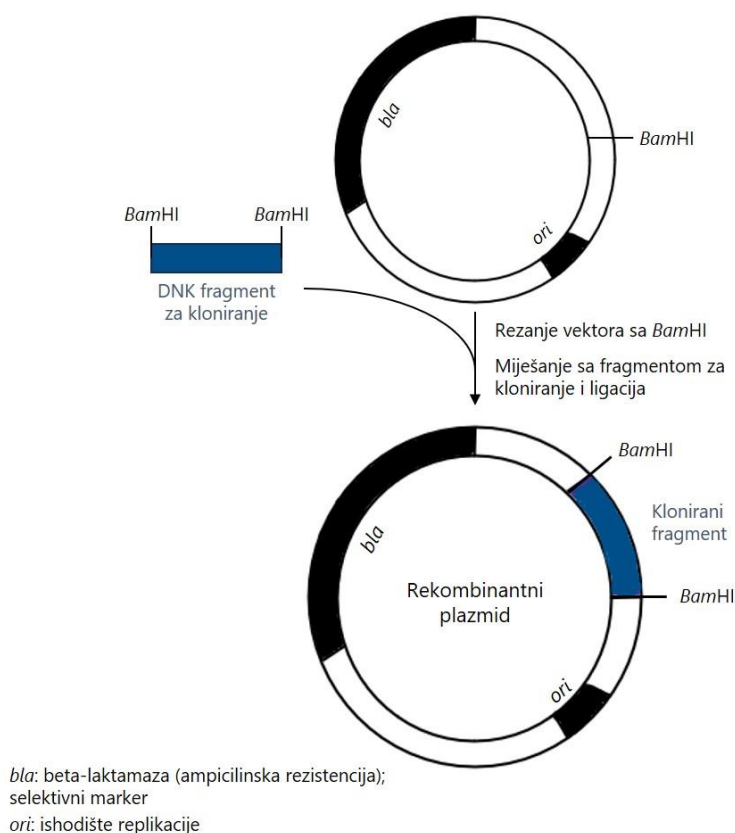
imaju ograničen raspon domaćina. S jedne strane ovo je korisno, ukoliko postoji bilo kakav zdravstveni rizik ili opasnost po okoliš koji bi bili povezani sa kloniranjem specifičnog fragmenta DNK, onda korištenje plazmida sa uskim spektrom domaćina sprečava mogućnost prenosa gena u druge organizme. S druge strane, ukoliko je potrebno učiniti genetičke manipulacije u nekoj drugoj bakteriji, a ne *E. coli*, osobito ako postoji interes za istraživanjem bihevioralnih odlika određene bakterije, onda je potrebno izolirati ili konstruisati novi plazmidni vektor, koji bi bio zasnovan na ishodištu replikacije koji je funkcionalan u odabranoj vrsti. Spektar domaćina novog vektora će vjerovatno biti ograničen i takav vektor ne mora imati sposobnost repliciranja u *E. coli*. Ovo jeste svojevrsni nedostatak, jer uglavnom postoji potreba za korištenjem *E. coli* kao intermedijernog domaćina za inicijalno kloniranje i istraživanje strukture i ponašanja kloniranog gena. Ipak, moguće je insertovati dva ishodišta replikacije u plazmid, te je onda zagarantovana mogućnost replikacije u *E. coli* korištenjem jednog ishodišta, odnosno u drugom odabranom domaćinu korištenjem alternativnog ishodišta replikacije. Ovakvi vektori se mogu koristiti čak i za transfer kloniranih gena između *E. coli* i aukariotskog organizma. Stoga, prva i najvažnija odlika plazmida kao klonirajućih vektora je ishodište replikacije.

2.7.2 Klonirajuća mjesta

Druga važna osobina vektora je **klonirajuće mjesto**, odnosno mjesto gdje će biti insertovan novi DNK fragment. Naravno, to mjesto mora biti locirano na regiji plazmida koja nije esencijalna za replikaciju ili bilo koju drugu potrebnu funkciju. Sadržavat će jedinstveno mjesto na kojem će djelovati restrikcijski enzimi (enzim će presjeći plazmid samo jednom).

Ukoliko je cirkularna molekula presječena na jednoj poziciji, konvertuje se u linearnu molekulu i relativno je jednostavno spojiti krajeve s ciljem nastanka intaktnog kruga. Ukoliko ipak enzim napravi više od jednog reza, plazmid će biti isječen na dva ili više dijelova, a njihovo ponovno spajanje ispravnim redoslijedom s ciljem nastanka intaktnog plazmida može biti neučinkovito. Ukoliko vektor posjeduje više od jednog klonirajućeg mjesta, bit će teško insertovati više od jednog fragmenta. Na primjer, ukoliko se insertuje *Bam*HI fragment na mjesto vektora koji je presječen sa restrikcijskom

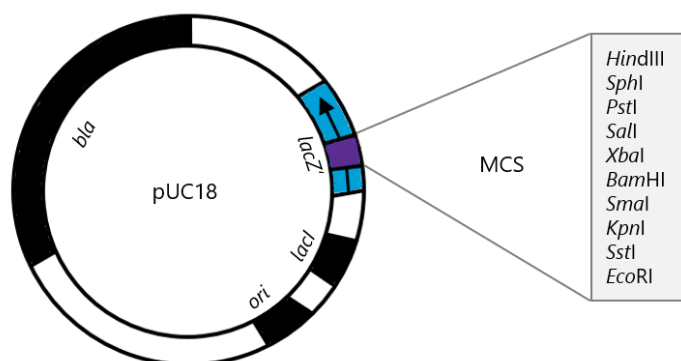
endonukleazom *Bam*HI, rezultirajući rekombinantni plazmid će imati dva *Bam*HI mjesta: po jedan na svakom kraju insertovanog fragmenta (**Slika 2.12**). S obzirom da rekombinantni plazmid tada ima dva *Bam*HI mjesta, bilo bi teško u njega dalje klonirati *Bam*HI fragmente.



Slika 2.12 Kloniranje sa plazmidnim vektorom.

Problem leži u tome da u većini slučajeva postoji potreba za insercijom nekoliko fragmenata u isti plazmid. Na primjer, kombiniranje signala ekspresije jednog gena sa kodirajućom regijom drugog ili recimo insercija dodatnih markera koji se mogu koristiti za identifikaciju prisustva plazmida. Najbolje rješenje za prevazilaženje ovih problema je kreiranje višestrukih klonirajućih mjesta (eng. *Multiple Cloning Site*, MCS), tj. kratkih DNK regija koje posjeduju mjesta prepoznavanja za veći broj različitih enzima. Ova restrikcijska mjesta će se uglavnom pojaviti jednom unutar cijelog plazmida, što znači da su unikatna tom klonirajućem mjestu, a što povećava njihovu

upotrebljivost kao mjesta za inserciju DNK. MCS se originalno kreiraju sintezom kratkog dijela DNK sa željenim restriksijskim mjestima, te insercijom u plazmid na uobičajeni način. Na **Slici 2.13** prikazana je struktura pUC18, plazmida koji se često koristi kao klonirajući vektor, te je vidljivo da pUC18 posjeduje višestruko mjesto kloniranja. Insercija fragmenta u *Bam*HI mjesto (**Slika 2.14**) će i dalje omogućiti odabir drugih dostupnih mjesta za buduće insercije.



bla: beta-laktamaza (ampicilinska rezistencija); selektivni marker
ori: ishodište replikacije
lacZ': beta-galaktozidaza (parcijalni gen)
lacI: represor *lac* promotora

Slika 2.13 Struktura plazmidnog klonirajućeg vektora pUC18.

2.7.3 Selektivni markeri

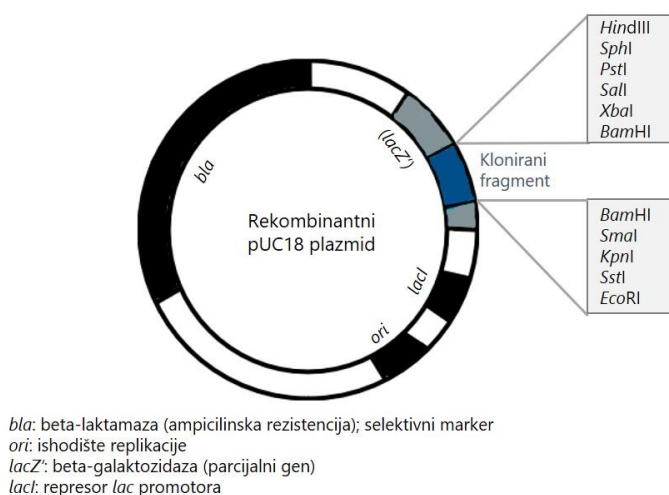
Još jedna osobina koja je esencijalna za funkcionalan vektor je **selektivnost markera**. Potreba za pomenutim dolazi od neučinkovitosti transformacije bakterija. Čak i sa visoko učinkovitim sistemima koji su danas dostupni za *E. coli*, najveći rezultat dobijen korištenjem native plazmidne DNK implicira da je svega oko 1% bakterijskih stanica zapravo preuzelo DNK. U praksi je ovo još rigoroznije, osobito ako se koristi neki drugi domaćin osim *E. coli*. Stoga, s ciljem postizanja obnavljanja transformiranih klonova, potrebno je prevenirati rast netransformiranih ćelija (onih ćelija koje nisu preuzele plazmid). Prisustvo gena za rezistenciju na antibiotike na plazmidnom vektoru znači da će transformacijski miks biti zasijan na agar ploče koje sadrže relevantni antibiotik, pa će samo transformanti imati mogućnost rasta. Na **Slici 2.13** vidljivo je da pUC18 nosi beta-laktamazni gen (*bla*) koji kodira za enzim koji

hidrolizira beta-laktamske antibiotike kao što je ampicilin (zbog čega se često označava kao Amp^R, zbog rezistencije na ampicilin).

2.7.4 Insercijska inaktivacija

Na **Slici 2.13** prikazana je još jedna korisna odlika pUC18, a to je višestruko klonirajuće mjesto na 5' kraju beta-galaktozidaznog gena (*lacZ'*). Sintetski oligonukleotid koji kreira MCS je dizajniran tako da ne utiče na okvir čitanja *lacZ* gena, samo rezultira produkcijom beta-galaktozidaze sa nekim dodatnim aminokiselinama blizu amino-terminalnog kraja proteina. Ovo ne utiče na funkciju enzima, koji je i dalje sposoban za hidrolizu laktoze.

Moguće je lako detektovati aktivnost beta-galaktozidaze zasijavanjem organizma na hranjivu podlogu koja sadrži hromogeni supstrat X-gal, skupa sa inducirajućim agensom izopropil tiogalaktozidom (IPTG). X-gal supstrat je neobojen, ali aktivnost beta-galaktozidaze oslobađa dio boje, što rezultira zagasito plavim obojenjem. Kolonije koje posjeduju pUC18 su stoga plave kada porastu na ovom mediju. Ipak, ukoliko su uspješno insertovani DNK fragmenti na klonirajuće mjesto, ovaj gen će biti uzurpiran (**Slika 2.14**) i rezultirajuća *E. coli* neće biti u mogućnosti da utilizira X-gal, što rezultira bakterijskim kolonijama koje su bijele, odnosno karakteriše ih odsustvo plavog obojenja.



Slika 2.14 Rekombinantni plazmid nastao korištenjem klonirajućeg vektora pUC18. Gen *lacZ* je uzurpiran insercijom DNK fragmenta, što rezultira bijelim kolonijama na X-gal pločama.

Prednost ove insercijske inaktivacije je ta da je moguće ustanoviti da su stanice transformirane plazmidom (jer rastu u prisustvu ampicilina), ali i to da je plazmid rekombinant. Insercijski inaktivacijski marker kao ovaj nije esencijalna odlika klonirajućeg vektora, ali predstavlja pogodan način za praćenje uspjeha ligacijske strategije i prevazilaženje ranije spomenutih poteškoća. Nadalje, potrebno je naglasiti da insercijska inaktivacija nije u potpunosti pouzdana. Ukoliko je insertovani dio relativno mali, i ukoliko sadrži višestruke tri baze, transkripcija i translacija *lacZ* gena se i dalje može desiti, a enzim i dalje može imati dovoljno aktivnosti da producira plavu boju koja se detektuje. S druge strane, bijela kolonija nije garancija uspješnog kloniranja s obzirom na to da delecija čak i samo jedne baze na klonirajućem mjestu ili insercija neželjenih fragmenata može postaviti *lacZ* gen u pogrešan okvir čitanja i samim tim ga inaktivira.

2.7.5 Transformacija

Bakterijska transformacija je otkrivena 1928. godine kada je Fred Griffith demonstrirao da kulture pneumokoka (*Streptococcus pneumoniae*) koje su izgubile virulentnost mogu povratiti patogenost dodavanjem ekstrakta mrtvog virulentnog soja. Naknadno je identificirano da je **transformirajući princip** DNK molekula, što je razriješilo pitanja o hemijskoj prirodi genetičkog materijala. Ovaj eksperiment počiva na prirodnoj sposobnosti pneumokoka da preuzmu „golu“ DNK iz svog okruženja, što se označava kao **kompetencija**. Kompetencija je regulirana kod većine prirodno transformabilnih bakterija, a specijalni proteini učestvuju u preuzimanju i obradi DNK. Ovi kompetencijski-specifični proteini uključuju membranski DNK-vezujući protein, autolizin ćelijskog zida i različite nukleaze.

Na primjer, kod *Bacillus subtilis* (vrsta koju je lako transformirati), prirodna kompetencija je regulirana *quorum-sensing* sistemom. Čelije proizvode male peptide tokom rasta, a akumulacija ovih peptida u visokoj koncentraciji inducira ćelijsku kompetenciju. Kod roda *Bacillus*, oko 20% ćelija u kulturi postaje kompetentno i takve ostaju nekoliko sati. S druge strane, kod roda *Streptococcus*, 100% ćelija može postati kompetentno, ali samo tokom kratkog perioda tokom ciklusa rasta. Dakle, iako veliki broj bakterija ispoljava prirodnu kompetenciju, u samoj praksi genetičkog inženjerstva

javljaju se ograničenja u tom smislu. *E. coli* na primjer ne ispoljava prirodnu kompetenciju. Stoga je neophodno razviti alternativne načine introdukcije plazmidne DNK u bakterijsku ćeliju. Iako se ove metode značajno razlikuju, i dalje se sve označavaju kao transformacija, što je definirano kao preuzimanje „gole“ DNK molekule, kako bi se razlikovalo od drugih metoda horizontalnog genskog transfera kod bakterija, odnosno konjugacije (direktan transfer koji podrazumijeva fizički kontakt ćelija) i transdukcije (prenos posredovan bakteriofagima).

Jedno od važnih otkrića stoji u vezi sa demonstracijom da kompetencija kod *E. coli* može biti inducirana ispiranjem sa ledenim kalcij-hloridom, za čim slijedi dodavanje plazmidne DNK i izlaganje mješavine na kratki temperaturni šok (oko 42 °C). Ipak, ovaj proces je bio prilično neučinkovit, sa prinosom od oko 10⁴ transformanata na mikrogram čiste, super spiralizirane plazmidne DNK. Danas, zahvaljujući tehničkim unapređenjima sistema i selekcijom poboljšanih sojeva *E. coli*, moguće je postići frekvencije transformacije u omjeru od 10⁹ transformanata na mikrogram plazmidne DNK. Generalno, transformacija se najbolje odvija uz male nivoe DNK, odnosno sa povećanjem DNK ne dolazi do proporcionalnog povećanja broja transformanata.

Istina, ligacija se najbolje obavlja sa velikom koncentracijom DNK, ali naredni korak, transformacija, kao što je navedeno najbolja je sa malim količinama DNK. Zbog toga se koristi mala količina ligacijske mješavine u koraku transformacije. Ukoliko je uistinu potreban veliki broj transformanata, obično je bolje izvesti nekoliko odvojenih manjih transformacija. Transformacija zasnovana na induciranoj kompetenciji i toplotnom šoku može se koristiti i za druge bakterije osim *E. coli*, ali se tada gube sve prednosti stečene optimizacijom uslova transformacije za odabrane sojeve *E. coli*. Stoga, transformacija može biti neučinkovita i postoji interes za manipulacijom drugih bakterijskih vrsta kako bi se razvili alternativni metodi transformacije.

Elektroporacija je najčešća procedura procesa transformacije. Bakterijske ćelije isprane vodom s ciljem odstranjivanja elektrolita iz hranjivog medija, miješaju se sa DNK i izlažu kratkom pulsu elektriciteta visoke voltaže. Ovo stvara privremene rupe u staničnoj ovojnici kroz koje DNK može ući. Ćelije se nakon toga diluiraju u mediju za obnavljanje, te presijavaju na selektivnu

podlogu. Mogućnost DNK da difunduje kroz nastale rupe posredstvom električnog pulsa nije specifično svojstvo samo za tu molekulu. Druge supstance, osobito RNK i proteini, također mogu biti intrudicirane u bakterijske ćelije elektroporacijom. Nadalje, ni smjer kretanja nije strogo specifičan i zbog toga materijal može difundovati iz ćelije, zbog čega se ova procedura koristi za izolaciju plazmidne DNK iz bakterija. Iz ovoga slijedi da s obzirom na to da plazmid koji izlazi iz ćelije može da uđe u drugu, elektroporacija se može koristiti i za transfer plazmida iz jednog soja u drugi. Elektroporacija je brz proces i funkcioniра kod najvećeg tipa ćelija, uključujući prokariotske ćelije bakterija i arheja, ali i eukariotske ćelije gljivica i biljaka.

2.8 Vektori zasnovani na lambda bakteriofagu

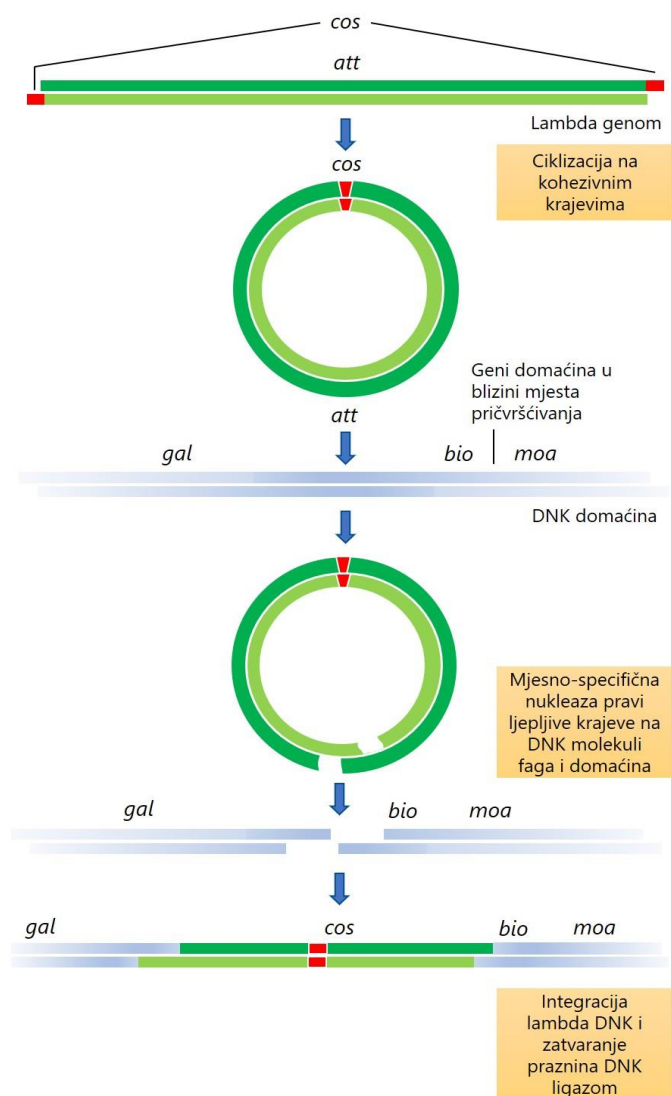
Vektori izvedeni iz bakteriofaga lambda se često koriste za početnu izolaciju genomske DNK ili cDNK iz eukariotskih stanica. Iz lambda vektora za kloniranje uklanjaju se dijelovi genoma bakteriofaga koji nisu nužni za umnožavanje virusa, a zamijenjeni su jedinstvenim restriktivnim mjestima za ugradnju klonirane DNK. Veličina fragmenta DNK koji je moguće ugraditi u takve vektore je ograničena na oko 15 kb, zbog nužnosti pakovanja takvog rekombinantnog genoma u čestice faga. Rekombinantne vektore koji sadržavaju specifični gen od interesa moguće je identificirati hibridizacijom nukleinskih kiselina ili drugim metodama pretraživanja.

2.8.1 Biologija lambda faga

Plazmidni vektori najbolje funkcioniraju ukoliko se vrši kloniranje relativno malih fragmenata DNK. Iako vrlo vjerovatno ne postoji striktno ograničenje u veličini DNK fragmenta koji može biti insertovan u plazmid, rekombinantni plazmid može postati nestabilan sa velikim DNK insertima, što dovodi do redukcije učinkovitosti samog procesa transformacije. Vektori zasnovani na bakteriofagu lambda omogućavaju učinkovito kloniranje većih fragmenata, što je važno u kreiranju genskih biblioteka.

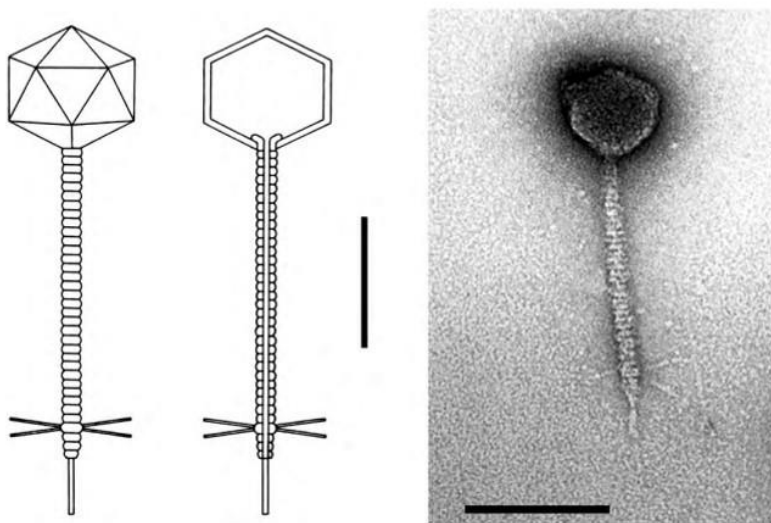
Prema Međunarodnom Komitetu za taksonomiju virusa (eng. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), lambda fag pripada porodici Siphoviridae, rodu „Lambda-like viruses“, a tipska vrsta je *Enterobacteria phage lambda*. Prema Baltimore klasifikacijskom sistemu, ovi virusi pripadaju

grupi I, što znači da njihov genom predstavlja dvolančana DNK. Na 5' kraju svakog lanca DNK nalazi se jednolančana regija dužine 12 nukleotida. Ovi jednolančani krajevi su kohezivni i komplementarni, odnosno prilikom ulaska DNK faga u ćeliju domaćina dolazi do sparivanja baza i nastanka tzv. *cos* mjesta (**Slika 2.15**). Potom se odvija ligacija DNK i nastaje dvolančani prsten.



Slika 2.15 Integracija lambda DNK u genom domaćina. *att*: mjesta prihvatanja; *gal* operon: utilizacija galaktoze; *bio* operon: sinteza biotina; *moa* operon: kofaktor sinteze molibdena.

Glava faga je ikozaedralne simetrije, sa dijametrom oko 60 nm i sastoji se od 72 kapsomere (60 heksamera i 12 pentamera). Rep je fleksibilan, dimenzija 150×8 nm, te posjeduje kratko terminalno vlakno i četiri duge povezane niti smještene subterminalno (**Slika 2.16**). Kod većine laboratorijskih sojeva faga ova vlakna nisu prisutna.



Slika 2.16 *Enterobacteria fag lambda*. Lijevo: reprezentativni dijagram virusne čestice; Desno: snimak čestice lambda faga na elektronskom mikroskopu uz negativno bojenje; Linija odgovara 100 nm. (preuzeto iz King i sar., 2012)

Genom lambda faga je veličine 48.503 bp, na što otpada oko 54% od ukupne težine čestice. Udio GC baznih parova u DNK molekuli je 52%. Virion posjeduje oko 14 strukturnih proteina (11-130 kDa), uključujući 415 kopija svakog glavnog kapsidnog proteina (proteini E i D, veličine 38 kDa i 11 kDa). Prisustvo lipida i ugljikohidrata kod ovih virusa nije potvrđeno. Genom uključuje oko 70 gena i kao što je navedeno, posjeduje ljepljive (kohezivne) krajeve. Infektivna DNK faga cirkularizira i potom se ili replicira ili integriše u genom domaćina, o čemu će biti riječi u nastavku teksta. Transkripcija počinje u regiji imunosti i nastavlja u tri talasa. Replikacija DNK je **bidirekciona** (teta-struktura) i počinje na jednom mjestu, a slijedi je unidirekciona replikacija mehanizmom kotrljajućeg prstena. Ovi bakteriofagi su **umjereni** (temperirani) i specifični za enterobakterije. Pojedine vrste se razlikuju na osnovu različite kombinacije alela gena koji kodiraju proteine glave, homolognih

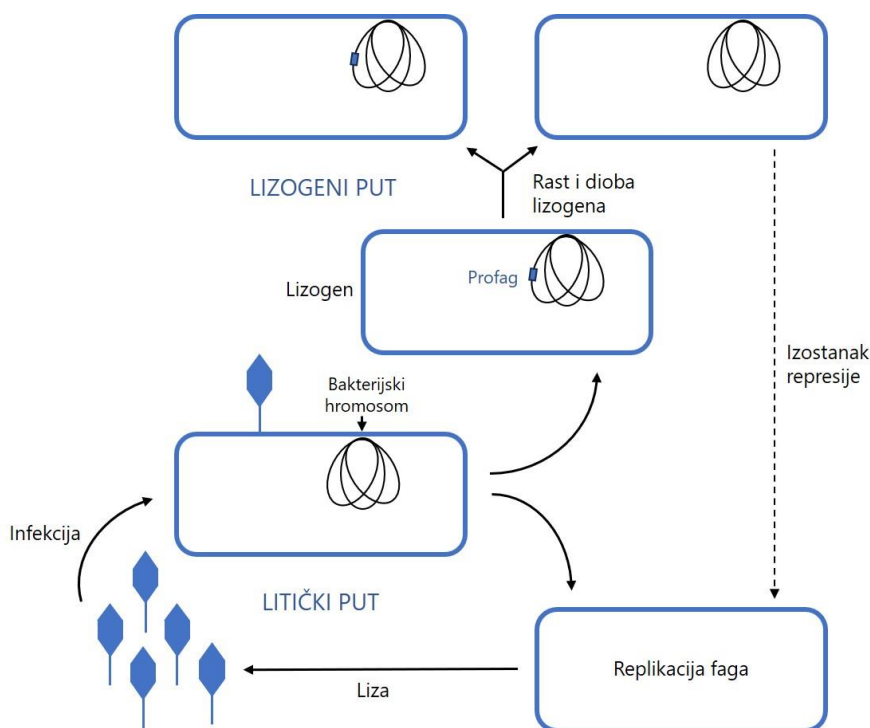
rekombinacijskih proteina i proteina DNK replikacije, ali sve u kontekstu veoma slične organizacije genoma. Sam naziv „umjereni fagi“ označava mogućnost virusa da ostvare stabilnu genetičku vezu sa domaćinom, za razliku od virulentnih faga koji ubijaju ćelije domaćina kroz litički ciklus. Umjereni fagi ulaze u stanje lizogenije, u kojem ne dolazi do ekspresije većine virusnih gena, a virusni genom označen kao profag se replicira sinhronizirano sa hromosomom domaćina. Samo prisustvo virusnog genoma ne šteti domaćinu, ono što zaista predstavlja problem jeste ekspresija virusnih gena. Stoga, ćelije domaćina mogu pohraniti virusne genome bez da budu oštećene, ukoliko je ekspresija gena litičkog ciklusa pod kontrolom. Bakteriofag lambda koji napada *E. coli* je intenzivno istraživao i poznato je da, kao i kod drugih umjerenih faga, postoji mogućnost ostvarivanja i **lizogenog i litičkog puta (Slika 2.17)**.

2.8.2 Lizogenija

Lambda je temperirani bakteriofag, odnosno prilikom infekcije *E. coli* može da ostvari manje ili više stabilnu vezu sa domaćinom, što je poznato kao **lizogenija**. U ovom slučaju, lambda fag se integriše u hromosom *E. coli* na jedinstvenom mjestu poznatom kao *attλ* (eng. *lambda attachment site*). Integracija zahtijeva enzim lambda integrazu, koji prepoznaje faga i *att* mjesto vezivanja u domaćinu, te olakšava njihovo povezivanje. Integrisana DNK faga se replicira uz genom domaćina i prenosi na potomake ćelije.

U lizogenom stadiju utišana je ekspresija gotovo svih gena faga zahvaljujući aktivnosti fagom-kodiranog proteina represora, produkta *cI* gena. Kada se doda pripravak lambda faga u kulturu *E. coli*, neke od inficiranih stanica postaju lizogene, a neke ulaze u litički ciklus. Omjer inficiranih stanica koji će biti orjentisan prema svakom od navedenih scenarija je pod uticajem okolišnih uvjeta, kao i genetičke kompozicije faga i domaćina. Neki mutanti će producirati samo litičku infekciju, što u konačnici vodi ka stvaranju čistih plakova. Istovremeno, divlji tip faga produkuje zamućene plakove zbog prisustva lizogenih ćelija koje su rezistentne na dalji napad lambda faga (tzv. imunitet superinfekcije). Nadalje, lizogeni nastavljaju rast unutar plaka, a plak postaje zamućen. Ipak, neki sojevi bakterije domaćina nose mutaciju povezanu sa visokom stopom lizogenizacije, poznatu kao *hfl* (eng. *high*

frequency of lysogenization), te produkuju mnogo veći omjer lizogena nakon infekcija sa divljim tipom lambda faga. Ovo može biti korisno ukoliko je potrebna izmjena domaćina u stabilnoj mjeri (na primjer ukoliko se istražuje ekspresija gena faga). Generalno, prilikom korištenja lambda vektora, postoji veći interes za rekombinantnim fagima koji nose klonirane gene, a u takvim slučajevima važniju ulogu ima litički ciklus. Iako je lizogeno stanje relativno stabilno, ta stabilnost ipak nije apsolutna.



Slika 2.17 Litički i lizogeni put u infektivnom ciklusu bakteriofaga.

Kultura bakterijskih lizogena će normalno sadržavati čestice faga u supernatantu, s obzirom na mali nivo spontanog zaustavljanja represijskog mehanizma. Stopa narušavanja represije može biti povećana tretiranjem kulture agensima koji oštećuju DNK, kao što je na primjer UV zračenje; oštećenje DNK inducira produkciju reparacijskih enzima koji, između ostalog, uništavaju *cI* represorski protein omogućavajući na taj način inicijaciju litičkog

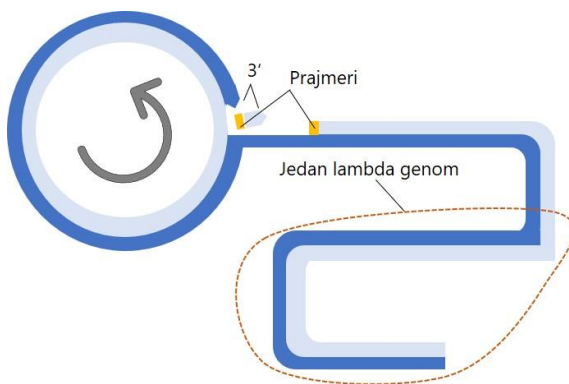
ciklusa. Neki često korišteni lambda vektori nose mutaciju na *cI* genu, koja protein čini senzitivnijim na temperaturu. Bakterijski soj koji nosi tako mutiranog faga može biti uzgojen kao lizogen na smanjenoj temperaturi, a litički ciklus se može inducirati povećanjem temperature zbog inaktivacije represorskog proteina. U lizogenom stanju, lambda je normalno integrisan u bakterijski hromosom i replicira se kao dio bakterijske DNK. Ipak, ova integracija, iako vrlo česta među temperiranim fagima, nije esencijalna odlika lizogenije. Lambda fag može nastaviti replikaciju u ekstrahromosomalnom stanju, slično kao plazmid. Nekim bakteriofagima (npr. P1) ovo je uobičajeni način replikacije u lizogeniji.

Već je navedeno da čestice divljeg tipa lambda faga posjeduju dvolančani DNK genom sa po 12 nesparenih, ali komplementarnih baza na svakom kraju. Stoga se ovi krajevi označavaju kao **ljepljivi** (eng. *sticky ends*) ili **kohezivni krajevi** i podsjećaju na krajeve brojnih restrikcijskih fragmenata, s tim da veća dužina ovih krajeva stabilizira sparivanje. Krajevi se mogu odvajati zagrijavanjem lambda DNK, a ukoliko dođe do rapidnog hlađenja, moguće je dobiti linearne lambda DNK monomere. Na niskim temperaturama krajevi molekule će se kretati sporo, te će ponovno spajanje ljepljivih krajeva trajati duže, ali ipak na kraju nastaje prstenasta struktura. Kada lambda fag inficira bakterijsku ćeliju i injektira svoju nukleinsku kiselinu, DNK formira cirkularnu strukturu, sa urezima koje in vivo reparira bakterijska DNK ligaza. U ovom periodu, dešava se mnogo procesa koji utiču na ekspresiju gena i u konačnici determiniraju da li fag ulazi u litički ciklus ili se uspostavlja lizogenija.

2.8.3 Litički ciklus

U **litičkom ciklusu**, cirkularna DNK struktura se inicijalno replicira na način koji podsjeća na replikaciju plazmida (teta-replikacija), kako bi nastalo više prstenaste DNK. Ipak, replikacija vremenom prelazi na alternativni model (replikacija po modelu kotrljajućeg prstena), što generira duge, linearne DNK molekule koje posjeduju veliki broj kopija lambda genoma, a koje su povezane u jednu kontinuiranu strukturu (**Slika 2.18**). Za razliku od semikonzervativne replikacije, ovaj mehanizam je asimetričan i odvija se u dva stadija. U prvom stadiju dolazi do zarezivanja jednog lanca cirkularnog genoma lambda faga, nakon čega nastaje dugi jednolančani konkatemer

(konkatemer je naziv za dugu, kontinuiranu DNK molekulu koja sadrži višestruke kopije iste sekvence u seriji) korištenjem intaktnog lanca kao matrice. U drugom stadiju, drugi lanac nastaje upotrebom jednolančanog konkatemera kao matrice. U konačnici, nastala dvolančana struktura se izrezuje na dužinu koja odgovara veličini genoma, pri čemu nastaju pomenuti kohezivni krajevi.



Slika 2.18 Replikacija lambda genoma po modelu kotrljajućeg prstena.

Dok se ovo dešava, geni koje nosi fag se ekspimiraju i nastaju komponente virusne čestice. Ovi proteini se za početak sastavljaju u dvije odvojene strukture, tj. glava (prazni prekursor strukture u koju će biti insertovana DNK), i rep (koji će biti povezan sa glavom nakon pakovanja DNK). Proces pakovanja uključuje enzime koji prepoznaju specifična mjesta dužinom DNK molekule koja nastaje replikacijom po modelu kotrljajućeg prstena i prave asimetrične rezove na DNK na ovim pozicijama. Ti lomovi u DNK molekuli dovode do nastanka kohezivnih krajeva vidljivih kod DNK zrelih faga; ova mjesta su poznata kao **kohezivna krajnja mjesta** (eng. *cohesive end sites*, *cos*). Regija DNK između dva *cos* mjesta se čvrsto veže za glavu bakteriofaga. Nakon uspješnog pakovanja DNK u glavu faga, dodaje se i rep kako bi nastala zrela čestica faga, a koja se oslobađa lizom ćelije.

Jedna od najvažnijih odlika ovog procesa je dužina DNK koja će biti pakovana u glavu faga, a koja je determinirana distancom između dva *cos* mjesta. Ukoliko se insertuje dio DNK u lambda vektor, ta distanca se povećava, kao i količina DNK koja se pakuje. Ipak glava virusa je fiksne veličine i može

pohraniti samo određenu količinu DNK (do 51 kb sveukupno, što je oko 5% ili 2.5 kb više u odnosu na divlji tip). S obzirom na sam razlog korištenja lambda faga u genetičkom inženjerstvu, a to je upotreba s ciljem kloniranja većih fragmenata DNK, ovo predstavlja ozbiljno ograničenje. Opisani problem se može riješiti delecijom DNK koja je normalno prisutna, što je moguće jer lambda genom posjeduje veći broj gena koji nisu esencijalni - osobito ukoliko je poželjan samo litički rast. Tada je moguće deletirati bilo koji gen koji je potreban isključivo za uspostavljenje lizogenije. Ipak, nije moguće ni pretjerano deletiranje. Stabilnost glave faga zahtijeva određenu količinu DNK, tako da iako postoje geni koji nisu potrebni, nemoguće je deletirati svu DNK. Kako bi se proizvodio vijabilan fag, mora postojati minimum od 37 kb DNK između dva *cos* mjesta. Postojanje ovih limita pakovanja je veoma važna odlika u dizajnu i aplikaciji lambda vektora.

2.8.4 In vitro pakovanje

Gola DNK bakteriofaga može biti introducirana u domaćinsku ćeliju bakterije transformacijom (što se često označava kao transfekcija ukoliko je riječ o DNK molekuli faga) na sličan način kao kod plazmida. Značajna razlika je vidljiva u tome da je umjesto zasijavanja na selektivni agar i brojanja bakterijskih kolonija, potrebno pomiješati transfekcijski miks sa kulturom bakterija u prisustvu indikatora senzitivnog na fage u tečni agar, nakon čega se vrši opservacija plakova (čistih zona koje nastaju usljed lize bakterija) po presijavanju na agar ploče. U ovom slučaju nije potreban gen za rezistenciju na antibiotike kao selektivni marker. Ipak, velika većina DNK molekula bakteriofaga, uključujući lambda fag, transfekciju vrši neučinkovito u poređenju sa transformacijom posredovanom plazmidima, ali postoji učinkovita alternativa.

Neki mutirani lambda fagi kod prikladnih bakterija domaćina proizvode prazne glave faga (nedostaje im protein potreban za pakovanje DNK), dok su neki defektni u smislu same produkcije glave ali posjeduju proteine pakovanja. Ove dvije frakcije su komplementarne jedna drugoj, te korištenje mješavine dozvoljava produktivno pakovanje dodane DNK, što se pokazalo kao vrlo učinkovito u in vitro uslovima. Rezultirajuće čestice faga dalje mogu biti praćene dodavanjem senzitivne bakterijske kulture i zasijavanjem. S

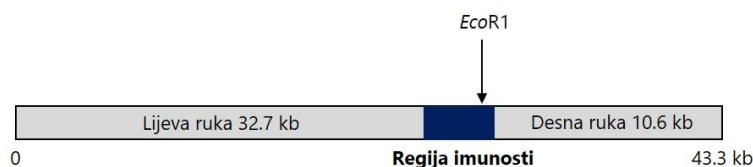
obzirom da je in vitro pakovanje lambda DNK puno učinkovitije od procesa transfekcije, taj metod se gotovo uvijek i koristi. Jedna odlika ovog sistema koja je značajno drugačija od rada sa plazmidnim vektorima je ta da proces pakovanja ima veću efikasnost ukoliko se odvija uz prisustvo DNK molekula različite dužine. Enzim uključen u pakovanje DNK normalno je izrezuje na dva različita *cos* mjesta u molekule različite dužine, a monomerne cirkularne molekule sa jednim *cos* mjestom se vrlo slabo pakuju. Stoga su kod upotrebe plazmidnih vektora idealni ligacijski produkti monomerni cirkularni plazmidi sastavljeni od jedne kopije vektora i inserta, a kod lambda vektora je potrebno prilagoditi uslove ligacije tako da se postigne višestruka ligacija krajeva lambda molekula sa insertovanim fragmentima.

2.8.5 Insercijski vektori

Najjednostavnija forma lambda vektora, poznata kao **insercijski vektori**, dijeli koncepte sa plazmidnim vektorima jer posjeduje jedno klonirajuće mjesto u koje može biti insertovana DNK. Ipak, divlji tip lambda DNK posjeduje mnogo mjesta za većinu često korištenih restrikcijskih enzima. Tako na primjer, nije moguće izvršiti izrezivanje sa *HindIII* i ligaciju sa insertovanom DNK. *HindIII* posjeduje sedam mjesta na normalnoj lambda DNK i doći će do izrezivanja molekule na osam dijelova. Nameće se logičan zaključak da bi bilo gotovo nemoguće spojiti sve fragmente (i insert od interesa) pravilnim redoslijedom. S ciljem prevazilaženja ovog problema, svi lambda vektori su genetički manipulirani kako bi se odstranila neželjena restrikcijska mjesta.

Na **Slici 2.19** prikazan je primjer lambda vektora pod imenom lambda gt10. Kod ovog vektora postoji samo jedno mjesto na kojem će *EcoRI* isjeći DNK. Zahvaljujući manipulacijama, neželjena mjesta sa faga su uklonjena i smanjena je sveukupna veličina DNK faga na 43.3 kb, što omogućava inserciju strane DNK maksimalne veličine do 7.6 kb. Rezanje ovog vektora sa enzimom *EcoRI* će produkovati dva DNK fragmenta, označenih kao lijeva i desna ruka. Jedan kraj svake od dvije ruke je deriviran od kohezivnih krajeva lambda DNK, te će se spajati poprilično stabilno na 37 °C. Iako neće biti kovalentno povezani, mogu se smatrati jednim DNK fragmentom. Lambda gt10 je još jedan primjer toga kako se insercijska inaktivacija može koristiti u razlikovanju parentalnog vektora od rekombinanti. *EcoRI* mjesto se nalazi

unutar represorskog gena (*ci*), tako da rekombinantni fag koji nosi insert na ovoj poziciji ne može načiniti funkcionalan represor. Kao posljedica toga, ne može se uspostaviti lizogenija i doći će do pojave čistih plakova, dok će parentalni gt10 fag formirati zamućene plakove. Probirom čistih plakova može se odabrati rekombinantni fag bez korištenja defosforilacije.



Slika 2.19 Lambda insercijski vektor gt10.

Još jedan primjer insercijskog vektora je lambda gt11, koji je inženjersan tako da posjeduje beta galaktozidazni gen i jedno *EcoRI* restrikcijsko mjesto unutar tog gena. Zbog toga će insercija DNK na *EcoRI* mjesto inaktivirati beta-galaktozidazni gen i rekombinanti će dati bijele (zapravo bezbojne) plakove na podlozi koja sadrži X-gal. Nadalje, ukoliko je insert dobro orijentiran i smješten unutar ispravnog okvira, doći će do nastanka fuzijskog proteina koji posjeduje produkt kodiran insertom, spojen sa beta-galaktozidaznim proteinom. Ovaj fuzirani protein najvjerojatnije neće imati biološke funkcije povezane sa kloniranim genom, ali to i nije krajnji cilj. Vjerojatno će doći do reakcije sa antitijelima prirodnog produkta, što predstavlja koristan način detektovanja klonova od interesa. Lambda gt11 je primjer translacijskog fuzijskog ekspresijskog vektora. S obzirom na limit pakovanja lambda DNK koji je između 37 kb i 51 kb, nije moguće napraviti insercijski vektor manji od 37 kb, niti insertovati DNK fragment koji bi napravio produkt veći od 51 kb. Iz toga slijedi da je maksimalni kapacitet kloniranja za insercijski vektor 14 kb (51 kb-37 kb). Ovo je značajno više od onoga što bi se pouzdano kloniralo u plazmidnom vektoru, ali i dalje manje od onoga što je nekada potrebno. S ciljem povećanja kapaciteta kloniranja, potrebno je koristiti drugi tip lambda vektora poznatih kao zamjenski vektori.

2.8.6 Zamjenski vektori

Limit pakovanja koji ograničava klonirajući kapacitet insercijskih vektora je nametnut prije svega fizičkim zahtjevima glave faga, a ne prirodom potrebnih

gena. Postoje geni koji nisu nužni za litički rast i mogu biti deletirani, ali bi došlo do produkcije DNK faga koji bi bila premali da produkuju vijabilno potomstvo. Stoga se vrši alternativni dizajn lambda klonirajućih vektora. Umjesto insertovanja dodatne DNK, aranžira se vektor tako da dio DNK može biti uklonjen i zamijenjen insertom, i upravo zbog toga je u upotrebi naziv **zamjenski vektor**.

Primjer lambda zamjenskog vektora je EMBL4. U ovom slučaju, umjesto da dođe do izrezivanja jednim odabranim restriksijskim enzimom (u ovom slučaju *Bam*HI), postoje dva mjesta gdje će biti izrezana DNK. Drugim riječima, vektorska DNK će biti izrezana u tri fragmenta i to lijeva i desna ruka, te treći fragment koji nije potreban i može biti odbačen. S obzirom da je jedina svrha ovog fragmenta da pomogne popuniti glavu faga, poznat je kao fragment punjenja (eng. *stuffer fragment*). Ovaj vektor može biti izrezan sa *Bam*HI, nakon čega se fragmenti razdvajaju elektroforezom. Fragment punjenja se odbacuje, a ruke se miješaju sa restriksijskim fragmentima koji se kloniraju. Ovo se može ostvariti digestijom posredstvom *Bam*HI ili izrezivanjem ciljne sekvence sa drugim enzimom koji produkuje kompatibilne krajeve, na primjer *Sau*3A. Ligacija smjese daje rekombinantnu DNK faga koja se može spakovati u glavu virusa in vitro. Klonski kapacitet vektora je u ovom slučaju značajno povećan; kombinovana veličina ruku je 29 kb, te se mogu klonirati fragmenti do 22 kb (51 kb-29 kb). Postoji još jedna prednost ovih vektora. Kombinovana veličina ruku je samo 29 kb, što je manje od donjeg limita za pakovanje. Svaki par ruku koji je ligiran bez inserta će biti premali da produkuje vijabilne čestice faga, jer će vijabilne partikule biti produkovane samo ukoliko ligacija rezultira insertom od najmanje 8 kb (37 kb-29 kb). Vektor stoga pruža pozitivnu selekciju rekombinanti u odnosu na parentalni fag. Poznate su i druge korisne osobine koje se mogu ugraditi u zamjenski vektor. S obzirom na to da fragment punjenja nije neophodan za produkciju faga, u te svrhe se mora koristiti lambda DNK, već praktično može biti bilo šta. Tako je primjerice moguće koristiti fragment koji nosi gen za beta-galaktozidazu, a u vizualnom smislu, svi plakovi koji nastanu od faga koji i dalje nosi fragment punjenja će biti plavi na podlozi koja sadrži X-gal. Iako su lambda fagi najčešće korišteni fagni vektori, postoje i drugi koji se mogu koristiti za specifične svrhe, uključujući filamentozni bakteriofag M13. U

prošlosti je bio mnogo korišten zbog pogodnog načina dobijanja jednolančanih kopija klonirane DNK koja je bila potrebna za rane strategije sekvenciranja. Savremene tehnike sekvenciranja ne moraju imati jednolančanu DNK, pa je i upotreba ovog faga u te svrhe dosta manje. Također, zbog mogućnosti pohrane većih insercijskih fragmenata poznat je i bakteriofag P1.

2.9 Kozmidi i supervektori

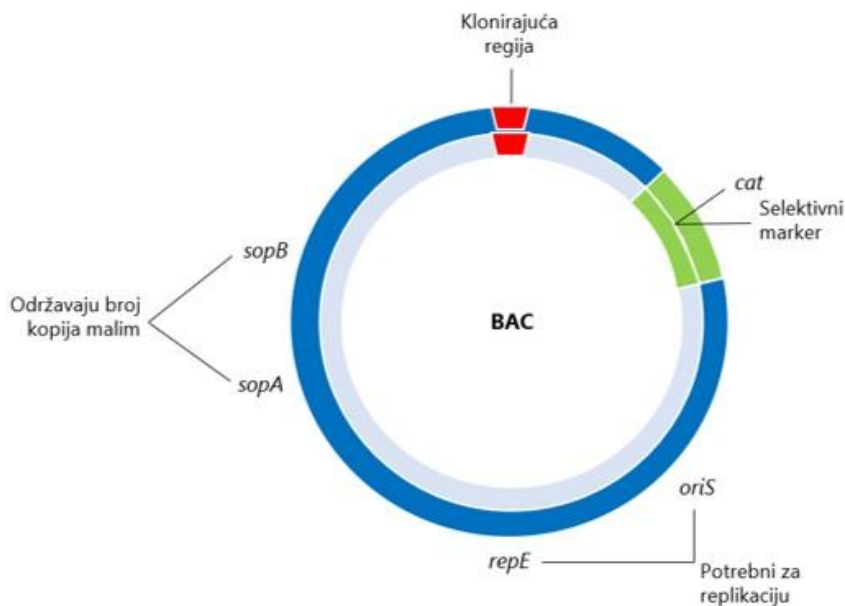
Brojne analize genomske DNK zahtijevaju kloniranje fragmenata DNK većih nego što ih mogu prihvatiti lambda vektori. Za tu namjenu koristi se pet glavnih tipova vektora. **Kozmidni vektori** mogu prihvatiti umetke veličine oko 45 kb. Reakcija pakovanja kod lambda genoma ima dva ključna zahtjeva, a to su prisustvo *cos* mjesta i sama veličina DNK molekule. Kozmidi koriste ove relativno jednostavne zahtjeve, pa se govori o kreiranju klonirajućih vektora sa većim kapacitetom nego što bi se postiglo sa lambda zamjenskim vektorima. Kozmid je zapravo plazmid koji posjeduje lambda *cos* mjesto. Kao i zamjenski vektori, kozmidni vektori koriste specifične lambda gene i pakuju se u lambda virion. Kozmidi se konstruišu od plazmida ligacijom lambda *cos* regije sa plazmidnom DNK. Strana DNK se potom ligira u vektor. Kao i sa svim plazmidnim vektorima, on posjeduje ishodište replikacije, selektivni marker (najčešće gen za rezistenciju na antibiotike) i klonirajuće mjesto. Digestija, ligacija sa potencijalnim fragmentima za inserciju i naknadna purifikacija rekombinantnih klonova se odvijaju uglavnom kao kod standardnih plazmidnih vektora. Ipak, umjesto transformiranja bakterijskih stanica sa ligacijskim miksom, ligacijska mješavina se izlaže in vitro pakovanju. S obzirom na to da kozmidi nose *cos* mjesto, ovo je moguće, ali ipak, samo u slučajnu odgovarajućih dimenzija. Produkt reakcije pakovanja neće dati više faga nakon infekcije bakterije domaćina.

Oni ne nose gene koji su potrebni za produkciju čestica faga, niti gene za lizu ćelija. Stoga se ne mogu dobiti plakovi faga. Ipak, kozmid će se replicirati kao plazmid, te će doći do pojave više ćelija koje posjeduju kozmid, a one se nadalje mogu selektovati kao kolonije na agaru koji sadrži antibiotik. Kod velikih genoma, kao što su genomi sisara, klonski kapacitet kozmida je i dalje premali, ali dostupni su alternativni vektori sa većim kapacitetom. Kod malih

genoma, kozmidi su izuzetno važni. Kompletan bakterijski genom može biti pokriven sa svega nekoliko stotina kozmida, što je korisno u mapiranju genoma i sekvenciranju. Korištenjem kozmida izbjegnuta je potreba za transformacijom *E. coli*, što je osobito neučinkovito kod većih plazmida.

Kozmidi također dozvoljavaju pohranu DNK u čestice faga, a čestice faga su stabilnije od plazmida, te se rekombinantna DNK može čuvati kroz duži vremenski period. Druga dva tipa vektora izvedena su iz bakteriofaga P1 i mogu prihvatiti inserte DNK od 70 kb do 100 kb. Sadržavaju slijedove nukleotida koje omogućavaju in vitro ugradnju rekombinantne DNK u čestice P1 faga, a u bakteriji *E. coli* se mogu neovisno replicirati poput plazmida. P1 umjetni hromosomi (eng. *P1 Artificial Chromosome*, PAC) također posjeduju sekvence bakteriofaga P1, ali se u bakteriju unose direktno kao plazmidi, a prihvataju inserte DNK veličine od 130 kb do 150 kb. Bakterijski umjetni hromosom (eng. *Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) je vektor izveden iz prirodnog plazmida koji se nalazi kod *E. coli* (tzv. F faktor). Ishodište replikacije i ostali redoslijedi F faktora omogućavaju da se BAC replicira kao stabilni plazmid čak i uz inserte veličine 120-300 kb. **Slika 2.20** prikazuje strukturu BAC vektora zansovanu na F plazmidu. Vektor je veličine svega 6.7 kb, dok je F plazmid veličine 99.2 kb. BAC posjeduje svega nekoliko gena od F plazmida, uključujući *oriS* i *repE*, koji su neophodni za replikaciju; te *sopA* i *sopB* koji održavaju broj kopija veoma malim. Plazmid posjeduje i *cat* gen, koji je odgovoran za rezistenciju domaćina na hloramfenikol, te segment koji uključuje nekoliko restrikcijskih mjesta za kloniranje DNK (tzv. polilinker). Strana DNK veličine preko 300 kb može biti umetnuta i stabilno održavana u takvom BAC vektoru. Domaćin BAC vektora je tipično mutirani soj *E. coli* kojem nedostaje normalni restrikcijski i modifikacijski sistem divljeg tipa. Ovo čuva i sam BAC vektor od uništenja.

Domaćin je najčešće defektan i u smislu rekombinacije, čime se sprječava rekombinacija klonirane DNK iz BAC vektora u hromosom ćelije domaćina. Još veće fragmente DNK, veličine i 250-400 kb (nekada i do 800 kb) moguće je klonirati u vektoru koji se naziva **kvašćev umjetni hromosom** (eng. *Yeast Artificial Chromosome*, YAC).



Slika 2.20 Genetička mapa bakterijskog umjetnog hromosoma, BAC.

Ti vektori posjeduju ishodište replikacije kvasca i neke druge elemente (centromere i telomere) koji im omogućavaju da se u ćelijama kvasca, tipično *Saccharomyces cerevisiae*, repliciraju kao linearne molekule slične hromosomima. **Slika 2.21** prikazuje dijagram YAC vektora u kojem je uklonjena strana DNK.



Slika 2.21 Kvaščev umjetni hromosom, YAC. Strana DNK je uklonjena u vektor na *Not I* restrikcijskom mjestu. TEL: telomere; CEN: centromera; ARS: ishodište replikacije (eng. *autonomous replication sequence*); *URA3*: gen korišten za selekciju.

Nakon potvrde da je fragment DNK kloniran u BAC ili YAC vektor, moguće ga je ponovno klonirati u plazmidni ili vektor zasnovan na bakteriofagu, s ciljem provođenja detaljnih analiza ili sekvenciranja. Iako YAC može pohraniti više strane DNK u poređenju sa BAC vektorom, mogući su drugi problemi prilikom rekombinacije i rearanžiranja klonirane DNK u kvascu nego unutar *E. coli*. Iz navedenog razloga, BAC vektori se češće koriste nego YAC vektori.

3

Lančana reakcija polimerazom

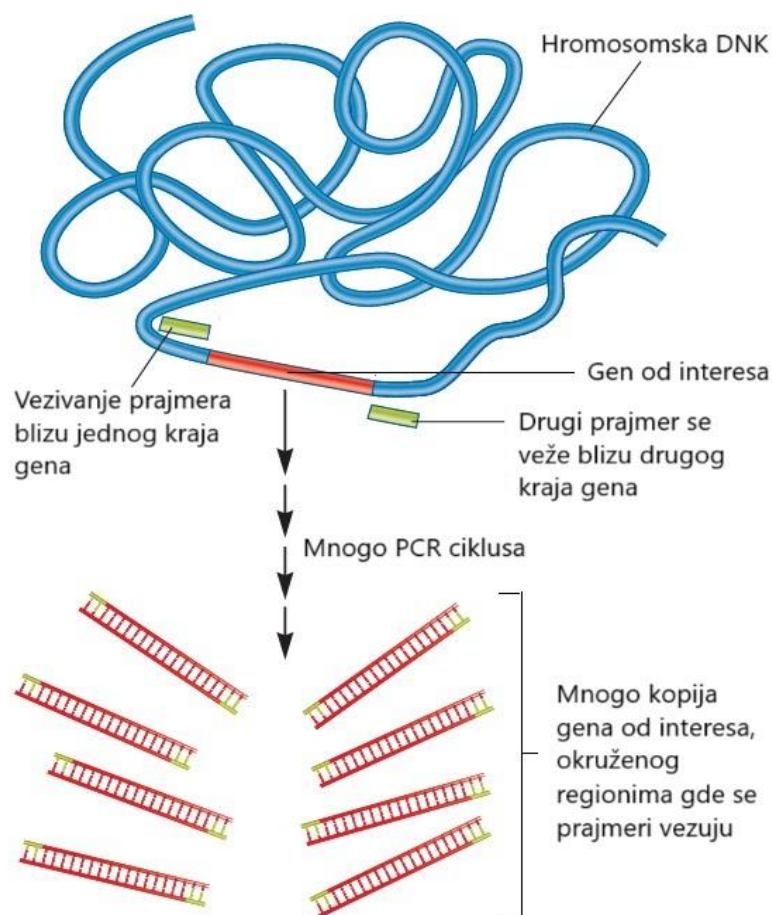
Aner Mešić

U prethodnom poglavlju o kloniranju gena, DNK od interesa je umetnuta u vektor, koji je zatim unesen u ćeliju domaćina. Replikacija vektora unutar ćelije domaćina i proliferacija ćelija domaćina dovodi do stvaranja velikog broja kopija DNK. Drugi način kopiranja DNK, bez upotrebe vektora i ćelija domaćina, je tehnika koja se zove **lančana reakcija polimerazom** (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), koju je razvio Kary B. Mullis 1985. Naime, Kary B. Mullis je 10. decembra 1993. dobio Nobelovu nagradu za hemiju od švedskog kralja Carla XVI. Gustafa za izum metode lančane reakcije polimerazom. Mullis je objavio i patentirao ovaj izum samo osam godina ranije, tačnije 1985. Iako PCR predstavlja prilično jednostavnu metodu s očitim ograničenjima, njena primjena je napravila revoluciju kako u bazičnoj tako i u primijenjenoj biologiji.

3.1 PCR amplificira definirane regione genoma

PCR metoda se koristi za stvaranje velikih količina DNK u definiranoj regiji koja je okružena s dva prajmera. **Prajmeri** su oligonukleotidi, tačnije kratki segmenti DNK, obično dugi oko 15 do 20 nukleotida. Kao što je prikazano na **Slici 3.1**, početni materijal PCR eksperimenta može biti složena mješavina DNK. Dva prajmera se vežu za određena mjesta u DNK jer su njihove baze na tim mjestima komplementarne. Krajnji rezultat PCR-a je umnožavanje regiona koji je okružen prajmerima, a koji sadrži gen od interesa. Izraz amplifikacija znači da su napravljene mnoge kopije regiona. Drugim riječima, region između dva prajmera je kloniran. Prajmeri su ključni reagensi u PCR

eksperimentu i izrađuju se hemijski. Istraživači ili kliničari jednostavno naručuju prajmere s određenim slijedom. Logično pitanje jeste kako neko odabire sekvence prajmera? U većini slučajeva, PCR se provodi na uzorcima DNK u kojima istraživač već poznaje sekvence DNK koje okružuju region od interesa. Budući da je cijeli genom mnogih vrsta već određen, informacije o sekvenci mogu se dobiti iz baze podataka genoma vrste od interesa. Na primjer, ako želimo klonirati humani gen ili dio humanog gena, kao što je gen za β -globin, potražili bismo tu gensku sekvencu u bazi podataka humanog genoma i odlučili gdje želimo da se vežu naša dva prajmera. Zatim bismo naručili prajmere sa sekvencama koje su komplementarne tim mjestima.



Slika 3.1 Ishod PCR eksperimenta. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2024)

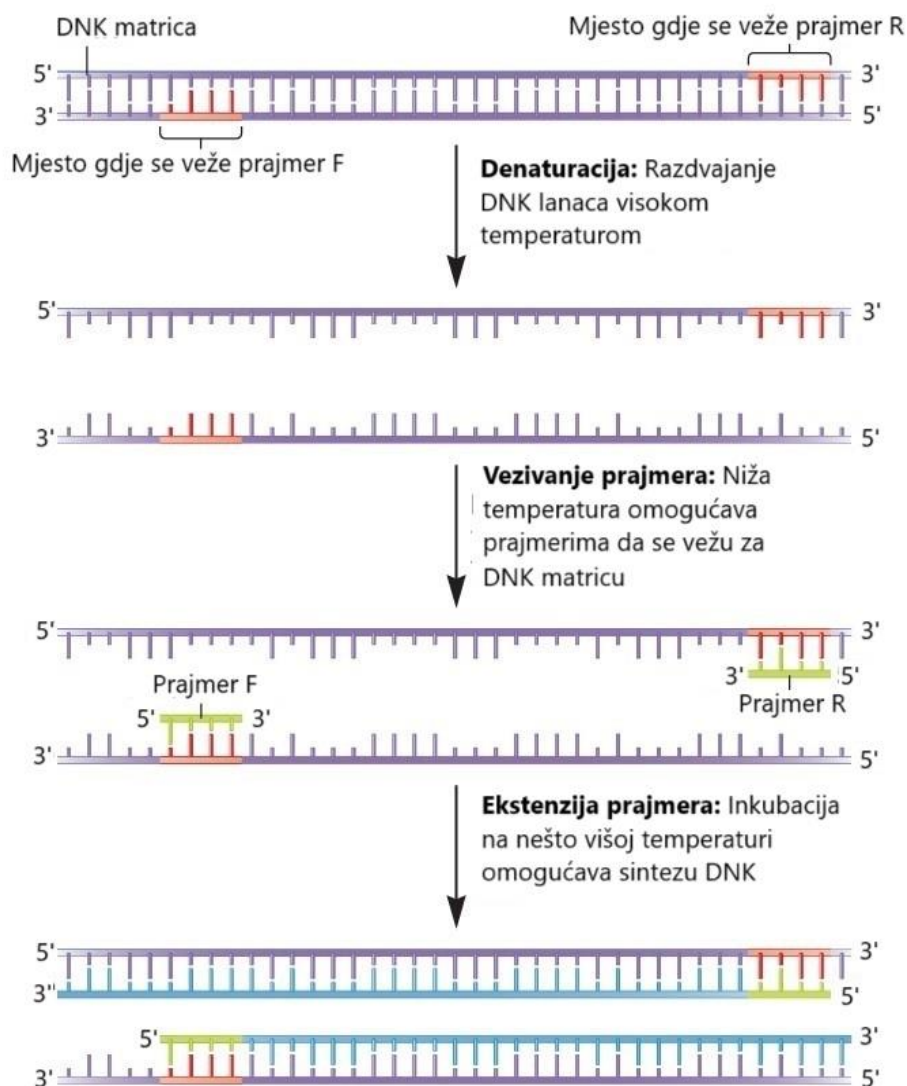
Razmotrimo sada reagense koji su potrebni za PCR eksperiment. Dva reagensa sa kojima smo se već upoznali na **Slici 3.1** su prajmeri i uzorak DNK koji sadrži gen od interesa, a koji se naziva **DNK matrica**. Osim toga, potrebni su deoksiribonukleozid trifosfati (dNTP), kao i termostabilni oblik DNK polimeraze kao što je **Taq polimeraza**, izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*. Termostabilni oblik DNK polimeraze je neophodan jer PCR uključuje korake zagrijavanja koji inaktiviraju većinu drugih prirodnih oblika DNK polimeraze (koji su termolabilni ili se lako denaturiraju toplinom).

PCR uključuje tri koraka i to: denaturaciju, vezivanje prajmera i ekstenziju prajmera (**Slika 3.2**). Da bi se napravile kopije DNK, DNK matrica se **denaturira** toplinskom obradom, uzrokujući odvajanje lanaca. Temperatura koja se za to koristi u PCR-u iznosi 95°C i jedva da oštećuje molekulu *Taq* polimeraze tokom minute ili tako da se PCR reakcija zagrije na ovu temperaturu.

Temperatura se zatim snižava na optimalnu temperaturu **vezivanja**, gdje se dva prajmera mogu vezati na suprotne DNK lance. Ovo je jedina temperatura u PCR ciklusu koja se može značajno mijenjati. Odabire se za optimalno vezivanje prajmera za matricu, uz njihovo minimalno vezivanje za druge, nespecifične sekvence. Ako je temperatura vezivanja preniska, prajmeri će se vezati za druga mjesta na matrici, što će rezultirati lažnim produktima ili produktima koje je nemoguće detektirati. Ako je temperatura vezivanja previsoka, prajmeri se možda neće uspjeti vezati za ispravno mjesto, što će rezultirati izostankom amplifikacije. Potrebna temperatura zavisit će od tačne sekvence i dužine prajmera. Budući da su prajmeri kratki i koriste se pri relativno visokim molarnim koncentracijama, njihovo vezivanje je brzo i traje manje od minute.

Nakon što su prajmeri vezani, temperatura se lagano povećava na otprilike 72°C, što predstavlja optimalnu temperaturu **ekstenzije** u PCR eksperimentu. *Taq* polimeraza će sada katalizirati sintezu komplementarnih DNK lanaca u smjeru 5' - 3', počevši od prajmera. Ovaj proces, nazvan ekstenzija prajmera, udvostručuje količinu DNK matrice. Ekstenzija se odvija stopom od približno 1000 baza u minuti. Stoga, da bismo amplificirali regiju DNK koja je dugačka 500 baza, u normalnim uvjetima trebali bismo omogućiti vrijeme ekstenzije

od najmanje 30 sekundi. Međutim, važno je napomenuti da će se polimerizacija odvijati sve dok se ne prekine, budući da je početna matrica u ovom slučaju mnogo puta veća od dužine željenog amplikona. To se događa kada se temperatura ponovno podigne na 95°C kako bi se započeo sljedeći ciklus u PCR reakciji koji se sastoji od koraka koji su po temperaturi i trajanju identični prethodnim.



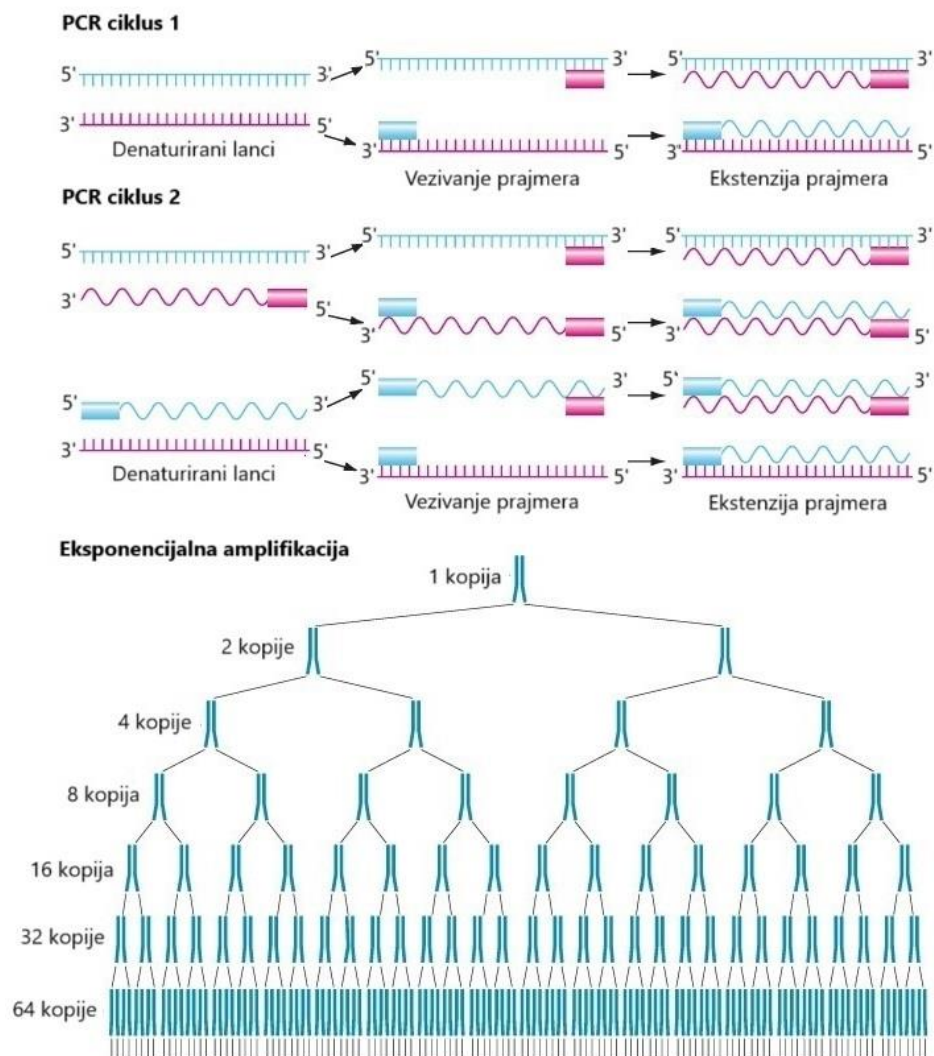
Slika 3.2 Tri koraka PCR ciklusa. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2024)

Kada završimo s prvim ciklusom PCR-a, imamo dvije dvolančane molekule DNK za svaku s kojom smo započeli (**Slika 3.3**). Svaka od njih sadrži jedan lanac izvorne matrice i jedan novi lanac, koji je definiran na jednom kraju, specifično, oligonukleotidnim prajmerom, a na drugom kraju, nespecifično, time koliko je polimerizacija mogla ići tokom vremena koje smo dozvolili za ekstenziju.

Drugi korak denaturacije stvara četiri jednolančane molekule, od kojih su dvije izvedene iz izvorne matrice, a dvije su naši novosintetizirani lanci. U sljedećem koraku vezivanja, jedna molekula komplementarnog prajmera će se vezati na svaki od ovih pojedinačnih lanaca. Kako se temperatura ponovno podigne na 72°C, *Taq* polimeraza će početi produžavati prajmere (**Slika 3.3**). Dvije od četiri ekstenzije, gdje se prajmer ponovno vezao za izvornu hromosomsku matricu, identične su prvoj ekstenziji po tome što završavaju tek kad se temperatura poveća. Međutim, treba imati na umu da se to ne odnosi na dva lanca koja se stvaraju s novim lancima kao matricama. Ove matrice naglo završavaju tamo gdje su se suprotni prajmeri vezali. Ako zamislimo još jedan ciklus, tada će opet dva originalna lanca matrice dovesti do stvaranja dugog produkta, ograničenog samo trajanjem reakcije ekstenzije. Prajming na svim ostalim lancima dat će produkt koji je definiran i omeđen prajmerima na oba kraja. Svaki sljedeći ciklus proizvest će dva nova duga lanca, ali će se broj novih kratkih lanaca eksponencijalno povećavati (**Slika 3.3**), tako da će na kraju reakcijskom smjesom u potpunosti dominirati novoformirani kratki DNK lanci, naš ciljni amplikon, s jednim prajmerom ugrađenim u svaki kraj. Iz ovoga slijedi da su krajevi nove DNK zapravo definirani prajmerima, za razliku od intervenirajućih regija, koje su u cijelosti definirane originalnom matricom.

3.2 Long-range PCR

Lančana reakcija polimerazom (PCR) vrijedan je alat koji je izazvao revoluciju u molekularnoj biologiji i genetičkim istraživanjima od svog prvobitnog uvođenja. Ova se tehnologija razvila i proširila na brojna polja istraživanja, posebice u istraživačkoj i dijagnostičkoj medicini. Unatoč širokoj upotrebi, amplifikacija dugih segmenata DNK, obično definiranih kao oni koji imaju dužinu amplikona veću od 3 kb, ostaje izazov. Kako bi se poboljšala izvedba

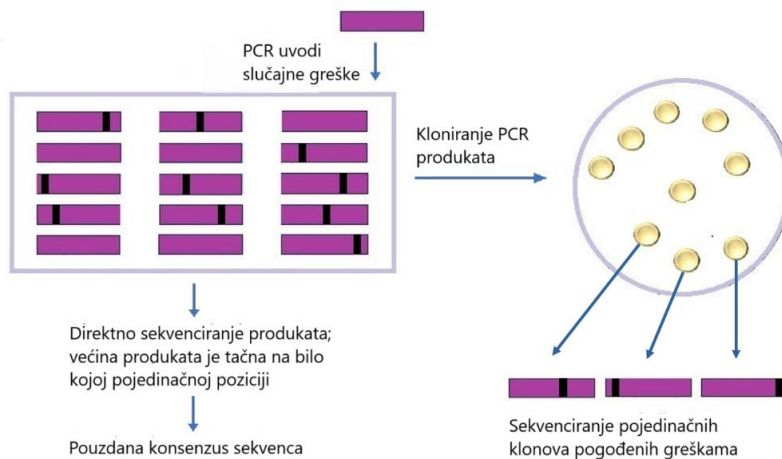


Slika 3.3 PCR amplifikacija ciljne sekvence. U prvom PCR ciklusu jedna molekula dvolančane genomske DNK se zagrijava da bi se denaturirala u pojedinačne lance. Temperatura se zatim snižava kako bi se omogućilo da ovi pojedinačni lanci hibridiziraju s dva PCR prajmera. DNK polimeraza stabilna na toplinu sada polimerizira novu DNK na 3' krajevima svakog prajmera. U drugom PCR ciklusu, DNK u reakcionoj tubici se denaturira i potom hibridizira sa istim prajmerima. I originalni lanci DNK i oni sintetizirani u prvom ciklusu služe kao matrice u drugom ciklusu. Svaki PCR ciklus tako udvostručuje količinu DNK u ciljnom regionu. Nakon završetka trećeg PCR ciklusa, 5' krajevi većine lanaca kalupa su definirani 5' krajevima prajmera, fiksirajući dužinu akumuliranog PCR produkta. (preuzeto i prilagođeno iz Hartwell i sar., 2018)

long-range PCR-a, tokom godina isprobani su različiti pristupi. U tom smislu, jedan od pristupa uključivao je primjenu metode PCR supresije za ciljano pojačanje i dodavanje **PCR pojačivača**. Ipak, jedna od najznačajnijih metoda jeste istovremena upotreba DNK polimeraza sa i bez aktivnosti 3' – 5' egzonukleaze (eng. *proofreading*).

Naime, *Taq* polimerazi nedostaje 3' – 5' egzonukleazna aktivnost te stoga nije u stanju ispraviti vlastite greške. U prosjeku, ove greške se javljaju otprilike jednom na svakih 9000 nukleotida. Takve greške će se zatim prenijeti na sve nove molekule koji potiču od one koja sadrži grešku. Ako se koristi direktno sekvenciranje, to zapravo i nije problem, jer će greške biti nasumično raspoređene i velika većina molekula u reakcijskoj tubici će biti ispravna na bilo kojoj poziciji. Međutim, ako se PCR proizvod klonira, to će potencijalno predstavljati problem, jer će svaka greška u jednoj molekuli koja će biti klonirana biti prisutna kod svih potomaka tog pojedinačnog klona (**Slika 3.4**). Iz tog razloga, ako želimo klonirati regiju DNK PCR-om, a ne samo otkriti njeno prisustvo, tada je upotreba *Taq* polimeraze neprimjerena jer može introducirati greške.

Još jedna posljedica relativnog nedostatka *Taq* polimeraze jeste činjenica da *Taq* polimeraza može efikasno amplificirati samo fragmente od nekoliko hiljada parova baza. Oba ova problema mogu se riješiti uvođenjem termostabilnih DNK polimeraza iz drugih termofilnih organizama kao što su *Pfu* i *Pwo* DNK polimeraze. Za razliku od *Taq* polimeraze, ovi enzimi posjeduju 3' – 5' egzonukleaznu aktivnost, što znači da stvaraju amplifikacijske produkte s mnogo većom tačnošću prijepisa (eng. *fidelity*). Nažalost, ove polimeraze nisu nužno tako efikasne kao *Taq* polimeraza. Ovo je prevaziđeno uvođenjem prikladne mješavine *Taq* polimeraze i termostabilne DNK polimeraze. Kombiniranjem veće tačnosti prijepisa pomoću termostabilnih enzima sa efikasnošću i visokim prinosom *Taq* polimeraze, kao i iskorištavanjem sposobnosti jedne polimeraze da nastavi ekstenziju tamo gdje druga staje, omogućena je efikasna amplifikacija DNK fragmenata do 50 kb. Opisana metoda je omogućila značajan napredak u mapiranju i određivanju sekundarne strukture cjelokupnih nuklearnih genoma, kao i genoma ćelijskih organela, ekspresiji i kloniranju gena te analiziranju cDNK i DNK.

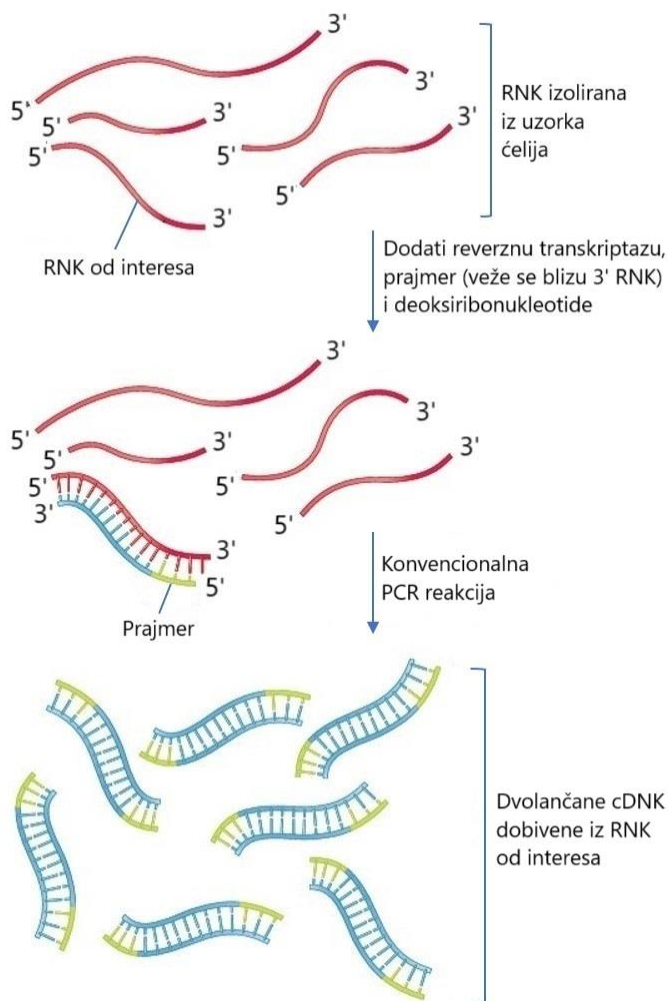


Slika 3.4 Detekcija PCR grešaka.

3.3 PCR reverznom transkriptazom

Prethodno smo već spomenuli da se enzim **reverzna transkriptaza** koristi za kreiranje cDNK iz mRNK. Kako bi se postigao ovaj cilj, RNK se izolira iz uzorka i miješa s dezoksinukleotidima, reverznom transkriptazom i prajmerom koji se veže blizu 3' kraja RNK od interesa (**Slika 3.5**). Ovo stvara jednolančanu cDNK, koja se zatim može koristiti kao DNK kalup u konvencionalnoj PCR reakciji. Krajnji rezultat je da je RNK amplificirana kako bi proizvela mnogo kopija DNK. Kombinacija reverzne transkriptaze (RT) s PCR-om, a što predstavlja proceduru poznatu kao **PCR reverznom transkriptazom** (eng. *Reverse Transcriptase PCR*, RT-PCR), proširuje primjenu PCR-a na analizu ekspresije gena, bilo kvalitativno ili kvantitativno, kao i da uveliko olakšava konstruiranje cDNK biblioteka ili kloniranje specifičnih cDNK. RT-PCR predstavlja izuzetno osjetljivu metodu. Jedan problem RT-PCR-a jeste taj da početna mRNK može biti kontaminirana genomskom DNK. PCR tada može rezultirati umnožavanjem kontaminirajuće DNK. Kada se radi s eukariotskim materijalom, to se često može prevladati dizajniranjem prajmera tako da amplikom obuhvata barem jedan intron. Tako će se umnožavanje bilo koje genomske DNK ili potpuno spriječiti (jer prisustvo intervenirajućeg introna čini sekvencu prevelikom da bi se umnožila), ili će se barem lako razlikovati

od amplificirane cDNK (zbog različite veličine produkta). Općenito, poželjno je ukloniti sve tragove DNK iz mRNK, obično tretmanom DNazom bez RNaze.



Slika 3.5 Tehnika PCR-a reverznom transkriptazom. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2024)

3.4 *Real-time* PCR

U nekim primjenama PCR-a, cilj je dobiti velike količine DNK regiona. Kako bi se utvrdilo da li je PCR uspješan, istraživač obično stavlja uzorak DNK na gel, boji gel etidijevim bromidom (EtBr) koji se veže na DNK, a zatim promatra gel pod UV svjetlom, što uzrokuje fluoresciranje EtBr. Ako se vidi bend ispravne

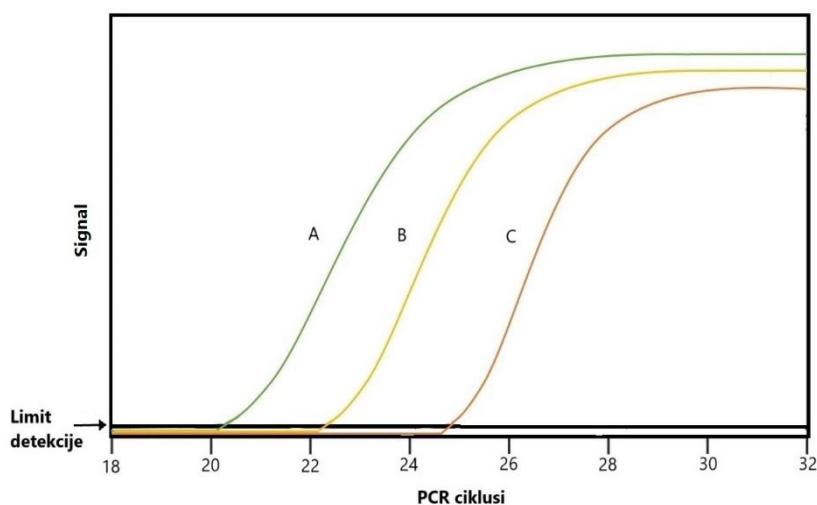
veličine, eksperiment je vjerojatno bio uspješan. Ovaj PCR pristup ponekad se naziva analiza krajnjeg produkta, jer se uspjeh eksperimenta procjenjuje nakon završetka PCR-a. Za usporedbu, **real-time PCR** tehnologija omogućuje kvantifikaciju specifičnih PCR produkata u "realnom vremenu". Budući da su PCR produkti u konačnici izvedeni iz uzorka DNK koji je inicijalno dodan u reakciju, ovaj pristup omogućuje istraživačima da odrede koliko je DNK, poput DNK koja kodira određeni gen, izvorno bilo u uzorku prije nego što je proveden PCR. Slično, ako je početni materijal mRNK koja se obrnuto transkribira u DNK, *real-time* PCR može se koristiti za određivanje koliko je mRNK iz određenog gena bilo u uzorku. To omogućuje kvantitativno mjerenje ekspresije gena. Pitanje koje se nameće jeste kako istraživači određuju količinu PCR produkta tokom *real-time* PCR-a? Postupak se provodi u termocikleru koji ima kapacitet za mjerenje promjena u nivou fluorescencije koju emitiraju molekule proba koje se dodaju u PCR reakciju. Fluorescencija koju emitiraju molekule probe ovisi o količini PCR produkta.

3.4.1 SYBR Green

Osnova *real-time* PCR-a leži u detekciji amplikona kako se isti formira, bez potrebe za zaustavljanjem reakcije i stavljanjem produkta na gel. Najjednostavniji način za razumijevanje jeste dodavanje, u PCR mješavinu, boje kao što je **SYBR Green** koja fluorescira kada se veže za dvolančanu DNK. Ovo je najjednostavniji i najjeftiniji način izvođenja PCR-a u realnom vremenu, jer je boja generička i mogu se koristiti isti prajmeri kao u bilo kojoj normalnoj PCR reakciji. Međutim, ova metoda može dovesti do artefakata, jer nećemo moći razlikovati proizvedeni signal ako je kreiran nespecifičan produkt.

Ako provodimo PCR reakciju na mašini koja ne samo da primjenjuje temperaturni ciklus potreban za PCR reakciju, već također detektira fluorescenciju uzoraka na kraju svakog ciklusa, tada možemo pratiti napredak našeg *real-time* PCR-a. Inicijalno, matrica je jednolančana, tako da nema signala. Stvaranje PCR amplikona tokom termalnih ciklusa vodi ka eksponencijalnom povećanju količine dvolančanog produkta prisutnog na termalnim koracima vezivanja i ekstenzije svakog ciklusa. Kako amplifikacija napreduje, formira se sve više dvolančanog produkta te se na kraju stvara

dovoljno produkta kako bi se omogućilo mašini da detektira rezultirajuću fluorescenciju (**Slika 3.6**). Nivo fluorescencije će se povećavati tokom određenog broja ciklusa, a ekstrapolacijom rezultirajuće krive nazad na nulu moguće je odrediti broj ciklusa koji je potreban za formiranje detektabilne količine amplikona. Ova vrijednost, poznata kao C_t vrijednost, u obrnutoj je povezanosti s početnom količinom matrice. Veće količine inicijalne matrice će rezultirati nižim C_t vrijednostima.



Slika 3.6 *Real-time* PCR. Uzorak A proizvodi signal koji se može detektirati nakon 20 ciklusa, tako da kažemo da ima C_t vrijednost 20. Ovo predstavlja više matrice nego u uzorcima B ($C_t = 22$) ili C ($C_t = 25$). Tokom eksponencijalne faze PCR amplifikacije, količina produkta se teoretski udvostručuje sa svakim ciklusom, pod uvjetom da reakcija radi sa 100% efikasnosti. Stoga, ako uzorci A i B imaju C_t vrijednosti u razmaku od dva ciklusa, tada je u početnoj reakcijskoj smjesi moralo biti približno četiri (2×2) puta više matrice za uzorak A. Isto tako, matrice za uzorak A mora biti 32 (2^5) puta više od matrice za uzorak C. U stvarnosti, većina reakcija nije 100% efikasna i uobičajeno je da se poredi amplifikacija sa standardnom krivom poznatih koncentracija matrice kako bi se osigurala precizna kvantitacija.

Važno je napomenuti da budući da će se SYBR Green vezati za bilo koju dvolančanu DNK, nema garancije (izuzev specifičnosti prajmera) da je detektirana fluorescencija posljedica formiranja specifičnog produkta. Ovo je moguće zaobići programiranjem mašine da generira temperaturnu krivu produkta nakon završetka amplifikacije. Temperatura topljenja fragmenta

DNK zavisi od njegove dužine i sekvence. Stoga se analiza **tačke topljenja** može koristiti za određivanje broja amplificiranih produkata u reakciji. Naime, reakcija se ohladi na temperaturu vezivanja nakon čega se temperatura polako podiže uz konstantno praćenje fluorescencije. Specifični ampliconi će imati karakterističnu tačku topljenja pri kojoj se gubi fluorescencija, dok će nespecifični produkti pokazati širok raspon tački topljenja što dovodi do postepenog gubitka fluorescencije uzorka. U tom smislu, ukoliko se prilikom analize pojavi samo jedna kriva, onda je tokom PCR-a formiran samo jedan amplicon, vjerovatno naš specifični produkt. Međutim, prisustvo višestrukih krivulja ukazuje da je došlo do nespecifične amplifikacije, umanjujući kvantitativnu prirodu PCR-a. U takvim okolnostima obično je potrebno dodatno optimizirati PCR uvjete ili kupiti nove prajmere.

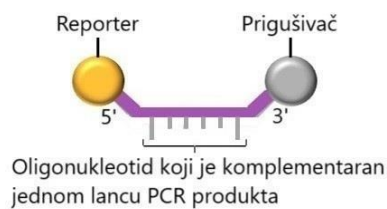
3.4.2 TaqMan

TaqMan proba je oligonukleotid koji ima **reporter** molekulu na jednom (5') kraju i molekulu **prigušivača** na drugom (3') kraju (**Slika 3.7A**). Oligonukleotid je komplementaran mjestu unutar PCR produkta od interesa. Reporter molekula emitira fluorescenciju na određenoj talasnoj dužini, ali tu fluorescenciju u velikoj mjeri apsorbira obližnji prigušivač. Stoga, neposredna blizina reporter molekule molekuli prigušivača sprječava detekciju fluorescencije iz reporter molekule, sve dok su i reporter i prigušivač unutar iste molekule (probe). Stoga se praktički fluorescencija ne emitira na početku reakcije. Kako reakcija napreduje, prajmer i oligonukleotidna TaqMan proba spajaju se s DNK matricom nakon koraka denaturacije (**Slika 3.7B**).

Tokom koraka ekstenzije prajmera, 5' - 3' egzonukleazna aktivnost *Taq* polimeraze cijepa oligonukleotid u TaqMan probi na pojedinačne nukleotide, odvajajući tako reporter od prigušivača. To omogućuje reporteru da emitira fluorescenciju. Kako se PCR produkti nakupljaju, sve više i više TaqMan proba se digestira, a time se i nivo fluorescencije povećava. Prema tome, intenzitet fluorescencije je direktno proporcionalan količini generiranog produkta. Važno je istaći da se dodatna prednost ovog pristupa ogleda u činjenici da je oligonukleotidna sekvenca komplementarna unutrašnjem dijelu amplicona, nezavisno od prajmera, što također povećava specifičnost reakcije. Kada se ovaj metod koristi za amplifikaciju cDNK, oligonukleotid se često dizajnira

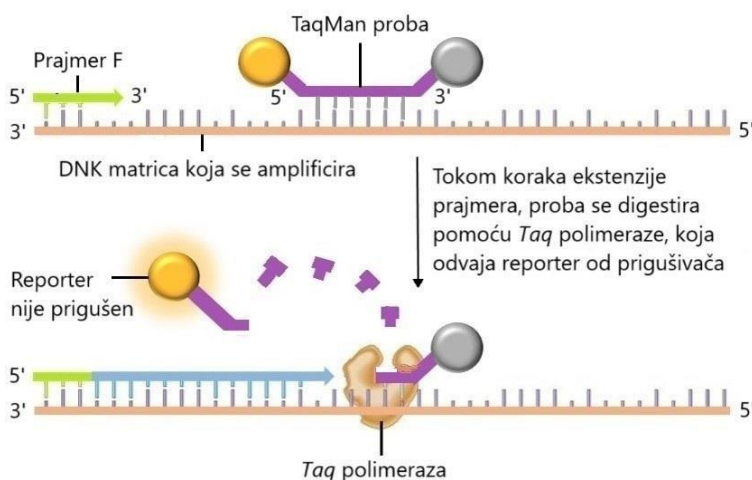
tako da obuhvati spoj dva egzona, kontrolirajući prisustvo kontaminirajuće DNK u eukariotskom uzorku. **Slika 3.8A** razmatra *real-time* PCR eksperiment koji se odvija tokom mnogih ciklusa, kao što je 20 do 40. *Real-time* PCR prolazi kroz tri glavne faze. U početku, kada je količina PCR produkta mala i reagensi nisu ograničavajući, PCR produkt se generira eksponencijalno i reakcija je blizu 100% učinkovitosti. Ovo eksponencijalno nakupljanje teško je otkriti u najranijim ciklusima jer je količina PCR produkta mala. Druga faza je relativno linearna jer se PCR produkti nastavljaju akumulirati, s tim da učinkovitost reakcije pada jer reagensi postaju ograničavajući. Konačno, u trećoj fazi, akumulacija PCR produkata dostiže plato kako se jedan ili više reagensa potroši.

A TaqMan proba



B Upotreba TaqMan probe u *real-time* PCR-u

Tokom koraka vezivanja prajmera, prajmer i TaqMan proba vežu se za DNK matricu



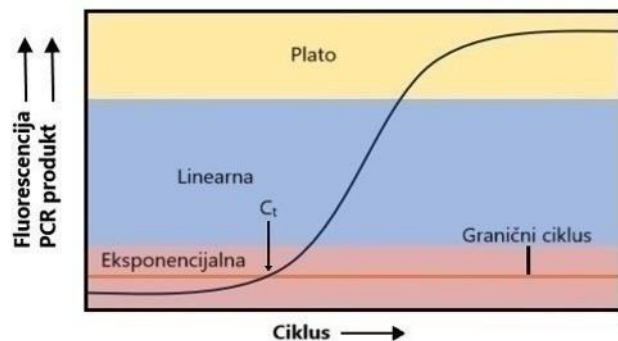
Slika 3.7 Primjer probe, označene kao TaqMan, koja se koristi u *real-time* PCR eksperimentu.

Tokom eksponencijalne faze PCR-a, količina PCR produkta proporcionalna je količini početne matrice koja je inicijalno dodana. Stoga se eksponencijalna faza PCR-a analizira kako bi se kvantificirala početna koncentracija uzorka. Metoda koja se često koristi naziva se **metoda graničnog ciklusa** (eng. *cycle threshold method*, C_t method). Granični ciklus (C_t) je postignut kada je akumulacija fluorescencije znatno veća od nivoa pozadine. Tokom ranih ciklusa, signal fluorescencije zbog pozadinske razine fluorescencije je veći od onog koji proizilazi iz amplifikacije PCR produkta. Nakon što se prekorači C_t vrijednost, može se izmjeriti eksponencijalna akumulacija produkta. **Slika 3.8B** prikazuje tri PCR ciklusa u kojima je DNK matrica inicijalno dodana u visokoj, srednjoj ili niskoj koncentraciji. Kada je početna koncentracija DNK uzorka viša, C_t se postiže u ranijem ciklusu amplifikacije.

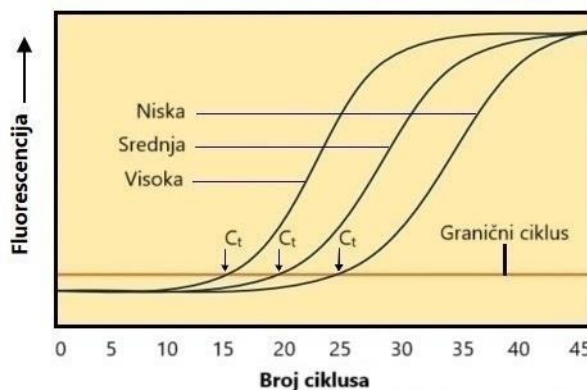
Kako bi se odredila količina početne DNK matrice, uzorak od interesa koji ima nepoznatu količinu početne DNK matrice poredi se s nekom vrstom standarda. *Real-time* PCR uključuje koamplifikaciju dvaju kalupa: uzorka od interesa i standarda. Dvije vrste PCR produkata mogu se pratiti istovremeno s fluorescentnim molekulama različitih boja. Mogu se koristiti različite vrste standarda. Jedna je mogućnost da se PCR mješavini doda standard poznate koncentracije. Na primjer, plazmidna DNK koja nosi određeni gen može se dodati u PCR smjesu u poznatim količinama, a amplifikacija ovog plazmidom kodiranog gena dala bi standard. Poređenjem C_t vrijednosti standarda i nepoznatog uzorka moguće je odrediti koncentraciju nepoznatog uzorka. To je shematski prikazano na **Slici 3.8C**, ali se zapravo radi pomoću računarskog softvera. Alternativno, moguće je koristiti interni standard u kojem je drugi gen koji je već prisutan u uzorku također pojačan. Ova metoda relativne kvantifikacije je nešto jednostavnija. Količina nepoznate DNK matrice od interesa izražava se u odnosu na interni standard.

3.4.3 Molekularni svjetionici

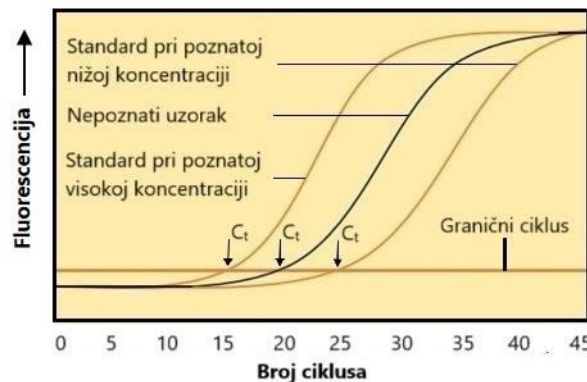
Molekularni svjetionici (eng. *Molecular Beacons*, MBs) predstavljaju idealnu probu zasnovanu na hibridizaciji za detekciju kratkih oligonukleotida, i stoga je pogodna proba za *real-time* PCR. Naime, MB proba također posjeduje **reporter** i **prigušivač**, ali za razliku od linearne probe kakvu susrećemo u TaqMan metodi, proba je dizajnirana sa komplementarnim krajevima koji



A Faze PCR-a



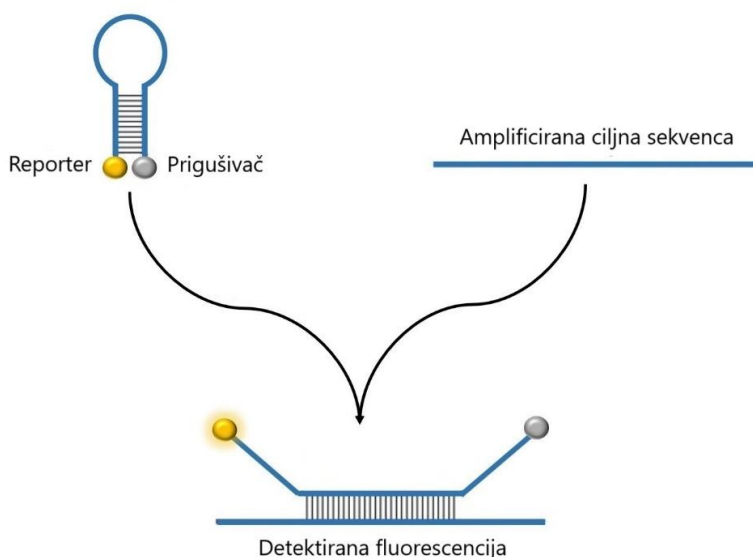
B Real-time PCR pri visokim, srednjim i niskim koncentracijama početne DNK matrice



C Poređenje između nepoznatog uzorka i standarda poznatih koncentracija

Slika 3.8 Primjeri podataka koji su dobijeni iz *real-time* PCR eksperimenta. A: Tri faze koje se javljaju u tipičnom PCR eksperimentu; B: PCR izveden pri tri različite početne koncentracije matrice; C: Poređenje između uzorka sa nepoznatom količinom DNK matrice i standarda.

formiraju strukturu ukosnice, pri čemu petlja sadrži sekvencu komplementarnu ciljnoj sekvenci (**Slika 3.9**). Ovdje, kombinacija reporter/prigušivač funkcionira na drugačiji način od onog koji se koristi u TaqMan proceduri, u smislu da je fluorescencija prigušena samo ukoliko su obje molekule u blizini. Kada se proba veže za amplificirani DNK lanac, konformacija ukosnice se gubi, a reporter se aktivira, jer više nije fizički blizu prigušivaču.



Slika 3.9 *Real-time* PCR: molekularni svjetionici.

U *real-time* PCR-u, MB hibridizira s DNK matricom u koraku vezivanja i direktno proizvodi fluorescentni signal. Stoga ne zahtijeva polimerazu s egzonukleaznom aktivnošću, koja je neophodna za TaqMan probu. U koraku ekstenzije, polimeraza će produžiti sekvencu i pomaknuti MB, vraćajući ga u konformaciju petlje. U tom slučaju, proba se može ponovno upotrijebiti u preostalim ciklusima. Molekularni svjetionici bi trebali biti dizajnirani za hibridizaciju na 7-10°C višoj temperaturi od prajmera, kako bi se osigurala detekcija prije nego dođe do ekstenzije prajmera. Stoga bi proba trebala biti dovoljno kratka da garantira potpunu hibridizaciju, ali ne toliko kratka da se može ponovno smotati u strukturu petlje nakon premještanja molekularnog svjetionika ekstenzijom prajmera.

Unatoč poteškoćama u dizajniranju i optimiziranju prikladnog MB, MB *real-time* PCR testovi su jednostavni, brzi, osjetljivi i tačni, omogućujući format visoke propusnosti i dopuštajući višestruku detekciju u jednoj tubici korištenjem različitih probi za označavanje. Budući da detekcija zavisi od relativne stabilnosti ukosnice i vezivanja ciljne sekvence, ona je specifičnija od TaqMan proba. PCR tehnika bazirana na MB široko se koristi u analizi jednonukleotidnih polimorfizama, detekciji i kvantitaciji nukleinske kiseline u realnom vremenu, diskriminaciji alela i drugim kliničkim testovima.

4

Metode izotermalne amplifikacije

Irma Mahmutović-Dizdarević

Bez sumnje, PCR je najpoznatija i najsenzitivnija metoda amplifikacije nukleinskih kiselina, sa velikim fundamentalnim i aplikativnim značajem. Ipak, PCR tehnika zahtijeva upotrebu posebnih aparata (eng. *thermocyclers*) koji imaju mogućnost kontrole temperature, čime se osigurava da svaka od faza PCR tehnike bude adekvatno izvedena. Upravo zbog toga, pojavila se potreba za razvijanjem drugih amplifikacijskih metoda koje bi se izvodile na konstantnoj temperaturi. One su poznate kao **metode izotermalne amplifikacije** (eng. *Isothermal Amplification*, IA), a dizajnirane su s ciljem implementacije jednostavnijih protokola i izmještanja molekularne dijagnostike iz centraliziranih laboratorija.

Postoji veći broj izotermalnih amplifikacijskih platformi, među kojima su najreprezentativnije: amplifikacija zasnovana na nukleinsko kiselinskoj sekvenci (eng. *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*, NASBA), amplifikacija premještanjem lanca (eng. *Strand Displacement Amplification*, SDA), izotermalna amplifikacija posredovana petljom (eng. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP), rekombinazna polimerazna amplifikacija (eng. *Recombinase Polymerase Amplification*, RPA), te amplifikacija kotrljajućeg prstena (eng. *Rolling Circle Amplification*, RCA). Pored navedenih tehnika postoje i druge, sve popularnije metode izotermalne amplifikacije kao što su: amplifikacija višestrukim premještanjem (eng. *Multiple Displacement Amplification*, MDA), eksponencijalna amplifikacijska reakcija (eng. *Exponential Amplification Reaction*, EXPAR), amplifikacijska reakcija urezivanja

i izduživanja (eng. *Nicking and Extension Amplification Reaction*, NEAR), amplifikacija ovisna o helikazi (eng. *Helicase Dependent Amplification*, HAD), hibridizacijska lančana reakcija (eng. *Hybridization Chain Reaction*, HCR) itd. Komparativni prikaz osnovnih odlika odabranih metoda izotermalne amplifikacije, kao i PCR tehnike predstavljen je u **Tabeli 4.1**.

4.1 Amplifikacija zasnovana na nukleinsko kiselinskoj sekvenci

Tehnika **amplifikacije zasnovane na nukleinsko kiselinskoj sekvenci** poznatija je pod akronimom **NASBA** (eng. *Nucleic Acid Sequence-based Amplification*), a kolokvijalno se naziva i „samoodrživa replikacija sekvence“ (eng. *self-sustained sequence replication*). Radi se o osjetljivom amplifikacijskom sistemu zasnovanom na transkripciji (eng. *Sensitive Transcription-Based Amplification System*, TAS), koji služi za specifičnu replikaciju nukleinskih kiselina in vitro. Kompletna amplifikacija se odvija na predefiniranoj temperaturi od 41 °C, a u ovu homogenu izotermalnu reakciju uključena su tri enzima: **reverzna transkriptaza, RNA-za H i T7 DNK-ovisna RNK polimeraza** (**Slika 4.1**). Zbog integracije reverzne transkriptaze u amplifikacijski proces, metod je osobito prikladan za RNK analite, kao što su iRNK, rRNK, te genomska RNK.

4.1.1 RNK NASBA

Nakon kratke inkubacije na temperaturi od 65 °C s ciljem denaturacije ciljne molekule, specifičan direktni prajmer hibridizira sa RNK. Ovaj prajmer posjeduje sekvencu koja je komplementarna ciljnoj RNK, kao i posebnu 5' sekvencu koja odgovara promotoru T7 DNK-ovisne RNK polimeraze. Na temperaturi od 41 °C, prajmer se izdužuje aktivnošću reverzne transkriptaze. Istovremeno, RNK iz formiranog RNK-cDNK hibrida se degradira usljed aktivnosti enzima RNA-ze H. Na ovaj način omogućena je hibridizacija specifičnog reverznog prajmera na cDNK. Ekstenzija ovog prajmera djelovanjem reverzne transkriptaze do 5' kraja cDNK, rezultira nastankom dvolančane T7 promotorske sekvence. Dvolančani promotor dalje koristi T7 DNK-ovisna RNK polimeraza za produkciju brojnih novih RNK molekula koje su komplementarne ciljnoj RNK.

Tabela 4.1 Osnovne odlike metoda izotermalne amplifikacije u odnosu na PCR tehniku.

Odlika	PCR	NASBA	LAMP	SDA	RCA	RPA
Broj enzima	1	3	1	2	2	2
Dizajn/broj prajmera	Jednostavan/2	Jednostavan/2	Kompleksan/ 4 ili 6	Kompleksan/ 2 ili 4	Jednostavan/2	Jednostavan/2
Temperatura	<i>Thermocycler</i> (95, 50-65, 72 °C)	Izotermalno ~41 °C	Izotermalno 60-65 °C	Izotermalno 37 °C	Izotermalno 30 °C	Izotermalno 37-42 °C
Vrijeme reakcije	2-3 h	1.5-2 h	<1 h	2 h	1.5 h	20-40 min
Ciljna molekula	DNK (RNK)	ssRNK (DNK)	dsDNK (RNK)	ssDNK (RNK)	Cirkularna DNK (RNK)	dsDNK
Amplikon	dsDNK	RNK, DNK	Konkatenirana DNK	dsDNK	Cirkularna DNK	Duga dsDNK
Senzitivnost	1-10 kopija	Jedna kopija	Jedna kopija	10 kopija	10 kopija	Jedna kopija
Detekcija	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i> , ELISA	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i> , ELISA, ECL	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i> , turbiditet	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i>	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i>	Gel elektroforeza, <i>Real-time</i> , ELISA
Tolerantnost na kontaminaciju	Niska	Srednja	Visoka	Niska	Niska	Visoka
Inicijalna denaturacija matrice	Da	Ne	Ne	Da	Ne	Ne
Procesivnost matrice	Zagrijavanje	RNA-za H	<i>Bst</i> polimeraza	Restriksijski enzimi, zagrijavanje	Φ29 DNK polimeraza	Rekombinaza

(Preuzeto i prilagođeno iz Oliveira i sar., 2021)

Nakon ove **inicijalne faze**, u NASBA tehnici slijedi **amplifikacijska (ciklična) faza**. Reverzni prajmer hibridizira sa novoformiranom RNK i tokom ekstenzije prajmera, RNA-za H će degradirati RNK molekulu iz RNK-cDNK hibrida. Nadalje, direktni prajmer se veže za cDNK. Usljed ove hibridizacije, reverzna transkriptaza ima mogućnost daljeg izduživanja cDNK korištenjem direktnog prajmera kao matrice. Ponovno se formira dvolančana T7 promotorska sekvenca i produkuje se nova RNK usljed aktivnosti T7 DNK-ovisne RNK polimeraze, čime se pokreće novi ciklus amplifikacijske faze.

4.1.2 DNK NASBA

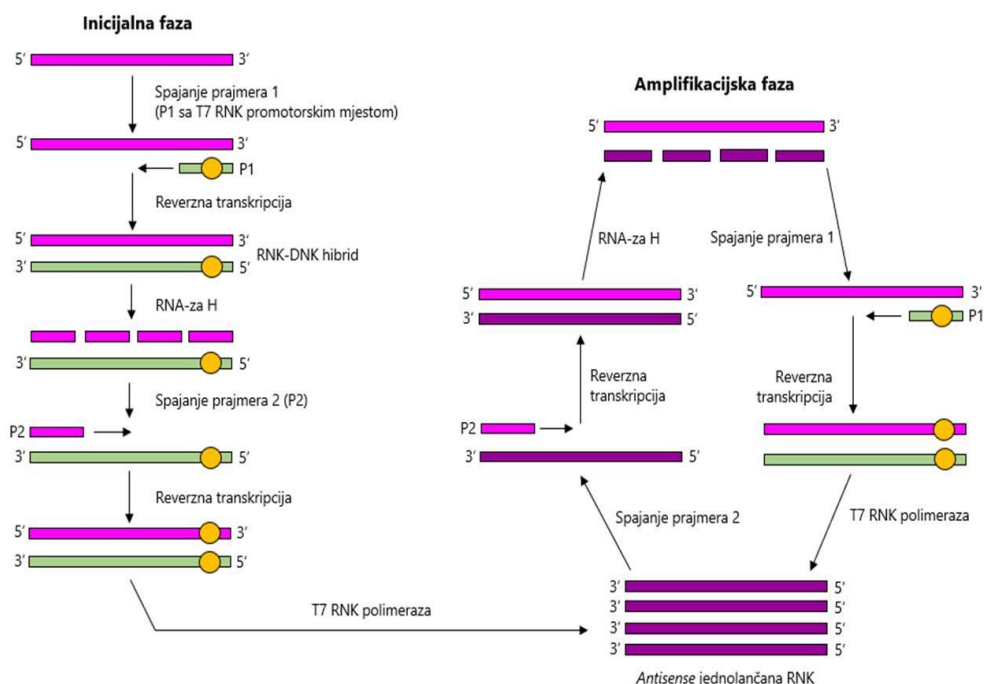
U ovoj verziji NASBA tehnike prije svega se izvode koraci denaturacije, što omogućava uspješno vezivanje dvaju prajmera na ciljnu sekvencu. Nakon prvog koraka denaturacije na 95 °C, direktni prajmer (jedini prajmer koji je prisutan u ovom koraku) će se vezati za molekulu DNK. Nakon dodavanja reverzne transkriptaze dolazi do ekstenzije prajmera. Nadalje, dodaje se reverzni prajmer i naredni denaturacijski korak omogućava prajmeru da se veže za ekstenzijski produkt direktnog prajmera. S obzirom da denaturacija inaktivira reverznu transkriptazu, ovaj enzim se mora ponovno dodati skupa sa RNA-zom H i T7 DNK-ovisnom RNK polimerazom, te dolazi do ekstenzije reverznog prajmera do 5' kraja direktnog prajmera. S obzirom da 5' kraj direktnog prajmera uključuje T7 promotorsku sekvencu, postiže se dvolančani T7 promotor kojeg prepoznaje T7 DNK-ovisna RNK polimeraza i počinje produkcija RNK čime započinje ciklična faza NASBA procedure. Ona je identična onoj kod RNK NASBA protokola, a produkt koji nastaje je ponovno jednolančana RNK molekula, komplementarna ciljanom DNK lancu.

Jednolančani RNK amplikon koji nastaje tokom amplifikacije je vrlo podesan za korištenje detekcijskih sistema zasnovanih na hibridizaciji sa specifičnim probama. Detekcija NASBA produkata odvija se na kraju amplifikacije u procesu elektro-hemiluminiscencije (eng. *Electro-Chemiluminescence*, ECL). S ciljem kvantifikacije količine ciljne nukleinske kiseline, u NASBA proceduru se uključuje i kalibrator, koji se dodaje prije nukleinskih kiselina, te se kao takav istovremeno ekstrahuje i amplificira sa ciljnom nukleinskom kiselinom. Na ovaj način ostvarena je kontrola cjelokupnog procesa. Dakle, NASBA podrazumijeva amplifikaciju ciljne nukleotidne sekvence pod izotermičkim

uslovima, bez upotrebe amplifikacijskih aparata. Uobičajena temperatura koja se održava prilikom izvođenja ovog protokola je 41 °C.

Na svojevrsan način, NASBA amplifikacija se bazira na imitiranju replikacije retrovirusa, odnosno produkcije RNK kopija na osnovu DNK intermedijera. U toku NASBA amplifikacije, najznačajniji i najobilniji produkti su molekule RNK nastale po principu transkripcije, dok su RNK-DNK hibridi i dvolančane DNK molekule sporedni produkti amplifikacijskih reakcija in vitro. Prednost NASBA amplifikacije je što se cijela procedura izvodi u jednoj epruveti, pri stalnoj temperaturi, bez instrumenata i sa svega nekoliko manipulacija.

NASBA metod se koristi za rapidnu dijagnostiku patogenih virusa sa jednonlačanim RNK genom kakvi su: influenza A, virus slinavke i šapa, SARS-asocirani koronavirus i humani Boca virus. Metoda je pogodna i za kvantitativno te kvalitativno određivanje RNK virusa, kao što su HIV, HCV itd. Nedostaci metode su prije svega mogućnost nespecifičnog vezivanja prajmera, zbog niskih temperatura u odnosu na PCR, te upotreba termolabilnih enzima i izvođenje posebnih predtretmana prije amplifikacije.

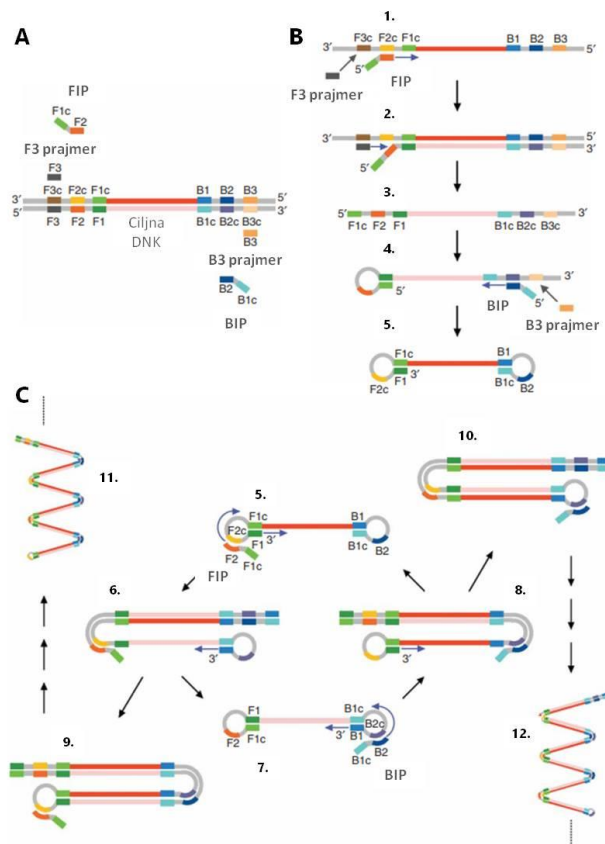


Slika 4.1 Faze u implementiranju NASBA tehnike.

4.2 Izotermalna amplifikacija posredovana petljom

Metoda izotermalne amplifikacije posredovana petljom (eng. *Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP) se veoma često koristi, citirana je u brojnim naučnim publikacijama, kao i kliničkim testiranjima. Metoda počiva na mogućnosti enzima DNK polimeraze da premješta lance, što je kombinirano sa skupom od četiri ili šest jedinstvenih prajmera. U poređenju sa drugim metodama amplifikacije nukleinskih kiselina, LAMP tehnika je 10 do 100 puta senzitivnija od PCR tehnike, sa limitom detekcije od jedne kopije po mikrolitru matrice, čime pokazuje i veću specifičnost, dok je vrijeme amplifikacije najčešće manje od jednog sata, na temperaturi od 60-65 °C, pri čemu se generiše oko 10^9 kopija. Dodatnu prednost predstavljaju činjenice da ova tehnika ne zahtijeva inicijalnu denaturaciju matrice na temperaturi od 95 °C, kao i to da je manje osjetljiva na prisustvo inhibitornih supstanci koje su često prisutne u biološkim uzorcima. Nadalje, produkti LAMP metode se mogu vizualizirati golim okom (npr. turbidimetrijski).

LAMP koristi polimerazu sa aktivnošću premještanja lanca, te četiri para prajmera koji prepoznaju ukupno šest različitih sekvenci na ciljnoj DNK. Direktni unutrašnji prajmer (eng. *Forward Inner Primer*, FIP) hibridizira sa dsDNK metom i pokreće reakciju. Sinteza DNK započinje DNK polimerazom nakon vezivanja vanjskog prajmera (F3) na komplementarnu regiju, a njegova ekstenzija uzrokuje premještanje lanca čime se oslobađa ssDNK molekula. Ova molekula služi kao matrica za vezivanje drugog unutrašnjeg (eng. *Backward Inner Primer*, BIP) i vanjskog (B3) prajmera, čime nastaje DNK struktura nalik na petlju. Nakon toga, LAMP reakcija ulazi u cikličnu fazu u kojoj jedan unutrašnji prajmer hibridizira sa petljom i inicira premještanje sinteze DNK, zbog čega pored originalne petlje nastaje nove petlja koja je duplo duža (**Slika 4.2**). Ciklična reakcija se nastavlja, što dovodi do akumulacije oko 10^9 kopija ciljne molekule u formi konkatemera za manje od jednog sata. Glavne odlike LAMP metode su visoka specifičnost i mogućnost amplifikacije bez sofisticirane opreme, zbog čega se opravdano smatra adekvatnom alternativom PCR tehnike. Ova metoda se koristi za detekciju patogena, na primjer koronavirusa, bakterijskih sojeva otpornih na meticilin (eng. *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), tuberkuloze,



Slika 4.2 Principi LAMP metode. A: Dizajniranje prajmera. Određeno je šest različitih regija na ciljnoj DNK, označenih kao F3, F2, F1, B1c, B2c i B3 od 5' kraja. Kako c predstavlja komplementarnu sekvencu, F1c sekvenca je komplementarna F1 sekvenci. Koriste se dva unutrašnja prajmera (FIP i BIP), te vanjski prajmeri (F3 i B3). FIP (BIP) je hibridni prajmer koji se sastoji od F1c (B1c) sekvence i F2 (B2) sekvence; B: Korak početka produkcije strukture. DNK sinteza je inicirana od mjesta FIP. F2 region se veže za F2c region na ciljnoj DNK i inicira elongaciju. Amplifikacija DNK se nastavlja sa BIP na sličan način. F3 prajmer se veže za F3c regiju ciljne DNK, te dolazi do sinteze DNK premještanjem lanca. DNK lanac koji je produžen od FIP se zamjenjuje i otpušta. Otpušteni pojedinačni lanac formira strukturu nalik na petlju na svom 3' kraju (struktura 3). DNK sinteza se nastavlja sa jednolančanom DNK kao matricom, te BIP i B3 prajmerima, na isti način kako je ranije opisano, do nastanka structure 5 koja posjeduje strukturu petlje na oba kraja; C: Korak ciklične amplifikacije. Koristeći vlastitu strukturu kao matricu, DNK sinteza se inicira od 3' kraja F1 regiona, a elongacija počinje vezivanjem FIP na jedan lanac F2c regije u strukturi petlje. Kroz određeni broj koraka nastaje struktura 7, koja je komplementarna strukturi 5, a struktura 5 nastaje iz strukture 8 u reakciji koja podsjeća na onu koja vodi od strukture 5 do 7. Strukture 9 i 10 nastaju od strukture 6 i 8, a produkuju se i nešto duže strukture 11 i 12. (Preuzeto i prilagođeno iz Tomita i sar., 2008)

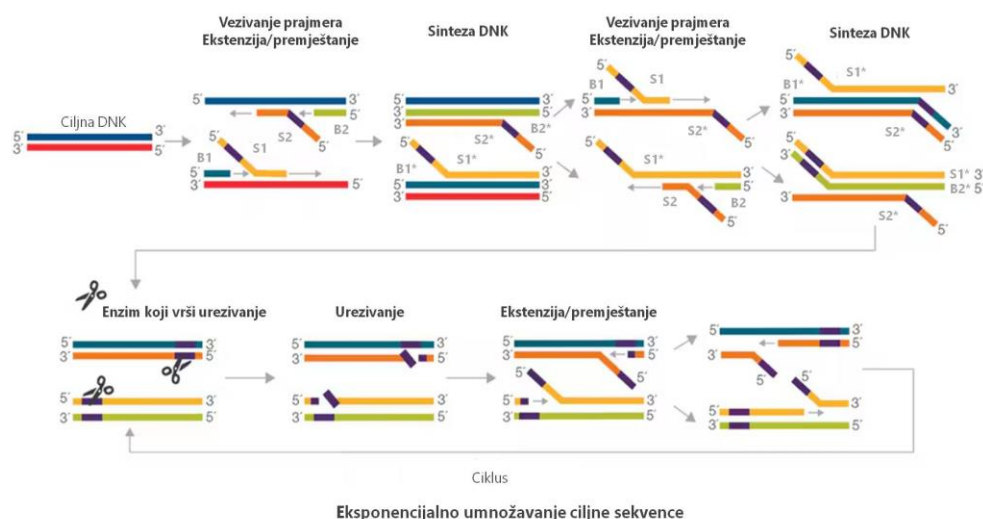
influenza A virusa, Zika virusa, adenovirusa, Varicella-zoster virusa. Osim toga, nalazi primjenu u SNP genotipizaciji, dijagnostici kancera (na primjer u detekciji metastaza gastričnog kancera), monitoringu mutacija *KRas* gena, skriningu drugih mutacija asociranih sa kancerom itd. LAMP tehnika ima važnu ulogu i u kontroli kvaliteta hrane i prehrambenih produkata, na primjer u detekciji bakterija kao što su *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, te nekih alergena. Zbog svog robusnog i brzog izotermalnog amplifikacijskog profila, LAMP metoda je postala vrlo podesna u molekularnim analizama, a vremenom je modificirana i digitalizirana, te su osmišljene njene brojne inačice.

4.3 Amplifikacija premještanjem lanca

Metoda amplifikacije premještanjem lanca (eng. *Strand Displacement Amplification*, SDA) počiva na mogućnosti prajmera i enzima da premještaju lance. U ovoj tehnici kombinirana je aktivnost endonukleaze, DNK polimeraze bez egzonukleazne aktivnosti, te dva seta prajmera. Prvi set prajmera karakterizira prisustvo jednolančanog restrikcijskog mjesta u prevjesu, dok su prajmeri drugog seta označeni kao „bumper“ (eng. *bumper*: branik, odbojnik) prajmeri jer podržavaju premještanje amplifikacijskog produkta prvog seta prajmera. Dvolančana DNK molekula se inicijalno izlaže denaturaciji zagrijavanjem, čime je omogućena hibridizacija prvog seta prajmera sa prevjesom na 5' kraju koji posjeduje specifično mjesto prepoznavanja za HincII restrikcijski enzim. Usljed tiolne modifikacije dATP-a, HincII izrezuje samo originalni prajmer, ali ne i novosintetizirani lanac, što rezultira prevjesom na 3' kraju. Dalja ekstenzija se dešava posredstvom Klenow polimeraze bez egzonukleazne aktivnosti i dolazi do premještanja nizvodnog DNK lanca, u rasponu temperature od 30-50 °C. Eksplozivna amplifikacija je ostvarena udruživanjem *sense* i *antisense* reakcija, u kojima premješteni *sense* lanac služi kao matrica za *antisense* reakciju i obrnuto (**Slika 4.3**). U toku jedne reakcije može nastati oko 10^9 kopija DNK.

Unatoč prednostima izotermalne reakcije, niske temperature čine ovu tehniku sklonom nespecifičnom vezivanju prajmera, što može uzrokovati nespecifičnu amplifikaciju, slično kao u NASBA metodi. Ovaj fenomen ima kritičnu važnost u široj implementaciji metode u dijagnostičke svrhe, s obzirom da DNK i RNK

iz kliničkih uzoraka često sadrže nekoliko potencijalno sličnih ciljnih sekvenci (na primjer genske familije, homologni lokusi itd.). SDA predstavlja dobar izbor za umnožavanje kratkih ciljnih sekvenci i zahtijeva inicijalnu denaturaciju matrice. Vrlo je učinkovita tehnika kod malih fragmenata (50-120 bp), zbog čega nalazi svoje mjesto u profiliranju ekspresije mikro RNK. Dosta se koristi u kliničkoj dijagnostici patogena kao što su *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i herpes simplex virus.

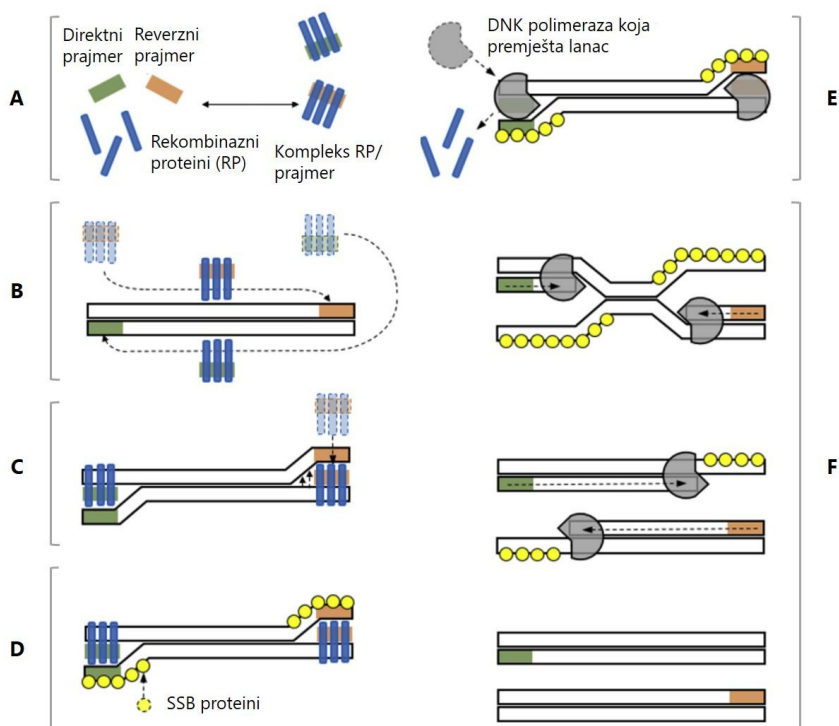


Slika 4.3 Shematski prikaz SDA tehnike. S1, S2, S1*, S2*: SDA prajmeri; B1, B2, B1*, B2*: bumper prajmeri. (preuzeto i prilagođeno iz Walker i sar., 1992).

4.4 Rekombinazna polimerazna amplifikacija

Rekombinazna polimerazna amplifikacija (eng. *Recombinase Polymerase Amplification*, RPA) je izotermalna reakcija koja se odvija na niskoj temperaturi, najčešće između 37 °C i 42 °C. U reakciji učestvuju dva različita enzima: rekombinaza i DNK polimeraza, te proteini koji se vežu za jednolančanu DNK (eng. *Single Stranded DNA-binding Proteins*, SSB), kako bi se osigurala stabilnost molekule. Sama amplifikacija se odvija kroz 20-40 minuta, pa se ova tehnika smatra jednom od najbržih tog tipa. RPA reakcija počinje vezivanjem rekombinaznog proteina (RecA iz *E. coli* ili uvsX iz T4-sličnog bakteriofaga) za prajmere u prisustvu ATP-a i agensa velike molekulske težine (eng. *crowding agent*), čime dolazi do formiranja

karakterističnog kompleksa. Potom novonastali kompleks pretražuje dsDNK tražeći homolognu sekvencu, te nakon ostvarivanja homologije kompleks potiče premještanje lanca i nastaje struktura nalik na petlju u obliku slova D (eng. *D-loop structure*; *displacement loop*; DNK struktura gdje se dva lanca dvolančane DNK razdvajaju, istežu i drže odvojenim trećim DNK lancem). Ova struktura se stabilizira navedenim SSB proteinima i promovira se hibridizacija prajmera i ciljne molekule.



Slika 4.4 Amplifikacijska shema RPA metode. A: Rekombinazni proteini formiraju kompleks sa svakim prajmerom; B: pretraživanje DNK za homolognom sekvencom; C: Prajmeri se vežu za mjesto prepoznavanja; D: SSB proteini stabiliziraju premješteni DNK lanac; E: Nakon odvajanja rekombinaze, 3' kraj prajmera je dostupan DNK polimerazi sa mogućnosti premještanja lanca; F: Elongacija prajmera. (Preuzeto i prilagođeno iz Lobato i O'Sullivan, 2018)

U konačnici, rastavljanje rekombinaze omogućava DNK polimerazi sa mogućnosti premještanja lanca da se veže na 3' kraj prajmera i izdužuje ga u prisustvu dNTP-ova. Eksponencijalna amplifikacija se ostvaruje cikličnim ponavljanjem opisanog procesa (**Slika 4.4**). RPA metodom je moguća

detekcija brojnih mikroorganizama kao što su *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, te virusa kao što su HIV, SARS-CoV-2 itd. Nadalje, tehnika nalazi aplikaciju i u biomedicini gdje se koristi u praćenju biomarkera određenih bolesti, potom u prehrambenoj industriji, te poljoprivredi. Najveće prednosti RPA metode su jednostavnost, visoka senzitivnost, selektivnost, kompatibilnost sa višestrukim reakcijama, vrlo brza amplifikacija, te operiranje na niskoj i konstantnoj temperaturi, bez potrebe za inicijalnom denaturacijom i bez upotrebe višestrukih prajmera.

4.5 Amplifikacija kotrljajućeg prstena

Ova metoda (eng. *Rolling Circle Amplification*, RCA) također koristi izotermalne uslove amplifikacije i to na niskim temperaturama od 23 °C do 60 °C. Sam sistem zahtijeva DNK polimerazu sa mogućnosti premještanja lanca, koja u prisustvu cirkularne matrice (plazmid, bakteriofagi, DNK/RNK iz virusa ili bakterije itd.) i specifičnog prajmera generiše dugu DNK molekulu sa tandemskim ponavljanjima. **RCA mehanizam** koristi cirkularnu DNK kao dominantan tip matrice, ali u prisustvu linearne DNK može doći do formiranja surogat cirkularne intermedijerne matrice koja se potom koristi za dalje korake u procesu umnožavanja. Glavne prednosti RCA sistema su izotermalni uslovi na niskim temperaturama, sa inkubacijom na 23 °C, te jednostavnost mehanizma (jedan prajmer i produktivna DNK polimeraza) sa velikom učinkovitošću amplifikacije (oko 10^3 kopija za manje od jednog sata), što može biti i poboljšano dodavanjem ssDNK-vezujućih proteina. Ključna osobina RCA tehnike je mogućnost produkcije dugih fragmenata, što se koristi u procesima amplifikacije kompletnog genoma, osobito u analizi virusnih DNK genoma. Metoda se izvodi i kod istraživanja kompleksnih bioloških matrica (u ćeliji ili na površini ćelije), čime je omogućena detekcija na molekularnom nivou. Nadalje, RCA tehnika se često koristi u biotehnologiji, a aktuelna je i komercijalizacija dijagnostičkih paketa zasnovanih na ovoj metodi.

5

Analiza genetske varijacije

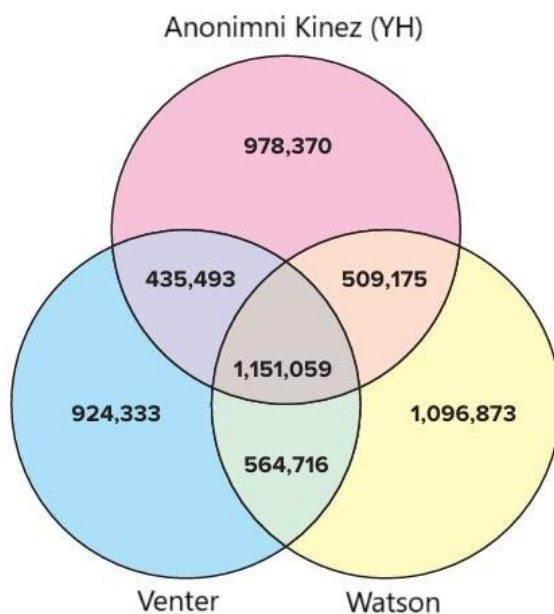
Aner Mešić

Prema centralnoj dogmi molekularne biologije, naslijeđene karakteristike organizma predstavljaju odraz strukture i organizacije gena. Ipak, treba imati na umu da ovo uključuje izuzetno složen set interakcija između različitih gena i njihovih produkata, kao i okolinskih faktora. Tako npr., gen odgovoran za određenu osobinu može imati apsolutno identičnu sekvencu kod dvije individue, ali uočeni fenotip može biti različit zbog varijacije u drugim genima koji utječu na njegovu ekspresiju ili zbog promjena u drugim ćelijskim komponentama koje utječu na aktivnost proteina kodiranih od strane tih gena. S druge strane, okolinski faktori imaju veliku ulogu u određivanju karakteristika organizma. Isto tako, važno je podsjetiti se da epigenetski faktori (npr. nasljedne promjene u ekspresiji gena uzrokovane mehanizmima koji ne predstavljaju promjenu u osnovnoj sekvenci DNK, kao što je CpG metilacija) igraju važnu ulogu u određivanju ekspresije gena.

Analiza genetske varijacije može se koristiti za ispitivanje razlika između pripadnika iste vrste, u rasponu od proučavanja otpornosti bakterija na antibiotike do analize humanih genetskih bolesti, kao i forenzičke diferencijacije između pojedinaca. Također, ovom vrstom analize možemo porediti genetski sastav pripadnika različitih vrsta, čak i u širokim taksonomskim rasponima, a što nam može dati vrijedne informacije o procesima evolucije te definiranju taksonomskih odnosa između vrsta.

Naime, genomi Jamesa Watsona (jedan od istraživača poznat po otkrićima koja se tiču dvostruke spirale DNK), J. Craiga Ventera (pionira DNK

sekvenciranja) i anonimnog Kineza (YH) otkrivaju ukupno više od 5,6 miliona pojedinačnih nukleotidnih razlika u odnosu na standardni humani genom (GenBank RefSeq) (**Slika 5.1**). Diploidni genom svakog čovjeka sadrži oko 1 milion jedinstvenih **DNK polimorfizama** (odnosno, razlika u sekvenci) koje ne dijeli nijedna druga osoba, dok je preostalih oko 2,6 miliona polimorfizama zajedničko u genomima dvije ili u nekim slučajevima sve tri prikazane individue. Zapravo, ne samo da ne postoji jedinstvena sekvenca ljudskog genoma divljeg tipa, čak ne postoji ni takva stvar kao što je dužina humanog genoma divljeg tipa. Delecije, insercije i duplikacije DNK rezultiraju dužinama genoma koje se razlikuju za čak 1% kod zdravih ljudi. Na primjer, genomi Watsona i Ventera variraju prema malim insercijama i delecijama genetskog materijala na preko 100.000 genomskih mjesta.



Slika 5.1 Poređenje tri personalna genoma. Pojedinačne nukleotidne supstitucije u genomima J. Craiga Ventera, Jamesa Watsona i anonimnog Kineza (YH), sve u odnosu na humani RefSeq. Supstitucija se broji jednom bez obzira da li je osoba homozigotna ili heterozigotna za datu varijantu. Brojevi supstitucija jedinstvenih za genom svake od tri osobe nalaze se u dijelovima svakog kruga koji se ne preklapaju. Varijante koje nisu u humanom RefSeq-u, ali koje dijele dvije od tri osobe, prikazane su u regijama dvostrukog preklapanja. Centralno postavljeno trostruko preklapanje ukazuje na varijante koje dijele sve tri individue.

Neki od miliona DNK polimorfizama između genoma Watsona i Ventera moraju biti odgovorni za fenotipske razlike koje ih izdvajaju kao pojedince. Ali u stvarnosti samo mali dio ovih promjena DNK sekvence zapravo utječe na fenotip. Preciznije, samo oko 5000 od miliona razlika između ove dvije osobe mijenja aminokiselinske sekvence proteina. Pored otprilike 5000 mutacija koje mijenjaju aminokiseline, nekoliko hiljada drugih polimorfizama između ova dva genoma vjerovatno utječe na ekspresiju gena, na primjer na učestalost transkripcije ili efikasnost prekrajanja primarnog transkripta za stvaranje mRNK. Ali čak i nakon što ih uzmemo u obzir, ostaje nam zaključak da su velika većina razlika u sekvenci između genoma **anonimni DNK polimorfizmi** koji ne utječu ni na prirodu ni na količinu bilo kojeg proteina u tijelu. Postojanje tako ogromnog broja anonimnih DNK polimorfizama koji razlikuju različite humane genome predstavlja izazove i mogućnosti za genetičare. Izazovi su poprilično jasni, a ogledaju se u tome kako možemo razvrstati milione polimorfizama u nečijoj DNK da bismo pronašli nekoliko relevantnih za osobine kao što su genetske bolesti? Mogućnosti leže u činjenici da čak i ako je polimorfizam anoniman, on ipak služi kao putokaz u genomu, predstavljajući **DNK marker**. DNK polimorfizmi koji dovode do missense, nonsense i frameshift mutacija ili do izmjene okvira čitanja imaju sposobnost promjene identiteta aminokiselina i funkcije proteina (utječući tako i na fenotip), označavaju se kao **neanonimni DNK polimorfizmi**.

Termini polimorfizam i mutacija često se koriste na zamjenjiv način kako bi se opisale genetske varijante. Ipak, važno je istaći da oba termina imaju precizne definicije. U tom smislu, **polimorfizam** predstavlja stabilno, multigeneracijsko postojanje multiplih alela na određenom genskom lokusu. S druge strane, **mutacija** je pojedinačni događaj koji vodi ka promjeni bazne sekvence kod jedne individue. U praksi, termin polimorfizam se koristi za opis varijante koja se pojavljuje prilično često u populaciji (npr., >1%), dok se termin mutacija koristi za opisivanje rjeđih varijanti. Prema tome, ne postoji fundamentalna razlika između ova dva pojma. Svaki polimorfizam, bez obzira koliko je učestao danas, započet će kao mutacija kod određene jedinke prije nego postane fiksiran u populaciji. Pojam mutacija obično se koristi za opisivanje alela koji uzrokuju oboljenja. Većina njih je dovoljno rijetka da ima učestalost ispod 1%, s tim da neki nisu, kao npr. mutacija gena za humani β -globin koja

uzrokuje anemiju srpastih ćelija. Gdje postavljamo granicu uglavnom je stvar prikladnosti. Lakše je pronaći uobičajene polimorfizme ($>1\%$), ali oni rjeđi ($\leq 0,5$) mogu biti informativniji.

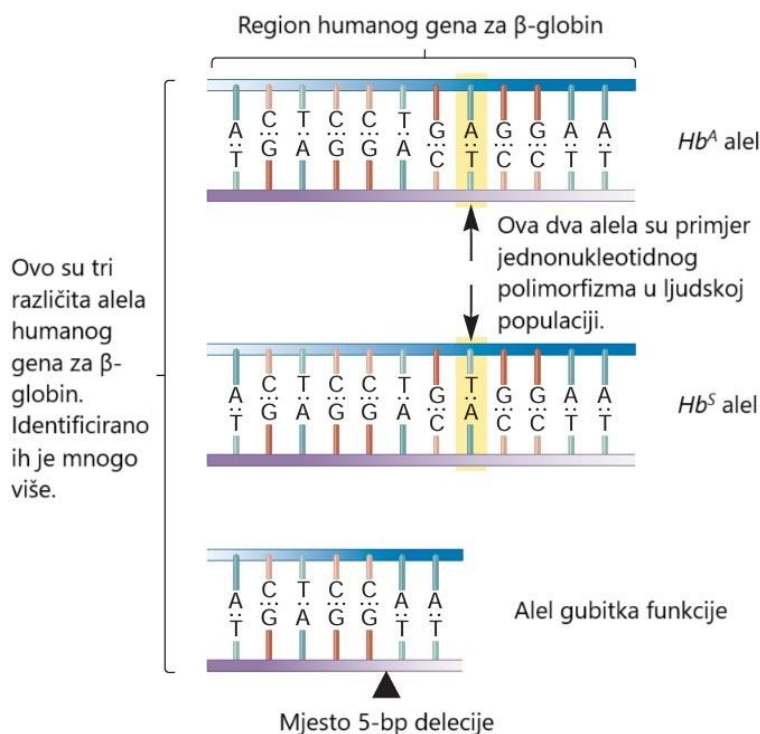
Kada proučavamo genetske varijacije, važno je imati na umu razlike koje diploidija čini u vrstama kod kojih je prisutna. Jasno je da posjedovanje dvije kopije svakog gena omogućava više prostora za evolucijski pomak u jednom alelu, sve dok drugi funkcionira normalno. To je razlog zašto na nositelje recesivnog gena za oboljenje općenito ne utječe negativno. Zaista, ponekad (kao u primjeru mutacije anemije srpastih stanica u β -globinu) ovo zapravo daje evolucijsku prednost, konkretno u ovom slučaju dajući određenu rezistenciju na malariju. Prilikom analize genetskih varijacija u diploidnim organizmima, očigledno je najvažnije imati na umu da organizam posjeduje dvije kopije svakog hromosomskog gena (uz neke izuzetke kao što su geni spolnih hromosoma kod mužjaka sisara) te da pojedinac može biti homozigot ili heterozigot za bilo koju genetsku varijaciju.

5.1 Jednonukleotidni polimorfizmi

Daleko najčešći tip genetske varijante je klasa **jednonukleotidnih polimorfizama** (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs). SNP-ovi predstavljaju posebne pozicije baza u genomu gdje alternativna slova DNK abecede razlikuju jedne ljude od drugih. SNP-ovi čine ogromnu većinu ukupnih varijacija koje postoje između humanih genoma, koje se javljaju u prosjeku jednom na svakih 1000 baza. Kod ljudi, na primjer, jednonukleotidni polimorfizmi predstavljaju 90% svih varijacija u DNK sekvencama koje se javljaju među različitim ljudima. SNP-ovi se vrlo često nalaze u genima. U ljudskoj populaciji, gen koji je u prosjeku dugačak 2000 do 3000 bp sadrži 10 različitih polimorfnih mjesta. Visoka učestalost jednonukleotidnog polimorfizma ukazuje da je polimorfizam pravilo za većinu humanih gena. Isto tako, relativno velike, zdrave populacije skoro svih vrsta pokazuju visok nivo genetske varijacije, što je dokazano pojavom jednonukleotidnih polimorfizama u većini gena.

Unutar populacije, aleli datog gena mogu nastati različitim tipovima genetskih promjena. **Slika 5.2** prikazuje gen koji postoji u više oblika kod ljudi. Ovaj primjer je kratak segment DNK koji se nalazi u ljudskom genu za β -

globin. Gornja sekvenca je alel označen kao Hb^A , dok se srednja sekvenca naziva Hb^S . Ovi aleli se međusobno razlikuju u jednom nukleotidu te predstavljaju primjer jednonukleotidnog polimorfizma. Poznato je da alel Hb^S uzrokuje bolest srpastih ćelija kod homozigota. Donja sekvenca sadrži kratku 5-bp deleciju u poređenju s druga dva alela. Ova delecija rezultira nefunkcionalnim polipeptidom β -globina. Stoga je donja sekvenca primjer alela gubitka funkcije (eng. *loss-of-function allele*).



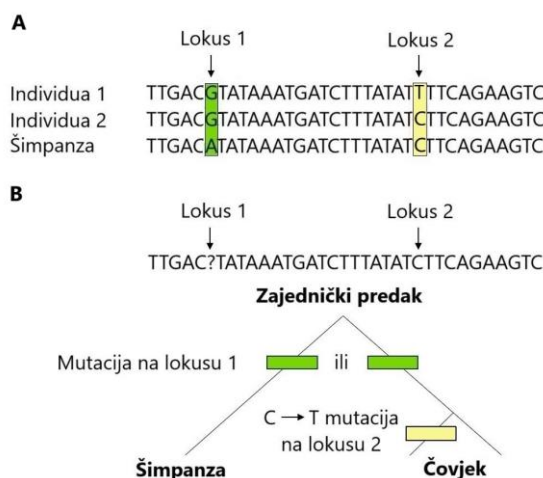
Slika 5.2 Odnos između alela i raznih vrsta mutacija. Prikazana DNK sekvenca predstavlja mali dio gena za β -globin kod ljudi. Mutacije su promijenile gen kako bi se stvorila tri različita alela na ovoj slici. Gornja dva alela se razlikuju po jednom baznom paru i nazivaju se jednonukleotidnim polimorfizmom. Donji alel ima 5-bp deleciju koja počinje odmah nakon vrha strelice. Delecija rezultira nefunkcionalnim polipeptidom. To je alel gubitka funkcije. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2012)

Uprkos postojanju velikog broja događaja koji mogu dovesti do nastanka jednonukleotidnih polimorfizama, stopa spontanih mutacija po bazi još uvijek je manja od jedan prema 30 miliona (po nekim procjenama čak jedan na 100 miliona) po generaciji. Ovaj broj je toliko nizak da je većina SNP-ova bialelna

u ljudskoj populaciji, sa samo dva od četiri moguća para nukleotida. Niska stopa mutacije SNP-a omogućava istraživačima da prate svaki pojedinačni polimorfizam do genomske promjene koja se jednom dogodila u jednom genomu predaka. Niska učestalost mutacija također znači da oni ljudi koji nisu naslijedili ovaj promijenjeni nukleotid (nazvan **mutantni alel**) imaju **ancestralni alel** koji je vjerovatno bio prisutan mnogo prije nego što se ljudska vrsta formirala. Ukoliko polimorfizam postoji, genetičari mogu iskoristiti blisku vezu između genoma čovjeka i šimpanze kako bi utvrdili koji je alel ancestralni, a koji je alel mutantni (predstavlja rezultat relativno nedavnog mutacionog događaja).

Poređenje malog regiona DNK u dva različita haploidna humana genoma i RefSeq genomu šimpanze prikazano je na **Slici 5.3**. Dvije jednobazne promjene dogodile su se u ovoj maloj genomskoj regiji od divergencije dviju vrsta. Jedna je zajednička svim humanim genomima i stoga nije polimorfna kod ljudi. Druga bazna promjena bila je iz C kod zajedničkog pretka šimpanze i čovjeka u T (mutantni alel) u hromosomu pretka nekih ljudi, ali ne i drugih. To znači da ako vi i vaš prijatelj dijelite mutantni alel na anonimnom SNP lokusu, oboje ste taj alel dobili od istog pretka koji je morao živjeti otkad su se loze čovjeka i šimpanze odvojile jedna od druge. Činjenica da svaki nasumični par ljudskih bića na planeti dijeli mnogo nevezanih, mutantnih SNP alela ukazuje na zajedničko porijeklo svih ljudi.

Do danas, analiza hiljada humanih genoma dovela je do identifikacije više od 50 miliona SNP-ova koji su katalogizirani u bazi podataka SNP-a (dbSNP) u Nacionalnom centru za biotehnološke informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Mutacije koje su dovele do mutantnog alela uobičajenih SNP-a morale su se desiti dovoljno daleko u ljudskoj historiji da bi se proširile na značajan dio današnjih ljudi. Baza podataka SNP-a već uključuje veliki dio svih uobičajenih genetskih varijacija u ljudskoj populaciji. Međutim, treba imati na umu da mutacijski događaji u nedavnoj prošlosti također stvaraju rijetke SNP-ove koji bi se mogli naći kod samo jednog ili nekoliko ljudi od svih ljudi na Zemlji. Vrlo malo ovih rijetkih SNP-ova je još uvijek uključeno u dbSNP budući da je malo humanih genoma analizirano u odnosu na cjelokupnu ljudsku populaciju.



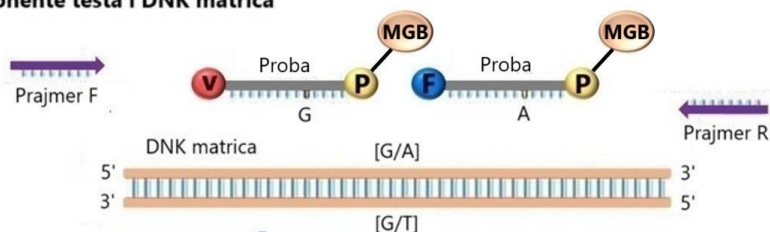
Slika 5.3 Evoluciona historija jednonukleotidnih polimorfizama. A: Poređenje dvije humane genomske sekvence (individue 1 i 2) sa šimpanzom RefSeq. Lokusi 1 i 2 su nepromjenjivi u mnogim sekvenciranim genomima šimpanze; B: Kladogram (dijagram evolucijskih linija). Lokus 1 (zeleni) razlikuje se između šimpanzi i ljudi, ali svi ljudi imaju isti alel G. Mutacija koja uzrokuje razliku u lokusu 1 mora da se dogodila otkako su vrste divergirale, bilo u liniji koja je vodila do šimpanzi ili u onoj koja je vodila do ljudi. Alel na ovoj poziciji kod najrecentnijeg zajedničkog pretka ove dvije vrste ne može se odrediti. Na lokusu 2 (žuti), alel C koji dijele šimpanze i neki ljudi mora biti ancestralni, dok alel T kod drugih ljudi mora biti mutantni (to jest, uzrokovan nedavnom mutacijom specifično u lozi nekih ljudi).

5.1.1 TaqMan testovi za genotipizaciju SNP-ova

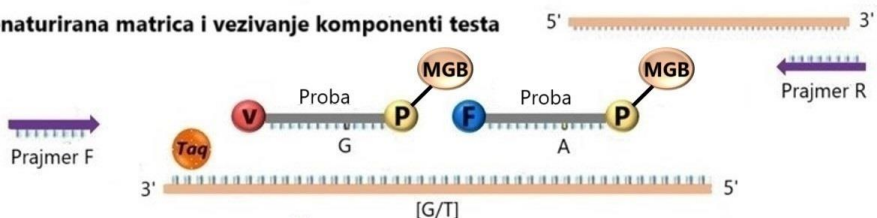
Najčešće bolesti kod ljudi kao što su tumori, hipertenzija, dijabetes i druge uzrokovane su različitim genetskim i okolinskim faktorima, kao i njihovim interakcijama. Genetski faktori su definirani kao važan faktor rizika za patogenezu ovih složenih bolesti, ali odgovorne genetske determinante ostaju uglavnom neidentificirane. Kao što je prethodno opisano, najčešće genetske varijacije u humanom genomu su **jednonukleotidni polimorfizmi** (eng. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs). Naime, značajan broj SNP-ova može biti povezan sa kompleksnim ljudskim osobinama i neki od njih mogu biti direktni, uzročni faktori. Stoga, identifikacija SNP-ova koji doprinose riziku od nastanka složenih oboljenja kod ljudi pruža, i nastaviti će pružati, vrijedne informacije važne za ranu dijagnozu, prevenciju i tretman takvih oboljenja. Zbog svojih visokih frekvencija u ljudskoj populaciji i lakoće njihove analize, SNP-ovi su korišteni u slučaj-kontrola studijama asocijacije za identifikaciju

gena koji su povezani sa rizikom od nastanka i/ili progresije mnogih bolesti. Nedavno su SNP-ovi uspješno korišteni kao genetski markeri za identifikaciju genetskih lokusa za različite bolesti koristeći i cjelogenomske studije asocijacija i cjelogenomsku analizu vezanosti. Iako SNP-ovi služe kao moćan alat za genetička istraživanja, postalo je očito da je teško genotipizirati hiljade SNP-ova za velike slučaj-kontrola studije asocijacije. Visokoučinkoviti, vrlo precizni i isplativi testovi SNP genotipizacije postali su sve popularniji posljednjih godina. **TaqMan test za SNP genotipizaciju** predstavlja naprednu, validiranu i široko korištenu tehnologiju. TaqMan test za SNP genotipizaciju također se naziva i **5'-nukleazni test diskriminacije alela** te zahtijeva F i R prajmere, kao i dvije različito označene TaqMan MGB (eng. *Minor Groove Binder*) probe (**Slika 5.4A**).

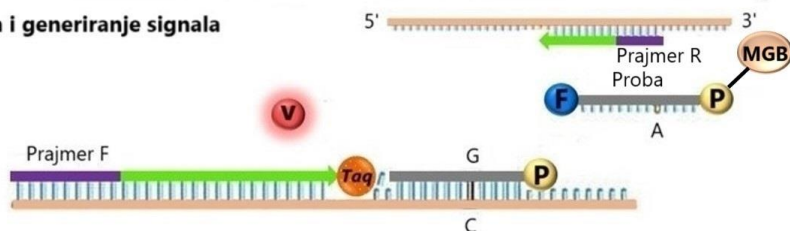
A Komponente testa i DNK matrica



B Denaturirana matrica i vezivanje komponenti testa



C Polimerizacija i generiranje signala



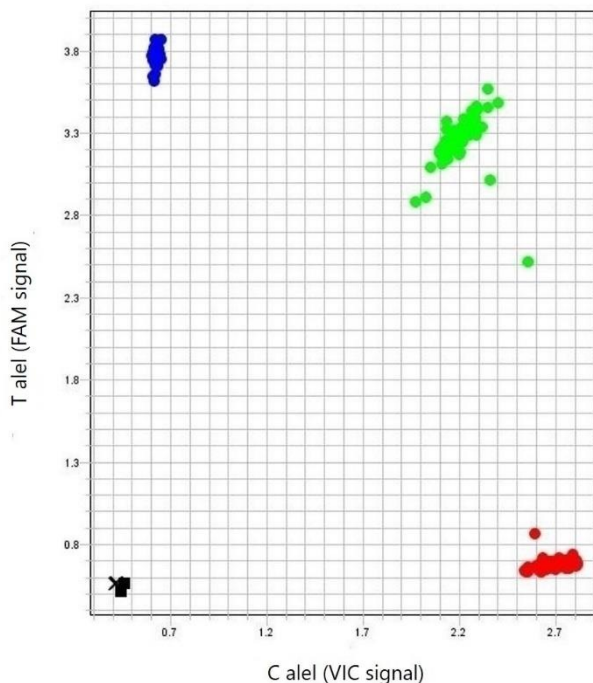
Slika 5.4 Diskriminacija alela postiže se selektivnim vezivanjem TaqMan MGB proba. V: VIC boja; F: FAM boja; P: Prigušivač; MGB: *Minor Groove Binder*; Taq: Taq DNK polimeraza.

Suština TaqMan metode opisana je u sekciji 3.4.2. Ukratko, bialelni SNP nalazi se u srednjoj trećini probe. Svaka MGB proba specifična za alel označena je fluorescentnom bojom reportera (bilo VIC ili FAM reporter molekula) te posjeduje molekulu prigušivača fluorescencije. Molekula MGB veže se za manji žlijeb DNK heliksa, poboljšavajući testove bazirane na hibridizaciji stabiliziranjem kompleksa MGB proba-matrica (**Slika 5.4B**). Ova povećana stabilnost vezivanja dopušta upotrebu kratkih proba (do 13 baza) za poboljšanu *mismatch* diskriminaciju, kao i veću fleksibilnost pri dizajniranju testova za teške ili varijabilne sekvence. Za intaktnu MGB probu, reporter boja je prigušena. Tokom PCR-a, 5' - nukleazna aktivnost *Taq* polimeraze siječe reporter boju (VIC ili FAM) iz MGB probe koja je potpuno hibridizirana na lanac DNK. Drugim riječima, kada je odvojena od molekule prigušivača, reporter boja fluorescira (**Slika 5.4C**). Međutim, ako postoji nepodudaranje u jednoj tački između probe i ciljnog lanca DNK zbog SNP-a, vezanje probe za DNK je destabilizirano tokom premještanja lanca u PCR-u što će smanjiti učinkovitost isijecanja probe i prigušenja fluorescentne reporter boje. Prema tome, povećanje fluorescencije VIC ili FAM boje ukazuje na homozigotnost za VIC ili FAM specifične alele, a povećanje fluorescencije obje boje ukazuje na heterozigotnost (**Slika 5.5**).

5.2 Insercijsko/delecijski polimorfizmi

Kratke insercije ili delecije genetskog materijala predstavljaju drugi najčešći oblik genetske varijacije u humanom genomu. Ove varijante se nazivaju **insercijsko/delecijski polimorfizmi** ili **indels**. Dok se SNP lokusi javljaju otprilike jednom na 1 kb DNK u poređenju bilo koja dva haploidna genoma, insercijsko/delecijski polimorfizmi su znatno rjeđi i javljaju se otprilike jednom na svakih 10 kb DNK. Insercijsko/delecijske varijante kreću se u dužini od jednog para baza do nekoliko stotina parova baza, ali njihova relativna frekvencija naglo opada u odnosu na njihovu dužinu. Kao rezultat toga, najčešći insercijsko/delecijski polimorfizmi su oni koji uključuju samo jedan ili dva nukleotida. Nekoliko biohemijskih procesa doprinosi stvaranju insercijsko/delecijskih polimorfizama. To uključuje probleme u replikaciji ili rekombinaciji DNK, kao i greške koje se javljaju kada ćelije pokušavaju popraviti oštećenja kao što su prekinuti lanci DNK. Važno je istaći da u

regionima koji kodiraju proteine, insercijsko/delecijske varijante djeluju kao frameshift mutacije osim ako broj umetnutih ili deletiranih parova nukleotida iznosi 3 ili višekratnik od 3.



Slika 5.5 Prikaz diskriminacije alela za jednonukleotidni polimorfizam rs758099 u *AURKC* genu, determiniran pomoću TaqMan testa za genotipizaciju jednonukleotidnog polimorfizma. Prikazan je intenzitet signala za fluorescentno označene probe VIC i FAM. Razlikovanjem i kvantificiranjem dvije boje (VIC ili FAM) generirani su genotipovi za veliki broj uzoraka. Tri klastera ukazuju na tri različita rs758099 genotipa (homozigot C/C; crveni), (heterozigot C/T; zeleni) i (homozigot T/T; plavi). Nedeterminirani uzorak (uzorak DNK za koga genotipizacija ne daje nikakav rezultat) predstavljen je znakom množenja. Crni kvadratići predstavljaju negativne kontrole (polja bez DNK uzoraka). Negativne kontrole i nedeterminirani uzorak spadaju u isti (četvrti) klaster.

5.2.1 Mikročipovi u detekciji insercija i delecija

Mikročipovi pružaju prikladan način za pronalaženje razlika između blisko povezanih organizama (kao što su dva soja iste vrste), posebno insercija i delecija. U tu svrhu možemo koristiti mikročip s većim klonovima PCR produkata ili niz kratkih sintetičkih oligonukleotida visoke gustoće koji su

„popločani“ kako bi predstavili cijeli genom. Ovdje je ilustriran princip korištenja mikročipova za razlikovanje blisko povezanih genoma usporedbom dva bakterijska soja, gdje se mikročipovi pripremaju korištenjem proba izvedenih iz sekvence standardnog referentnog soja. Oni se često dobijaju PCR amplifikacijom svakog identificiranog otvorenog okvira čitanja. Genomski fragmenti DNK iz standardnog soja su označeni fluorescentnom bojom, a fragmenti test soja su označeni drugom, zelenom bojom. Dva uzorka DNK se zatim miješaju i hibridiziraju na mikročip. Čitač mikročipova koristi se za usporedbu fluorescencije koja proizilazi iz dviju boja na svakoj tački. Ako obje hibridiziraju jednako, dobit ćemo signal iz obje boje i čitač će prikazati žutu tačku. Ako je gen odsutan u testnom soju, hibridizirat će samo standardna proba i vidjet ćemo crvenu tačku. S druge strane, ako samo testna DNK hibridizira, dobit ćemo zelenu tačku. Međutim, u ovom primjeru ne bi se očekivalo da će se to dogoditi, budući da bi standardna proba trebala hibridizirati na sve tačke. Stoga je ovo vrlo učinkovit način otkrivanja regija DNK koje su prisutne samo u jednom od dva soja. Budući da nije lako utvrditi predstavlja li to inserciju u jednom soju ili deleciju u drugom, koristimo izraz indel (insercija/delecija).

5.3 Mikrosateliti i minisateliti

Mikrosateliti, koji se nazivaju i **kratka tandemska ponavljanja** (eng. *Short Tandem Repeats*, STRs), predstavljaju kratke ponavljajuće sekvence koje su obilno razbacane kroz genom vrste i znatno variraju u dužini među različitim jedinkama. Takve sekvence sadrže di-, tri-, tetra- ili pentanukleotidne sekvence koje se ponavljaju mnogo puta uzastopno. Na primjer, najčešći mikrosatelit koji se susreće kod ljudi je dinukleotidna sekvenca $(CA)_n$, gdje n može biti u rasponu od 5 do više od 50. Drugim riječima, ova dinukleotidna sekvenca može se tandemski ponoviti 5 do 50 ili više puta. $(CA)_n$ mikrosatelit susreće se u prosjeku na svakih 10 000 baza u humanom genomu. Istraživači su identificirali hiljade različitih segmenata DNK koji sadrže $(CA)_n$ mikrosatelite, smještene na mnogim različitim mjestima unutar ljudskog genoma. Tandemske ponavljajuće sekvence nazivaju se satelitima jer se talože od ostatka hromosomske DNK tokom centrifugiranja i takva DNK označava se kao **satelitna DNK**. Mikrosateliti s većim ponavljajućim

jedinicama su rjeđi. U gruboj podjeli, najveća ponavljajuća jedinica mikrosatelita ima 10 baza, dok se oni s većim ponavljajućim jedinicama (10 bp - 1 Mb) klasificiraju kao **varijante broja kopija** (eng. *Copy Number Variants*, CNVs). **Minisateliti** se javljaju na preko 1000 pozicija u humanom genomu i jedinica ponavljanja tipično je dužine od 6 do 80 bp, a veličina minisatelita kreće se od 1 kbp do 20 kbp. Primjer minisatelita kod ljudi je telomerna DNK. U ljudskoj spermi, na primjer, jedinica ponavljanja je 6 bp, a veličina telomera je oko 15 kbp. **Varijabilni broj tandemskih ponavljanja** (eng. *Variable Number Tandem Repeat*, VNTR) predstavlja minisatelitne markere. To su nekodirajući regioni DNK molekule čiji broj ponavljanja varira među individuama. Ovi markeri zauzimaju određenu poziciju u genomu (lokus) i imaju određeni broj ponavljanja određenog slijeda baza (alel). Budući da različiti aleli imaju različite dužine (veći broj ponavljanja ukazuje na veću dužinu), VNTR markere moguće je razlikovati prema njihovoj dužini.

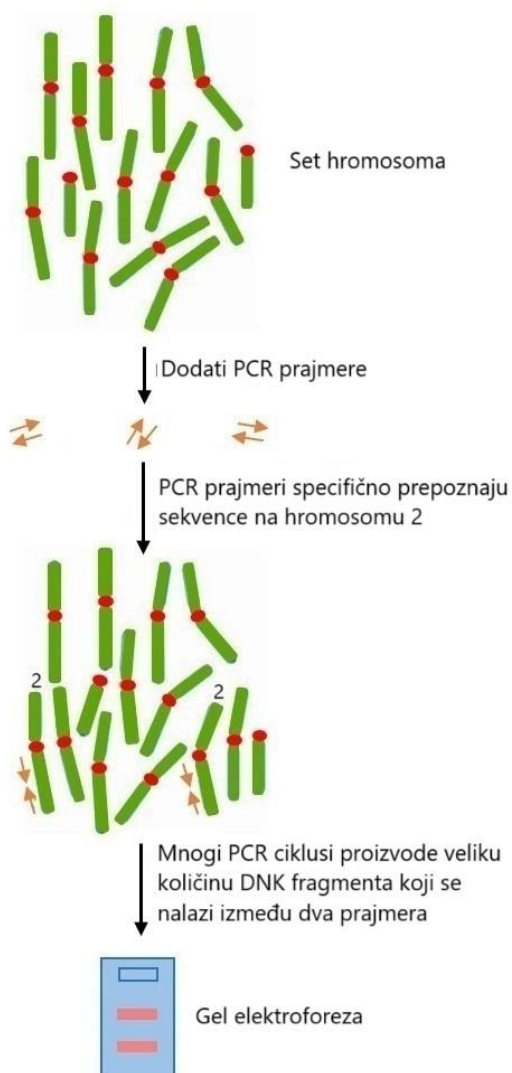
Kao i sa svim drugim polimorfizmima, većina mikrosatelita javlja se izvan kodirajućih regija gena i nema efekat na fenotip. Nasuprot tome, mikrosateliti unutar gena mogu imati ozbiljne fenotipske posljedice (npr., dugi nizovi trinukleotidnih ponavljanja predstavljaju molekularni uzrok nekoliko teških neuroloških stanja, uključujući sindrom fragilnog X i Huntingtonovu bolest). Mikrosateliti nastaju spontano iz rijetkih, nasumičnih događaja koji inicijalno proizvode kratki ponovljeni niz s četiri do pet ponavljajućih jedinica. Jednom kada kratki mikrosatelit mutira u svoje postojanje, može se proširiti u dužu sekvencu pomoću oblika pogrešne replikacije označene kao **pogrešno sparivanje skliznutog lanca** (eng. *slipped-strand mispairing*) ili **klizanje DNK** (eng. *DNA slippage*). Zbog događaja kao što je pogrešno sparivanje skliznutog lanca, novi aleli nastaju na mikrosatelitnim lokusima prosječnom stopom od 10^{-3} po lokusu po gameti (to jest, jedan u svakih hiljadu gameta). Ova je učestalost mnogo veća od stope mutacije jednog nukleotida od 10^{-9} i rezultira velikom količinom mikrosatelitnih varijacija među nesrodnim pojedincima unutar populacije. Za razliku od jednonukleotidnih polimorfizama, koji su bialelni i ne mijenjaju se nakon mutacijskog događaja koji ih je izazvao, mikrosateliti su visoko polimorfni u broju ponavljanja koje nose, često s deset ili više alela koji se mogu razlikovati na jednom mikrosatelitnom lokusu. Ipak, stopa mutacije mikrosatelita je dovoljno niska

da se promjene obično ne događaju unutar nekoliko generacija čak ni u velikoj porodici. Stoga, mikrosateliti mogu poslužiti kao relativno stabilni, visoko polimorfni DNK markeri u studijama vezanosti mnogih organizama, uključujući ljude.

Postoje određena ograničenja u upotrebi konvencionalnog metoda polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) koja se ogledaju u tome da zahtijeva veliku količinu DNK kako bi signal bio detektiran, kao i da je potrebno izvršiti hibridizaciju sa probom kako bismo dobili očitavanje. Za mnoge praktične primjene u forenzičkim istraživanjima, kao i u kliničkoj dijagnostici, ovaj pristup često nije prikladan ili nije izvodljiv. Jedan pristup koristi prethodno spomenuta tandemska ponavljanja. Umjesto upotrebe probe i genomske Southern blot analize, možemo samo amplificirati region koji sadrži tandemska ponavljanja pomoću prajmera koji hibridiziraju sa obje strane tandemskih ponavljanja. Produkt se potom razdvaja na akrilamidnom gelu koji posjeduje veću moć rezolucije od agaroznog gela te je moguće razlikovati sekvence koje se razlikuju u samo jednom baznom paru. Vidjet ćemo da veličina produkta varira postepeno prema broju kopija ponovljene sekvence. Ovo daje tehnici ime VNTR (eng. *Variable Number Tandem Repeat*). Svaki soj tada može dobiti broj koji označava broj kopija tog tandemskog ponavljanja. Identificiranjem nekoliko lokusa koji sadrže VNTR i određivanjem broja kopija na svakoj poziciji, dolazimo do složene oznake kao što je 3433243. Ovaj pristup se sada široko koristi u bakterijskoj genotipizaciji umjesto RFLP-a.

Vrlo sličan koncept, koji se pokazao iznimno korisnim u humanom genotipiziranju, uključuje korištenje mikrosatelita. Upotrebom prajmera komplementarnih jedinstvenim sekvencama DNK koje okružuju specifičnu mikrosatelitnu regiju, određeni mikrosatelit može se amplificirati PCR-om. Drugim riječima, PCR prajmeri kopiraju samo određeni mikrosatelit, ali ne i hiljade drugih razbacanih po genomu (**Slika 5.6**). Kada par PCR prajmera kopira jedno mjesto unutar skupa hromosoma, amplificirana regija se naziva **mjesto označeno sekvencom** (eng. *Sequence-Tagged Site*, STS). Kada se DNK prikupi iz haploidne ćelije, STS daje samo pojedinačni bend na gelu. Kod diploidne vrste, pojedinac ima dvije kopije datog STS-a. Kada STS sadrži

mikrosatelit, dva PCR produkta mogu biti identična i rezultirati jednim bendom na gelu ako je regija iste dužine u obje kopije (npr. ako je pojedinac homozigot za mikrosatelit). Međutim, ako individua ima dvije kopije koje se razlikuju u broju ponavljanja u mikrosatelitskoj sekvenci (tj., ako je jedinka heterozigot za mikrosatelit), dva dobivena PCR produkta bit će različita u dužini (**Slika 5.6**).

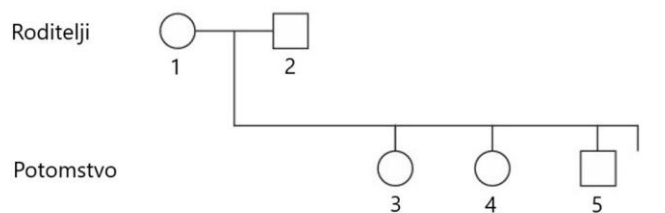


Slika 5.6 Identifikacija mikrosatelita pomoću PCR prajmera. Dva uočena benda razlikuju se po svojim masama jer isto mjesto na dva homologna hromosoma sadrži različit broj ponavljajućih sekvenci.

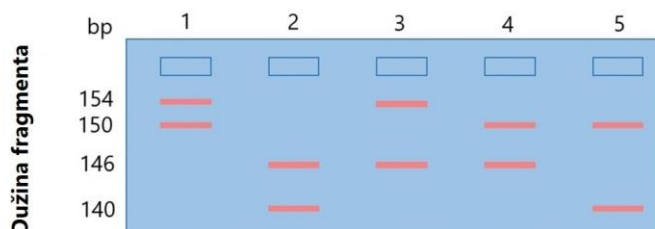
5.3.1 Mikrosateliti u analizi humanog pedigrea

Mikrosateliti polimorfni u dužini omogućuju istraživačima praćenje njihovog prijenosa s roditelja na potomstvo. PCR amplifikacija određenih mikrosatelita pruža važnu strategiju u genetskoj analizi humanih pedigrea (**Slika 5.7**). Prije ove analize identificiran je jedinstveni segment DNK koji sadrži mikrosatelit. Korištenjem PCR prajmera komplementarnih jedinstvenim bočnim segmentima ovoga mikrosatelita, dva roditelja i njihova tri potomka testirani su na nasljeđivanje mikrosatelita. Mali uzorak ćelija dobiven je od svake jedinke i podvrgnut PCR amplifikaciji, kao što je ranije opisano na **Slici 5.6**. Amplificirani PCR produkti zatim su analizirani gel elektroforezom visoke rezolucije, koja može otkriti male razlike u dužinama fragmenata DNK. Kao što je prikazano na slici, prijenos polimorfnih mikrosatelita je relativno lako pratiti s generacije na generaciju. Jednostavna analiza pedigrea prikazana na **Slici 5.7** ilustrira opći metod koji se koristi za praćenje prijenosa jednog mikrosatelita polimorfne dužine. U studijama vezanosti, cilj je pratiti prijenos mnogo različitih mikrosatelita kako bi se odredili oni koji su vezani duž istog hromosoma u odnosu na one koji nisu. Oni koji nisu vezani, samostalno će se sortirati iz generacije u generaciju. Oni koji su vezani, obično se prenose zajedno na isto potomstvo. U velikom pedigreu moguće je identificirati slučajeve u kojima su se vezani mikrosateliti odvojili zbog crossingovera. Učestalost crossingovera daje mjeru udaljenosti na mapi, u ovom slučaju između različitih mikrosatelita. Ovaj pristup može pomoći istraživačima u dobijanju detaljne mape genetske vezanosti humanih hromosoma.

Osim toga, analiza pedigrea koja uključuje polimorfne mikrosatelite, može pomoći istraživačima da identificiraju mjesto alela koji uzrokuju bolest. Pretpostavka iza ovog pristupa jeste da alel koji uzrokuje bolest potječe od jedne jedinke poznate kao osnivač (eng. *founder*), koja je živjela prije mnogo generacija. Od tada se alel proširio na dijelove ljudske populacije. U slučaju recesivnih poremećaja, potomci osnivača koji su pogođeni bolešću naslijedili su dvije kopije mutantnog alela. Druga pretpostavka je da je osnivač vjerojatno imao polimorfni molekularni marker koji se nalazi negdje blizu mutantnog alela. Ovo je razumna pretpostavka, budući da svi ljudi nose mnogo polimorfnih markera u svom genomu.



A Pedigre



B Elektroforetski gel PCR produkata za polimorfni mikrosatelit pronađen u porodici (A).

Slika 5.7 Obrazac nasljeđivanja polimornog mikrosatelita u ljudskom pedigreu. Majčini PCR produkti bili su dugi 154 i 150 bp; očevi su bili 146 i 140 bp. Njihov prvi potomak naslijedio je 154 bp produkt od majke i onaj 146 bp od oca, drugi potomak je naslijedio 150 bp produkt od majke i 146 bp produkt od oca, a treći je naslijedio 150 bp produkt od majke i 140 bp produkt od oca.

Ako se polimorfni marker nalazi vrlo blizu alela koji uzrokuje bolest, malo je vjerojatno da će doći do crossingovera u intervenirajućoj regiji. Stoga se takav polimorfni marker može povezati s alelom koji uzrokuje bolest tokom mnogih generacija. Iz tog razloga, veza između određenog polimornog markera i alela koji uzrokuje bolest može pomoći u predviđanju da li je osoba heterozigotna za recesivni alel koji uzrokuje bolest. Prateći prijenos mnogih polimornih markera unutar velikih obiteljskih pedigrea, moguće je utvrditi da se određeni markeri nalaze kod ljudi koji nose specifične alele koji uzrokuju bolest.

5.4 DNK profiliranje

Populacijski genetičari analiziraju mikrosatelite ili minisatelite kako bi proučavali varijacije na razini populacije i odredili odnose između jedinki i susjednih populacija. Veličine mikrosatelita i minisatelita pronađenih kod blisko povezanih pojedinaca obično su sličnije nego kod nesrodnih

pojedina. Tehnika **DNK profiliranja**, poznata i kao **DNA fingerprinting**, analizira pojedince na temelju pojave repetitivnih sekvenci u njihovom genomu. Kada se podvrgne tradicionalnom DNK profiliranju, hromosomska DNK stvara niz bendova na gelu. Veličina i redoslijed bendova predstavlja DNK profil pojedinca. Budući da DNK svakog pojedinca ima specifičan obrazac, jedinstven uzorak ovih bendova omogućuje razlikovanje individua.

U proteklom periodu, tehnika DNK profiliranja postala je automatizirana, slično automatizaciji koja je promijenila postupak DNK sekvenciranja. DNK profiliranje sada se radi tehnikom lančane reakcije polimerazom (PCR), koja amplificira mikrosatelite. Kao i minisateliti, mikrosateliti se nalaze na više mjesta u genomu ljudi i drugih vrsta i razlikuju se po dužini među različitim pojedincima. U ovom postupku, mikrosateliti iz uzorka DNK amplificiraju se PCR-om pomoću prajmera koji okružuju repetitivno područje, a zatim se razdvajaju gel elektroforezom prema njihovim molekulskim masama. Kao i kod automatiziranog DNK sekvenciranja, amplificirani fragmenti mikrosatelita su fluorescentno označeni. Laser pobuđuje fluorescentnu molekulu unutar mikrosatelita, a detektor bilježi količinu fluorescentne emisije za svaki mikrosatelit. Ova vrsta DNK profiliranja daje niz pikova, a svaki pik ima karakterističnu molekularnu masu. U ovakvom automatiziranom pristupu, uzorak pikova, a ne bendova, čini DNK profil pojedinca.

Usporedba DNK profila među različitim pojedincima pronašla je dvije primjene. Prvo, DNK profiliranje može se koristiti kao metoda identifikacije. U forenzici, DNK profiliranje može identificirati osumnjičenog. U medicini, tehnika može identificirati vrstu bakterije koja uzrokuje infekciju kod određenog pacijenta. Druga upotreba DNK profiliranja je testiranje odnosa. Pojedinci u bliskom srodstvu imaju sličnije profile nego oni u udaljenom srodstvu. Kod ljudi se to može koristiti u testiranju očinstva. U populacijskoj genetici, DNK profiliranje može pružiti dokaz o stepenu srodstva među članovima populacije.

5.5 Varijante broja kopija

Individualni ljudski genomi također pokazuju polimorfizme dužine DNK koji uključuju više od samo nekoliko nukleotida koji karakteriziraju mikrosatelite i insercijsko/delecijske polimorfizme. Poprilično iznenađenje javilo se kod

istraživača kada su otkrili da genomi mnogih ljudi, koji ne pokazuju znakove bilo kakve genetske bolesti, nose promjenjiv broj kopija velikih blokova genetskog materijala dužine do 1 Mb. Ova kategorija genetskih varijanti naziva se **varijantama broja kopija** (eng. *Copy Number Variants*, CNV). Pokazalo se da su CNV prilično česte i po njihovoj distribuciji u genomu i po učestalosti pojavljivanja u ljudskoj populaciji. Preko 10.000 CNV lokusa je identificirano u svim do sada ispitanim humanim genomima, a poređenje bilo koja dva genoma obično detektira razlike na više od 1000 ovih lokusa. Jedan od najvažnijih mehanizama koji mogu proizvesti nove alele CNV lokusa je nejednaki crossingover. Tokom mejoze I, tandemske nizovi ponavljajućih jedinica na homolognim hromosomima mogu se pogrešno upariti. Ako se rekombinacija dogodi između pogrešno uparenih ponavljajućih jedinica, nastaju gamete koje imaju više ili manje kopija ponavljajuće jedinice od originala. Iako mehanizmi poput nejednakog crossingovera čine CNV lokuse visoko polimorfne, CNV su i dalje relativno stabilni kada se posmatraju u porodicama tokom nekoliko generacija. Stoga, više od 99% svih CNV alela u trenutnoj ljudskoj populaciji izvedeno je iz nasljeđa, a ne iz nove mutacije.

Porodica gena za olfaktorni receptor (*OR*), koja kodira proteine koji omogućavaju životinjama da osjete raznoliku paletu mirisa, nudi fascinantno primjer varijacije u broju kopija gena. Tipičan mišji genom nosi 1400 *OR* gena raspoređenih na brojnim hromosomskim mjestima. Budući da oštro čulo mirisa više nije toliko važno za ljudski opstanak, *OR* geni mogu biti izgubljeni bez posljedica, a ljudi obično nose manje od hiljadu *OR* gena. Međutim, pojedini ljudi se uveliko razlikuju oko ove vrijednosti. Ako uzmemo za primjer 10 ljudi na 11 reprezentativnih *OR* lokusa možemo uočiti da npr. jedan gen, označen kao *OR4K4*, varira u broju kopija od dvije do šest u različitim genomima, dok pet od 11 gena u potpunosti nedostaje kod određenih individua. Neki ljudi mogu imati stotine više ili stotine manje *OR* gena od drugih, što rezultira velikim razlikama u sposobnosti ljudi da razlikuju mirise.

Najbolji način identificiranja varijanti broja kopija jeste genomsko sekvenciranje. Međutim, i u modernoj eri sekvenciranja sljedeće generacije, ovo je previše glomazno za velika istraživanja. S tim u vezi, uobičajeniji pristup je identificirati varijante broja kopija pomoću **mikročipova**. Osnovna premisa koja stoji iza ove tehnike je varijacija u snazi hibridizacijskog signala

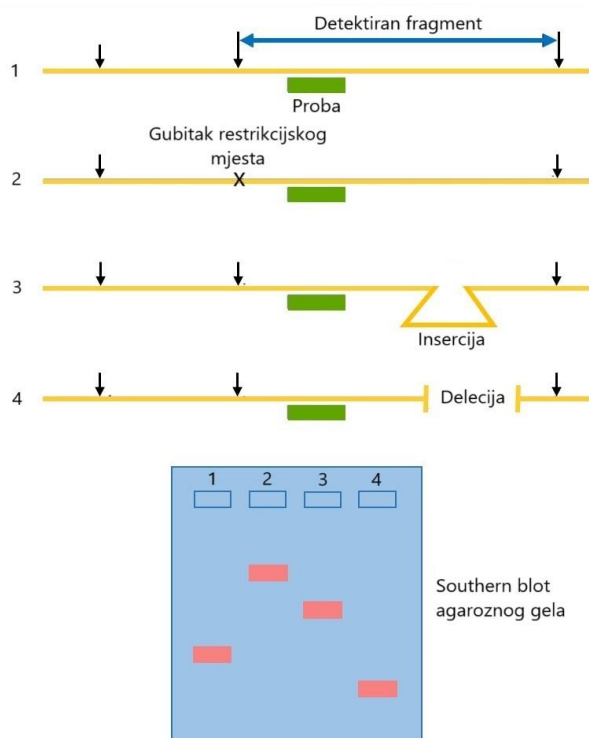
koja će se pojaviti za različite brojeve kopija, iako je to manje pouzdano od tradicionalnih mikročipova, a rutinski mikročipovi ne identificiraju precizan položaj varijacije. Ovo se može prevazići upotrebom kratkih, blisko raspoređenih oligonukleotida. U jednoj studiji, koristeći mikročip s 42 miliona tačaka na prosječnom razmaku od 56 parova baza, identificirano je 8000 varijanti broja kopija, preklapajući 13% humanih gena. Važno je zapamtiti da su ove varijante broja kopija samo povezane sa stanjem bolesti te da je potrebno provesti dalja istraživanja kako bi se ispitalo postojanje uzročne veze.

5.6 Genomska Southern blot analiza: polimorfizmi dužine restrikcijskih fragmenata

Jedan od klasičnih metoda analize genetske varijacije je **Southern blot**, koji nam omogućuje detekciju benda koji može na agaroznom gelu hibridizirati s određenom probom. Tehnika je opisana u sekciji 6.1. Ako digestiramo ukupnu DNK iz organizma, obično ćemo dobiti toliko fragmenata da će se pojaviti kao mrlja na gelu, a ne kao diskretni bendovi. Southern blot nam omogućuje ne samo identificiranje specifičnih genskih fragmenata u takvom razmazu, već i usporedbu uzoraka DNK prema uzorku hibridizirajućih bendova. Ako koristimo probu koja hibridizira s DNK sekvencom koja je prisutna kao jedna kopija u genomu, tada ćemo detektirati jedan fragment na Southern blotu. Ovo pretpostavlja da enzim koji se koristi za digestiju genomske DNK ne siječe unutar regije s kojom proba hibridizira; ako siječe, dobit ćemo više fragmenata. Veličina tog benda (ili bendova) bit će određena položajem restrikcijskih mjesta koja okružuju detektiranu sekvencu. Ako su struktura i mjesto tog gena isti u svakom testiranom organizmu, tada će bend biti na istoj poziciji. Međutim, ako postoji razlika u udaljenosti koja razdvaja dva restrikcijska mjesta, postojat će razlika u veličini fragmenta, a vidjet ćemo i razliku u poziciji detektiranog benda. To se naziva **polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata** (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP).

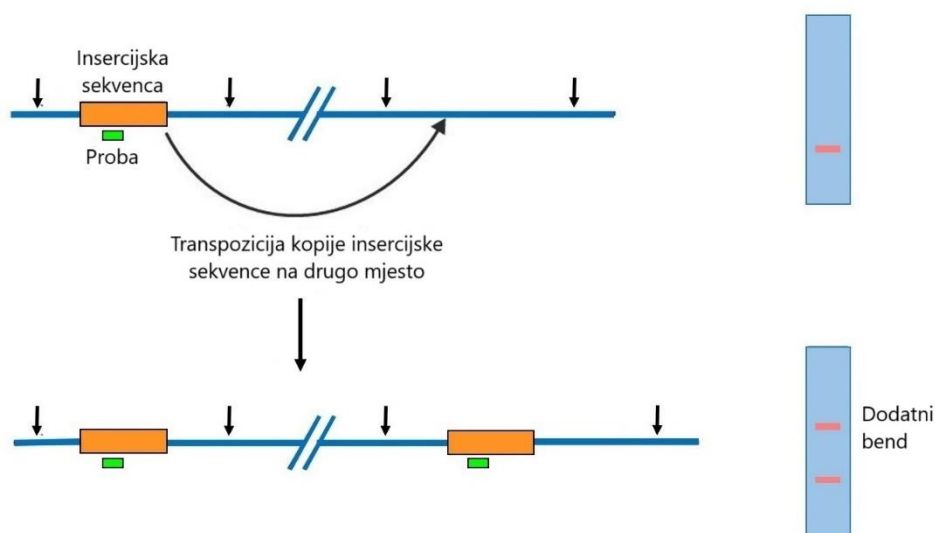
Postoji niz promjena koje mogu dovesti do takvog polimorfizma (**Slika 5.8**). Najočiglednija je tačkasta mutacija koja uzrokuje gubitak ili nastanak određenog restrikcijskog mjesta, što će se obično dogoditi pri vrlo niskoj

frekvenciji. Insercije i delecije će učiniti fragment većim ili manjim. Naravno, ako sam insert sadrži mjesto isijecanja za enzim, ili ako delecija ukloni restrikcijsko mjesto, onda će to također utjecati na veličinu promatranih fragmenata. Kako bi RFLP bio koristan za rutinsku usporedbu pojedinaca ili sojeva, moramo promatrati događaje koji se događaju češće. Najkorisniji polimorfizmi nastaju dupliciranjem ili transpozicijom ponavljajućih sekvenci. Duplikacije su često povezane s pojavom tandemske ponovljene sekvence (tj. kratka sekvencna baza pojavljuje se dva puta ili više uzastopno). Kada se ovo područje replicira, može doći do pogrešaka. Replikaciona mašinerija može skliznuti natrag s druge kopije na prvu, stvarajući dodatnu kopiju ponavljanja, ili može (što je rjeđe) skliznuti u drugom smjeru, uzrokujući smanjenje broja kopija. Repetitivna sekvencna može biti prilično kratka. Na primjer, kada imamo samo par baza ili čak seriju iste baze, tada će promjena u dužini restrikcijskog fragmenta biti mala. U takvom slučaju, tehnike temeljene na PCR-u korisnije su u detekciji ovih promjena.



Slika 5.8 Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata.

Ako koristimo probu koja hibridizira s mobilnim DNK elementom kao što je transpozon ili insercijska sekvenca i kada se kopija tog elementa pomakne na drugo mjesto na hromosomu, pokupit ćemo novi fragment na Southern blotu (**Slika 5.9**). Ovo predstavlja široko korištenu tehniku za diferencijaciju bakterijskih sojeva u epidemiološke svrhe.



Slika 5.9 Polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta koji proizilazi iz transpozicije insercijske sekvence.

6

Tehnike hibridizacije

*Irma Mahmutović-Dizdarević
Aner Mešić*

6.1. In situ hibridizacija

U mikrobiologiji, kako kliničkoj tako i okolišnoj, koriste se brojne tehnike hibridizacije. Neke od njih služe za brzu identifikaciju bakterija i funga u kulturi uzoraka različitog porijekla. Detekcijski postupak korišten u in situ hibridizaciji može biti **fluorescentni** ili **hromogeni**. Generisana hemiluminiscentna reakcija, nastala nakon hibridizacije oligonukleotidnih proba i ribosomalne RNK može se koristiti za detekciju *Mycobacterium* vrsta u pozitivnoj kulturi uzorka, dok se ostale tehnologije, kao što je tekućinska hibridizacija, dominantno koriste za detekciju virusa.

In situ hibridizacija podrazumijeva precizno lociranje ciljanih sekvenci na objektima istraživanja koji su mikrokopski vidljivi, a lociranje se vrši markiranim sekvencama poznatog sastava. Takve sekvence označavaju se kao **sonde** ili **probe** i pretpostavlja se da su prisutne u objektu istraživanja. In situ hibridizacija je uvedena u kliničke mikrobiološke laboratorije kao pogodna tehnologija za brzu detekciju i diferencijaciju bakterija i gljivica. Ima uspješnu primjenu u direktnim kliničkim uzorcima, kao i u histopatološkim presjecima. Najčešće se koristi za diferencijaciju mikroorganizama istoimenih morfotipova u pozitivnoj kulturi uzorka.

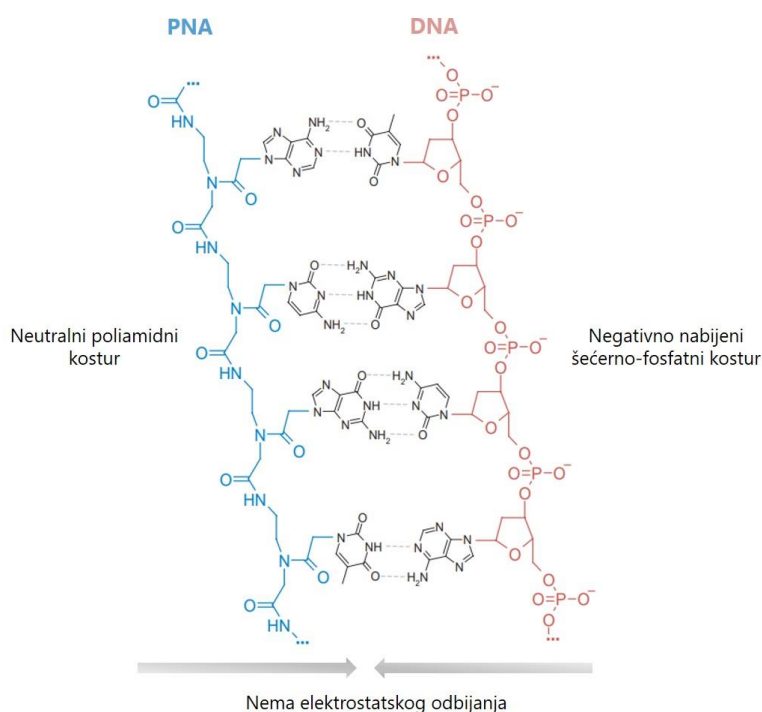
Jedna od prednosti je ta što se može upotrijebiti u kombinaciji sa tradicionalnim metodama, kao što je bojenje po Gramu, jer se informacije dobijene bojenjem po Gramu koriste za selekciju prikladnih proba.

FISH tehnologija, odnosno fluorescentna in situ hibridizacija (eng. *Fluorescent In Situ Hybridization*) se široko koristi u mikrobnjoj ekologiji i kliničkoj dijagnostici. U ekologiji, FISH tehniku je moguće koristiti za mikroskopsku identifikaciju i praćenje organizama neposredno u okolišu. Također, ova metoda omogućava procjenu kompozicije mikrobnih zajednica mikroskopiranjem. U kliničkoj dijagnostici, FISH tehnika se koristi za brzu identifikaciju specifičnih patogena u uzorku, i to na način da zaobilazi potrebu za uzgojem mikroorganizama u kulturi. Umjesto toga, mikroskopski pregled uzorka može potvrditi prisustvo patogena. Na taj način, ubrzavajući detekciju uzročnika infekcije, ova metoda skraćuje vrijeme ordiniranja adekvatne terapije. Za razliku od toga, tehnike izolacije i identifikacije tipično traju najmanje 24 sata, a nekada i duže. Zbog svoje velike specifičnosti, nukleinsko-kiselinske probe (sonde) su moćan alat za identificiranje i kvantificiranje mikroorganizama. Sama proba predstavlja DNK ili RNK oligonukleotid komplementaran sekvenci ciljanog gena ili RNK. Ostvarivanjem kontakta između probe i njene ciljne sekvence (eng. *target*), dolazi do hibridizacije. Nukleinsko-kiselinske probe se mogu modelirati dodavanjem fluorescentnih boja, tako da se detekcija vrši usljed fluorescencije.

Pored nukleinsko-kiselinskih (DNA), u in situ hibridizaciji koriste se i peptido-nukleinsko kiselinske (eng. *Peptide Nucleic Acid*, PNA) probe. **PNA proba** zapravo predstavlja umjetno kreiran DNK analog, te posjeduje strukturu u kojoj je šećerno-fosfatni kostur DNK zamijenjen sa amidnim kosturom nalik na peptid (N-(2-aminoetil) glicin), zbog čega je povećan afinitet stabilnog vezivanja ciljne molekula (DNK ili RNK). Drugim riječima, bitna razlika između DNA i PNA proba je u čvrstini molekula. Čvrstinu DNK polimera sačinjava ponavljajući šećer dezoksiriboza i fosfatne molekule, koje imaju negativan naboj. Za razliku od toga, čvrstina PNA molekule potiče od ponavljajućih molekula glicina, koji je kratka i neutralno nabijena aminokiselina.

PNA molekule praktično „imitiraju“ DNK, s tim da je negativno nabijeni šećerno-fosfatni kostur DNK zamijenjen nenabijenim poliamidnim ili „peptidnim“ kosturom. Sintetizirani kostur omogućava PNA probama jedinstvene hibridizacijske karakteristike. Prilikom hibridiziranja sa

komplementarnom nukleinsko-kiselinskom sekvencom, DNA proba mora prevazići elektrostatsko odbijanje između negativno nabijenih kostura, što dovodi do sporijeg i slabijeg povezivanja. Zbog nenabijenog kostura, PNA proba ne prolazi kroz elektrostatsko odbijanje i hibridizira veoma brzo i tijesno sa nukleinsko-kiselinskom metom (**Slika 6.1**). PNA probe su jedinstvene u smislu hemijske, biološke i termalne stabilnosti, te su vrlo postojane u uslovima visokih temperatura, visoke koncentracije soli ili ekstremnih pH vrijednosti, a karakteriše ih i otpornost na enzimatsku aktivnost nukleaza i proteaza.



Slika 6.1 Struktura PNA i DNA proba. (preuzeto i prilagođeno iz Brandt i Hoheisel, 2004)

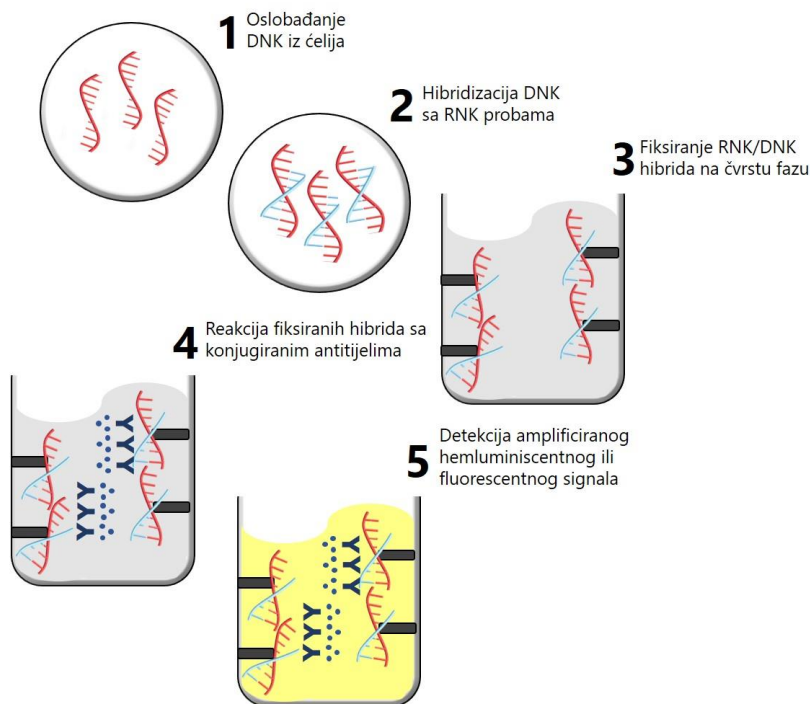
6.2 Tekućinska hibridizacija

Tehnika tekućinske hibridizacije (eng. *Hybrid capture method*) se zasniva na korištenju specifičnih hibridizacijskih proba dizajniranih za hemoluminiscentnu detekciju amplificiranog signala hibridizacijskih mjesta, te kvantifikaciju ciljane nukleinske kiseline. Izvodi se kroz nekoliko koraka, najčešće u mikrotitarskim

pločama. Denaturacija DNK se vrši na temperaturi od 65 °C u toku 30 minuta, pomoću rastvora NaOH. Nakon prelaska dvolančane DNK u jednolančanu formu, omogućena je hibridizacija sa specifičnim RNK hibridizacijskim probama. Nakon inkubacije stvara se RNK-DNK hibrid koji se potom prenosi u bazenčiće mikrotitarskih ploča u kojima se nalaze antiRNK-DNK antitijela koja se vežu za njih. Tokom ovog procesa, ne dolazi do reakcije sa jednolančanim molekulama RNK ili DNK. U fazi konjugacije i ispiranja, imobilizirani hibridi reaguju sa konjugatom (kompleks alkalne fosfataze i antitijela specifičnih za RNK-DNK hibride), a nehibridizirane probe se ispiranjem odstranjuju. Završna faza je hemluminiscentna detekcija hibrida dodavanjem hemluminiscentnog supstrata, što se uglavnom odvija na sobnoj temperaturi. Intenzitet luminiscencije se mjeri luminometrom, a koncentracija nukleinske kiseline u uzorku se mjeri usporedbom relativnih optičkih jedinica (eng. *Relative Light Unit*, RLU) u odnosu na odgovarajuću kalibracionu krivu. Zbog izvanredne preciznosti, reproduktivnosti, senzitivnosti, kratkog vremena izvođenja, niskog rizika od kontaminacije, te jednostavnosti, ova metoda je našla široku primjenu u kliničkoj medicini, te u mikrobiološkoj dijagnostici (*Chlamydia* sp., *Toxoplasma gondii*, HPV, CMV, HSV, HBV itd.). Shematski prikaz postupaka u tehnici tekućinske hibridizacije predstavljen je na **Slici 6.2**.

6.3 Southern blotting

Southern blotting se koristi za detekciju prisustva određene genske sekvence u mješavini hromosomskih DNK fragmenata. Ovom metodom moguće je odrediti broj kopija gena u genomu određenog organizma. Tako npr., ovom metodom je otkriveno da su rRNK geni pronađeni u višestrukim kopijama u genomu za razliku od strukturnih gena koji su jedinstveni. Također, Southern blotting može detektirati male genske delecije. Dodatno, ova metoda se koristi u identifikaciji familija gena, tačnije u razlikovanju homolognih članova određene familije gena. Familija gena obuhvata grupu dva ili više gena porijeklom iz istog ancestralnog gena. Članovi familije gena imaju slične, ali ne i identične sekvence DNK, tj. oni su homologni geni. Konačno, ova tehnika se može koristiti pri određivanju da li transgeni organizam (organizam koji posjeduje nove ili modificirane gene) nosi takve gene. DNK koja će biti karakterizirana Southern blot hibridizacijom može doći



Slika 6.2 Postupci u metodi tekućinske hibridizacije.

iz nekoliko izvora, uključujući klonove odabrane iz biblioteke ili genomske DNK. Prije samog eksperimenta Southern blottinga, gen ili fragment gena od interesa se klonira. Klonirana DNK se označava (npr. radioaktivno), a potom se označena proba koristi za detekciju prisustva gena ili homolognih gena u mješavini DNK fragmenata. Osnova ove metode leži u uparivanju dva DNK fragmenta pod uvjetom da posjeduju komplementarne sekvence. U takvom eksperimentu, označeni lanci iz kloniranog gena spajaju se specifično s komplementarnim lancima DNK, čak i ako se komplementarni lanci nalaze unutar mješavine mnogih drugih DNK lanaca.

Slika 6.3A prikazuje proceduru Southern blotting tehnike. Naime, cilj ove metode jeste odrediti da li **hromosomska DNK** sadrži sekvencu komplementarnu sekvenci specifične probe. U prvim koracima tehnike, hromosomska DNK se izolira, a zatim podvrgava digestiji pomoću **restrikcijskih enzima**. Budući da restrikcijski enzimi sijeku hromosomsku DNK na mnogo različitih mjesta unutar hromosoma, ovaj korak stvara hiljade **DNK fragmenata** različitih dužina. U zavisnosti od pozicije restrikcijskog

mjesta, svaki gen se nalazi na jednom ili više dijelova DNK. Ponekad, ako se analiziraju manji dijelovi DNK (npr. plazmidna DNK), nedigestirana DNK se može koristiti za Southern blot. Hromosomski fragmenti se potom razdvajaju prema svojoj veličini, procesom gel elektroforeze. Uranjanjem gela u rastvor natrij hidroksida (NaOH), DNK fragmenti na gelu se denaturiraju, nakon čega se DNK prenosi (*eng. blotting*) na **najlonsku membranu**.

Tradicionalni način za prijenos DNK na membranu jeste postavljanje gela na filter papir u rastvor pufera (**Slika 6.3B**). Najlonska membrana se stavlja na gel, a potom se na najlonsku membranu stavljaju dodatni filter papir i papirni ubrusi. Konačno, postavlja se staklena ploča i na nju težak predmet (teret). Tečnost iz pufera se kreće prema gore noseći DNK sa gela prema najlonskoj membrani i kada DNK uđe u membranu, ostaje vezana za nju. Alternativno, prijenos DNK se može vršiti pomoću aparata u kojem je gel postavljen na najlonsku membranu. U tom slučaju, DNK fragmenti se elektroforetski kreću sa gela na membranu pomoću električnog polja, (**Slika 6.3C**). Prikazane procedure rezultiraju najlonskom membranom koja sadrži brojne neoznačene DNK fragmente razdvojene prema masi koji su potom denaturirani.

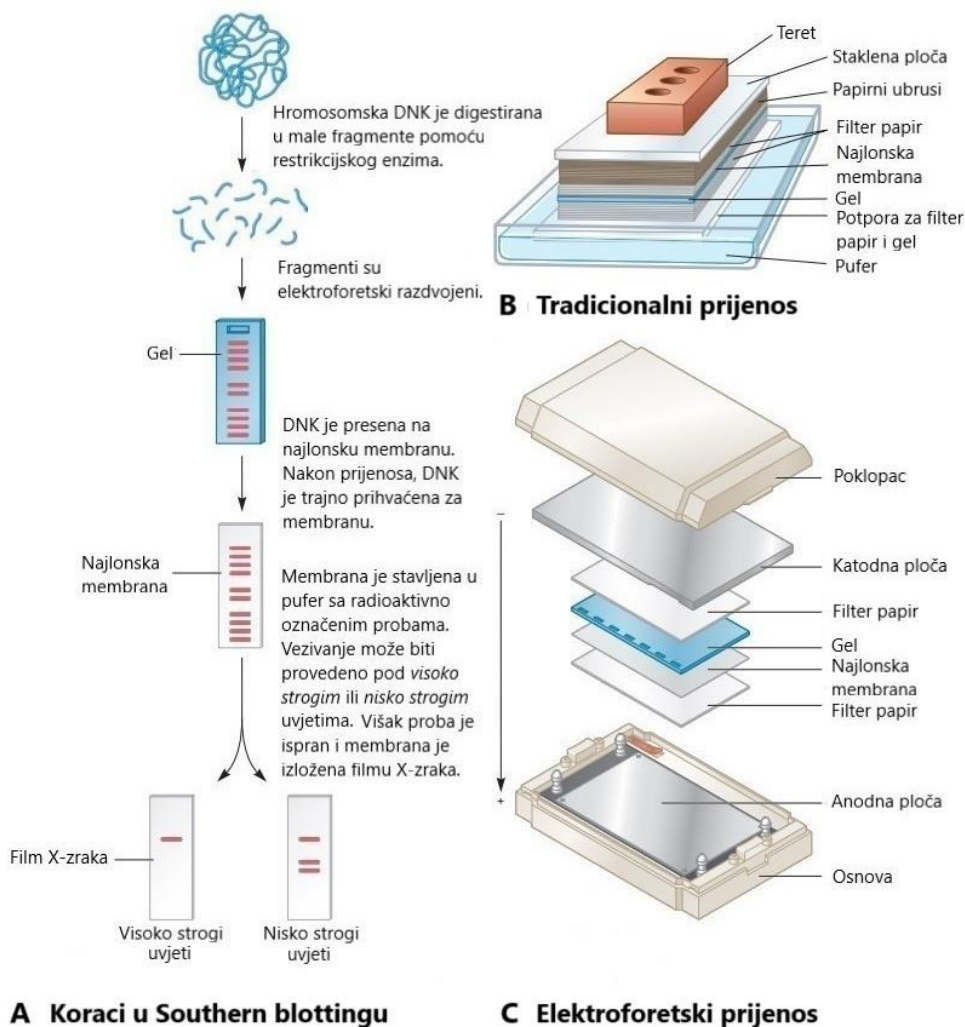
Potom se najlonska membrana inkubira ili izlaže djelovanju UV svjetlosti kako bi se izvršilo trajno prihvatanje DNK fragmenata za membranu. Naredni korak u ovoj proceduri jeste određivanje da li bilo koji od ovih neoznačenih fragmenata iz hromosomske DNK sadrži sekvence koje su komplementarne sa označenom probom. Jedna metoda označavanja jeste inkorporiranje radioaktivnog izotopa ^{32}P u DNK probu, koji označava fosfatnu grupu u okosnici DNK. Potom se najlonska membrana, koja posjeduje neoznačenu hromosomsku DNK prihvaćenu za sebe, uranja u pufer sa **radioaktivno označenim probama**. Ako su označena proba i fragment hromosomske DNK komplementarni, doći će do njihovog vezivanja vodikovim vezama. Sve nevezane radioaktivno označene DNK se potom ispiru, a membrana se izlaže X-zrakama. Mjesta gdje su se radioaktivno označene probe vezale pojavljuju se kao tamni bendovi na X-filmu.

Važne varijable koje utječu na korake hibridizacije i ispiranja tokom ove procedure jesu **temperatura** i **jonska snaga**. Ukoliko se Southern blotting provodi u uvjetima visoke temperature i/ili niskih koncentracija soli, DNK

proba i hromosomski fragment moraju biti vrlo visoke (gotovo savršene) komplementarnosti kako bi hibridizirali. Ovakvi uvjeti se označavaju kao **visoko strogi uvjeti** i koriste se za detekciju bliske ili precizne komplementarnosti između probe i hromosomskog DNK fragmenta. Ako se procedura provodi pri niskoj temperaturi i/ili visokoj koncentraciji soli, DNK sekvence hibridiziraju sa probom sa kojom nemaju visok stepen komplementarnosti. Ovo se označava kao **nisko strogi uvjeti** i koriste se za detekciju homolognih gena s DNK sekvencama koje su slične, ali ne identične kloniranom genu koji se koristi kao proba. Na **Slici 6.3A**, visoko strogi uvjeti otkrivaju da je gen od interesa jedinstven u genomu. Međutim, pri niskim strogim uvjetima, detektiraju se dodatna dva benda. Ovi rezultati sugeriraju da je ovaj gen član familije gena sastavljene od tri različita člana.

6.4 Northern blotting

Najstarije metode za detekciju specifične iRNK počivaju na hibridizaciji osobitih, obilježenih proba. Jedna od tih metoda je poznata kao **Northern blot**. Sama metoda je razvijena 1977. godine, a nazvana je u duhu analogije sa tehnikom Southern blot koja analizira DNK (Southern blot je nazvan po biologu Edwinu Southernu, pa nazivi Northern blot kod tehnike za analizu RNK, kao i Western blot za analizu proteina zapravo nemaju nikakve veze sa geografijom, već su svojevrsna šala). Blotting procedura počinje sa ekstrakcijom ukupne RNK iz homogeniziranih uzoraka tkiva ili ćelija, nakon čega se vrši separacija elektroforezom. Nakon elektroforetske separacije purificiranog ekstrakta RNK slijedi imobilizacija na membranu (nitrocelulozni filteri ili najlon membrane). S obzirom na činjenicu da su gelovi veoma osjetljivi i da probe ne mogu doći do matriksa, RNK uzorci razdvojeni po veličini se transferiraju na membranu putem kapilarnog ili vakuum blotting sistema. S obzirom na negativni naboj nukleinskih kiselina, u Northern blot proceduri najveću učinkovitost imaju najlonske membrane koje su pozitivno nabijene. Također, pufer za transfer najčešće sadrži formamid, jer on snižava temperaturu vezivanja u interakciji probe i molekule RNK, čime se eliminira potreba za korištenjem visokih temperatura koje bi mogle dovesti do degradacije RNK.



Slika 6.3 Southern blotting metod. A: Hromosomska DNK je izolirana iz ćelija i digestirana restrikcijskim enzimom kako bi se dobilo mnogo fragmenata. Fragmenti su potom elektroforetski razdvojeni na osnovu molekulske mase i denaturirani s NaOH. Bendovi sa gela su preneseni na najlonsku membranu. Potom je membrana stavljena u pufer sa radioaktivno označenim probama. Kada je DNK proba hibridizirana sa mješavinom hromosomskih fragmenata na visokoj temperaturi i/ili niskoj jonskoj snazi (*visoko strogi uvjeti*), proba prepoznaje samo jedan bend. Kada se hibridizacija provodi na niskoj temperaturi i/ili visokoj jonskoj snazi (*nisko strogi uvjeti*), stvoren je pojedinačni bend, kao i dva dodatna benda; B: Tradicionalni način prijenosa DNK na najlonsku membranu; C: Elektroforetski prijenos DNK na najlonsku membranu. (preuzeto i prilagođeno iz Brooker, 2012).

Sljedeći korak u proceduri je hibridizacija sa probama koje su komplementarne dijelu ciljne sekvence. Ovo omogućava detekciju prisustva specifične iRNK, ukoliko je proba dovoljno specifična i ukoliko je njena veličina dobro procijenjena. Membrana se obavezno ispira s ciljem odstranjivanja nespecifično povezanih proba, a signal se detektuje rendtgenskim filmom i kvantificira denzitometrijski. RNK uzorci se najčešće separiraju na agaroznim gelovima koji sadrže formaldehid kao agens za denaturaciju. Denaturacija formaldehidom je neophodna, jer intramolekularno sparivanje baza dovodi do stvaranja sekundarne strukture RNK, a razdvajanje po molekulskoj težini zahtijeva linearnu formu. Gelovi se mogu bojiti etidijum bromidom i posmatrati pod UV svjetlom.

Poliakrilamidna gel elektroforeza sa ureom se također može koristiti za separaciju RNK, ali najčešće u slučaju fragmentirane ili mikro RNK. Probe za Northern blot su načinjene od nukleinskih kiselina komplementarne sekvence dijelu RNK od interesa. One mogu biti DNK, RNK ili oligonukleotidne, sa najmanje 25 baza komplementarnih ciljnoj sekvenci. Probe moraju biti obilježene ili radioaktivnim izotopima ili hemluminiscentno, gdje posebni enzimi (npr. alkalna fosfataza) degradiraju hemluminiscentne supstrate producirajući detektabilnu emisiju svjetla. Hemluminiscentno obilježavanje se može odvijati tako što se proba pričvrsti na enzim ili se proba obilježava sa ligandom (npr. biotin) koji je povezan sa enzimom. Rendtgenski film može detektovati i radioaktivni i hemluminiscentni signal.

Poredeći snagu signala u različitim uzorcima, moguće je procijeniti relativnu količinu specifične iRNK prisutne u svakom uzorku. Ipak, postoje i određena ograničenja ove tehnike. Za početak, iako je na osnovu jačine signala moguće dobiti relativnu estimaciju kvantiteta, načelno nije moguće izvršiti mjerenje apsolutnog broja molekula specifične iRNK. Nadalje, sama tehnika nije mnogo senzitivna, te zahtijeva poprilično veliku količinu RNK. Zbog toga se može desiti da se od polaznog materijala ne dobije dovoljna količina ciljne molekule. Na primjer, ukoliko se observira ekspresija određenih gena kod patogenih bakterija dok rastu u inficiranom domaćinu (a ne u laboratorijskim uslovima), postoji velika vjerovatnoća da neće biti moguće dobiti veliku količinu RNK kako bi se implementirao Northern blot postupak. Iz tog razloga, mnogo su popularnije tehnike zasnovane na PCR reakciji. S druge strane,

Northern blot ima i određene prednosti. Prije svega, ovo je jedna od glavnih metoda za determinaciju veličine specifičnog transkripta, kao i za detekciju prisustva različitih transkripta određenog gena. Ovo je važno u kontekstu spoznaje da je broj gena značajno manji od broja genskih produkata. Jedan od razloga za to je diferencijalno prekrivanje gena, što se učinkovito može detektovati Northern blot tehnikom. Jedna varijanta ove metode označava se kao reverzni Northern blot i u tom slučaju, nukleinska kiselina koja je supstrat i koja se veže na membranu je zapravo kolekcija izoliranih DNK fragmenata, dok je RNK proba ekstrahirana iz tkiva i radioaktivno obilježena. Ova obrnuta procedura omogućava evoluciju metode u smjeru profiliranja i monitoringa genske ekspresije.

6.5 Western blotting

Western blot (WB) je najčešće korišteni zlatni standard za separaciju, vizualizaciju, identifikaciju i kvantifikaciju različitih proteina iz kompleksne proteinske smjese. Separacija proteinske mješavine se vrši SDS-PAGE tehnikom (sodium dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza) na osnovu molekulske težine, za čim slijedi elektroforetski transfer proteina na membranu. WB tehnikom je moguće identificirati jedan ili više ciljnih proteina istovremeno, kroz dva glavna koraka. Prvi korak je **SDS-PAGE**, odnosno elektroforeza, a drugi je tzv. **immunoblotting**, koji podrazumijeva tri ključna elementa: separaciju po veličini, transfer na membranu i identifikaciju ciljnog proteina korištenjem primarnih, te nadalje sekundarnih antitijela. Nekada se WB tehnika kolokvijalno označava kao *immunoblotting* zbog činjenice da se za detekciju specifičnog antigena koriste antitijela.

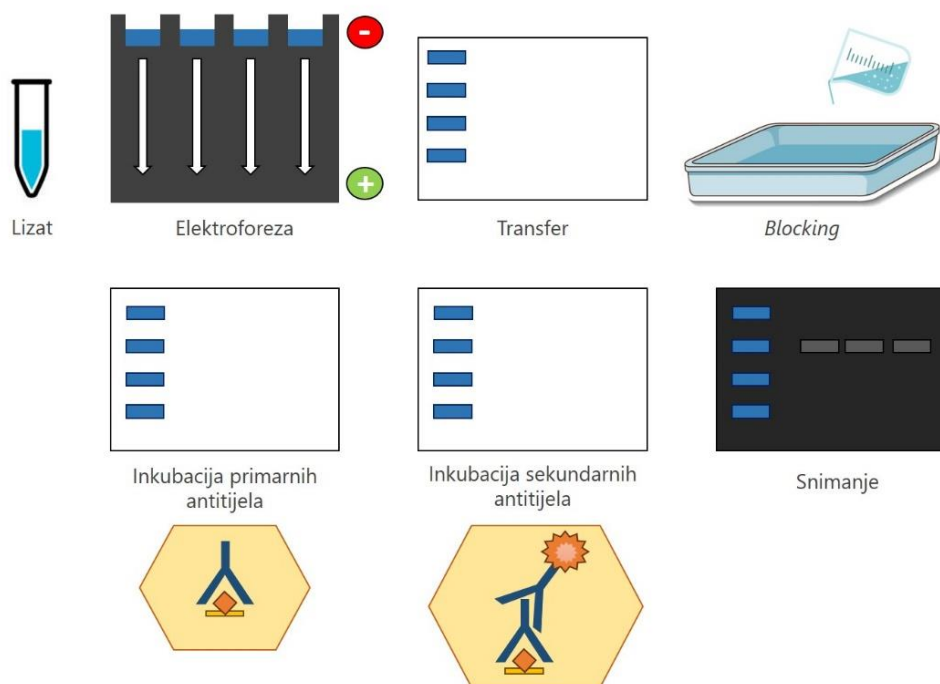
Western blot metoda počinje sa pripremom uzoraka, a završava sa detekcijom proteina od interesa. Slijed postupaka u višestepenoj WB tehnici je prikazan na **Slici 6.4**. Priprema uzoraka se može posmatrati kao ključni korak procedure, a najčešći uzorci su ćelije i tkiva. U zavisnosti od lokacije ciljnog proteina u ćeliji tj. tkivu, koriste se različiti puferi za liziranje sa proteaznim inhibitorima. Za potrebe analize fosforilacijskog statusa proteina, sa puferima za liziranje se koriste inhibitori fosfataza. Nakon ekstrakcije, neophodno je znati koncentraciju proteina, te se vrši priprema dilucije i miješanje sa drugim tipom pufera kako bi se izvela elektroforeza. Separacija

proteina se vrši uz korištenje posebnih gelova (tzv. *stacking* i *resolving* poliakrilamidni gel). **Stacking gel** omogućava formiranje tankih i oštih pruga usljed specifične koncentracije i promjene pH vrijednosti. S druge strane, u zavisnosti od molekulske težine proteina i veličine pora, separacija se odvija na **resolving gelu**, što je poznato kao diskontinuirana gel elektroforeza. Nakon razdvajanja, proteini u gelu se elektroforetski transferiraju na adsorpcijsku membranu. Sam transfer proteina se može izvršiti polusuhim ili vlažnim sistemom, pri čemu je vlažni transfer podesan za proteine velike molekulske mase (preko 100 kDa). U ovom koraku može se dodati sodium dodecil sulfat (SDS), a transfer proteina se može poboljšati balansiranjem procenta metanola i SDS reagensa.

Za vizualizaciju proteina transferiranih na membranu često se koristi tzv. Ponceau bojenje. Nakon transfera, vrši se bojenje ukupnih proteina (eng. *Total Protein Staining*, TPS), uz pomoć komercijalnih boja kao što su: Coomassie R-250, Ponceau S, Amido Black, Cy5, Sypro Ruby itd. U ovom koraku ključno je izvršiti procjenu ukupne količine transferiranih proteina. S ciljem preveniranja nespecifičnih vezivanja primarnih i sekundarnih antitijela za membranu, obavezno je izvršiti tzv. **blocking** postupak. On se najčešće izvodi mlijekom u prahu ili otopinom goveđeg serumskog albumina (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA). U sljedećoj fazi, membrana se inkubira sa primarnim antitijelima, koja se specifično vežu za proteine od interesa, a nakon toga slijedi ispiranje kako bi se odstranila nepovezana primarna antitijela, te se membrana izlaže sekundarnim antitijelima koja se vežu za primarna. Sekundarna antitijela su obilježena reporterskim enzimom konjugiranim sa hromogenim, hemluminiscentnim ili fluorescentnim supstratom koji se može detektovati i fotografirati. Detekcija proteina se vrši korištenjem radioaktivno obilježenih proba (direktno), te kolorimetrijski ili hemluminiscenento (indirektno).

Od 1980. godine, Western blot je vrlo popularna metoda u molekularnoj biologiji, a godinama se se razvijale brojne optimizirane varijante metode kao što su: kvantifikabilni fluorescentni WB, kvantitativni kompjuterizirani WB, jednostanični WB, mikrofluidni WB, kapilarni i mikročip elektroforetski WB itd. Western blot metoda ima široku primjenu u biomedicinskim istraživanjima, kao i u dijagnostici raznih bolesti. Koristi se u detekciji autoimunih

poremećaja, dijagnostici infektivnih i neinfektivnih bolesti, identifikaciji ciljnih proteina, izučavanju interakcije organskih makromolekula, post-translacijskim modifikacijama, subcelularnoj lokalizaciji, karakterizaciji antitijela, detekciji izoformi proteina, mapiranju epitopa itd.



Slika 6.4 Pojedini postupci u Western blot metodi.

7

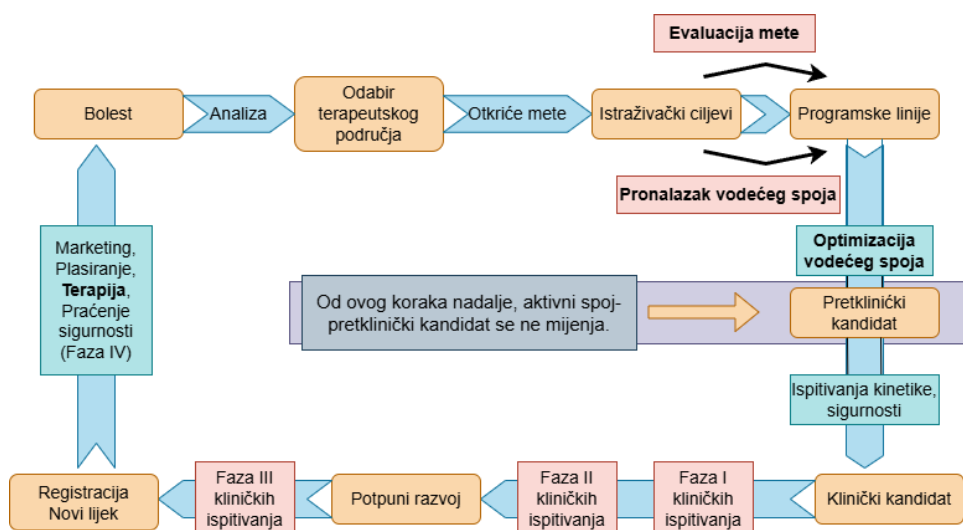
Molekularni docking

Amar Osmanović

7.1 Otkriće lijekova

Otkriće lijekova je multidisciplinarni proces čiji je cilj identificirati nove terapijske molekule koje mogu spriječiti ili liječiti određene bolesti. Otkrivanje lijekova ima presudnu ulogu u modernoj farmaciji i medicini i predstavlja ključnu translacijsku aktivnost koja poboljšava ljudsko zdravlje. Unatoč napretku, otkrivanje lijekova i dalje se oslanja na metode pokušaja i pogrešaka i integrira različite naučne discipline, uključujući biologiju, farmaceutsku hemiju, strukturnu biologiju i farmakologiju. Farmaceutske tvrtke, akademske institucije i naučne zajednice širom svijeta aktivno pridonose potrazi za novim hemijskim entitetima (molekulama lijekova) za borbu protiv širokog spektra bolesti. Proces otkrivanja molekule lijeka (liganda) koji stupa u interakciju s određenom metom lijeka - kao što je receptor, enzim, jonski kanal, transporter, protein-protein interakcija ili DNK - je i skup i dugotrajan. U prosjeku, potrebno je između 10 i 15 godina i ulaganje u prosjeku od jedne do tri milijarde američkih dolara. Proces otkrivanja lijekova prikazan je na **Slici 7.1**, a u osnovi se može podijeliti u četiri ključne faze:

1. Identifikacija i validacija mete
2. Otkrivanje i razvoj potencijalnog lijeka (uključujući identifikaciju i optimizaciju vodećeg spoja/potencijalnog lijeka (eng. *lead*))
3. Pretkliničke studije
4. Klinička ispitivanja



Slika 7.1 Shematski prikaz procesa otkrivanja novih lijekova.

Otkriće novog lijeka ključno je za rješavanje problema terapije za bolesti za koje nedostaju efikasni tretmani ili za pružanje prednosti u odnosu na postojeće terapije, kao što su smanjene nuspojava, povećana učinkovitost, poboljšana saradnja pacijenata i smanjene interakcije lijekova. Razumijevanje biologije bolesti - posebno identifikacija disfunkcionalnih biomolekula ili meta za lijekove koje pokreću patologiju bolesti - ključno je za otkrivanje lijekova, pa je stoga i identifikacija mete prvi i najosnovniji korak u ovom procesu.

Mete za lijekove spadaju u dvije kategorije: potvrđene mete (naučno potvrđene s poznatim funkcijama) i nove mete (koje zahtijevaju daljnje istraživanje). Dok je uloga poznatih meta opsežno proučavana, nove mete zahtijevaju temeljita istraživanja i validaciju korištenjem naprednih metodologija. Nekoliko naučnih pristupa - uključujući fenotipski *screening*, genetičke studije, transgene životinjske modele, te molekularne tehnike - široko se koriste za identifikaciju i validaciju meta. Nakon identifikacije mete, sljedeći korak je otkrivanje sintetskog ili prirodnog hemijskog spoja koji se naziva **pogodak** (eng. *hit*) i **vodeći spoj** (eng. *lead*) koji se veže na metu i modulira njenu funkciju. Snaga, efikasnost, sigurnost i svojstva slična lijeku (eng. *druglikeness*) molekule vodećeg spoja dodatno su optimizirana kroz ponavljajuće testiranje in silico, in vitro i in vivo. **Odnosi strukture i**

aktivnosti (eng. *Structure-Activity Relationship*, SAR) razvijeni su za procjenu farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava, pomažući sintezu i procjenu analoga. Glavna molekula prolazi više ciklusa optimizacije prije nego što se razvije u kandidata za lijek. U pretkliničkim studijama, svojstva sinteze, formulacije, jačine i ADMET-a (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost) procjenjuju se putem in vitro i in vivo eksperimenata. Nakon što se identificiraju moćne i sigurne molekule sa poželjnim ADMET osobinama, nastavlja se s kliničkim ispitivanjima. Kliničke studije procjenjuju sigurnost, efikasnost, dozu, nuspojave, farmakokinetiku i farmakologiju lijeka kod dobrovoljaca i pacijenata. Ako kandidat za lijek pokaže efikasnost, sigurnost i podnošljivost s minimalnim nuspojavama, dobiva odobrenje regulatornih agencija. S obzirom na svoju složenost, otkrivanje lijekova je visoko interdisciplinarni poduhvat, koji zahtijeva saradnju, između ostalih, biohemičara, molekularnih biologa, strukturnih biologa, farmaceutskih hemičara, računarskih biologa, farmakologa, kliničara i statističara.

7.1.1 Računarski potpomognut dizajn lijekova za otkriće novih lijekova i njihov razvoj

Otkrivanje i razvoj vodećeg spoja uključuje identifikaciju sintetičke ili prirodne hemijske molekule/peptida/antitijela koja se specifično i efikasno veže na metu lijeka i time modulira njegovu biološku funkciju. Molekule vodećeg spoja mogu se smatrati prototipom iz kojeg se razvijaju molekule lijeka. Početni korak u otkrivanju vodećeg spoja je identificirati početnu molekulu koja pokazuje razumnu biološku aktivnost prema ciljnom proteinu. I eksperimentalne i računarske metode naširoko se koriste za identifikaciju i optimizaciju vodećih spojeva. Neke od široko korištenih eksperimentalnih metoda koje se koriste za identifikaciju pogodaka uključuju screening visoke propusnosti (eng. *High-Throughput Screening*, HTS), screening kombinatorijalne biblioteke, screening temeljen na znanju (eng. *knowledge-based screening*), screening temeljen na fragmentima itd. **HTS** je dobro definirana i naširoko korištena eksperimentalna metoda u kojoj se deseci, hiljade pa i mnogo više hemijskih entiteta ispituju u in vitro uslovima (tj. testu temeljenom na ćelijama/enzimu) protiv ciljnog proteina kako bi se pronašli početni hemijski spojevi s očekivanom biološkom aktivnošću. U

kombinatorijalnom screeningu, veliki broj strukturno različitih spojeva iz biblioteke sintetizira se sistemskim kovalentnim povezivanjem različitih sintetskih gradivnih blokova i podvrgava se screeningu protiv određene mete lijeka kako bi se znala njihova pozitivna interakcija s ciljnim proteinom. Dalje se identificirani pozitivni pogoci procjenjuju za razvoj vodećeg spoja i optimizaciju. U screeningu temeljenom na fragmentima, hiljade hemijskih fragmenata (molekularne težine <250 Da) procjenjuju se na biološku aktivnost sa željenim ciljnim proteinom pomoću biohemijskih i biofizičkih metoda.

Međutim, identifikacija potencijalnih lijekova pomoću eksperimentalnih metoda je skupa i dugotrajna budući da zahtijeva opširan razvoj i validaciju složenih sistema ispitivanja; pored toga, spojevi moraju biti fizički dostupni za biološka ispitivanja. Stopa potencijalnih lijekova za HTS i druge eksperimentalne metode izuzetno je niska i zato rezultira ograničenom upotrebom za pregled velike hemijske biblioteke spojeva. Alternativno, računarske metode poznate kao **tehnike računarski potpomognutog dizajna lijekova** (eng. *Computer-Aided Drug Design*, CADD), poput metoda virtuelnog screeninga (eng. *Virtual Screening*, VS), pojavile su se kao moćne tehnike za identifikaciju potencijalnih lijekova. U VS eksperimentima, molekularna biblioteka koja se sastoji od miliona hemijskih molekula pregledava se računarski (in silico) u kratkom vremenu, a spojevi koji su predviđeni kao aktivni/pozitivni se zatim koriste u daljnjem biološkom testiranju, dok se filtrirani neaktivni/negativni spojevi preskaču iz biološkog testiranja. Ova VS strategija za identifikaciju vodećeg spoja značajno smanjuje troškove i radno opterećenje u usporedbi s HTS. Nakon što se vodeća molekula identificira sa željenom biološkom aktivnošću, ona prolazi kroz nekoliko ciklusa hemijske optimizacije, najčešće metodom sinteze analoga, kako bi se poboljšala farmakokinetika, farmakodinamika i profil toksičnosti.

Nekoliko strategija optimizacije vodećeg spoja iz farmaceutske hemije, kao što je sinteza serije kongenera (srodni hemijski spojevi), širenje/kontrakcija prstena, bioizosterne zamjene itd., provodi se kako bi se pronašao optimizirani vodeći spoj. Takvi naponi u optimizaciji (razvoju) vodećeg spoja osiguravaju odgovarajuće kandidate za lijekove za testiranje u pretkliničkim

modelima i kliničkim ispitivanjima. Tehnike CADD pomažu u identificiranju/predviđanju regija u molekuli vodećeg spoja, gdje bi se mogle izvesti hemijske modifikacije (korisno za analognu sintezu) kako bi se poboljšala efikasnost ili ADME svojstva molekule vodećeg spoja. Takva predviđanja pomažu smanjiti broj analoga koji se stvarno sintetiziraju i testiraju eksperimentalno i tako smanjuju troškove i vrijeme potrebno za identificiranje optimizirane molekule vodećeg spoja.

Metode CADD-a klasificiraju se u dvije kategorije, i to kao **dizajn lijeka temeljen na strukturi** (eng. *Structure-Based Drug Design*, SBDD) i **dizajn lijeka temeljen na ligandu** (eng. *Ligand-Based Drug Design*, LBDD). Glavni cilj ovih metoda je identificirati terapijski učinkovite male hemijske/vodeće molekule koje bi se mogle razviti u lijek za liječenje/prevenciju bolesti. Tehnike SBDD, uključujući molekularni docking, virtuelni screening na temelju strukture, screening farmakofora (na temelju strukture), de novo dizajn lijeka i tehnike molekularne dinamike (MD), naširoko se koriste za identifikaciju i optimizaciju vodećeg spoja. U molekularnom dockingu, interakcija i način vezanja molekule liganda mogu se predvidjeti s ciljnim proteinom, a zatim se izvedeni rezultat može koristiti za bolju identifikaciju i optimizaciju procesa. Virtuelni screening temeljen na dockingu (eng. *Docking-Based Virtual Screening*, DBVS) jedna je od najčešće korištenih SBDD tehnika za identifikaciju pogodaka. U ovoj se metodi milioni spojeva hemijske biblioteke virtuelno procjenjuju za interakciju s biološkom metom pomoću molekularnog dockinga. Dodatno, metode screeninga farmakofora temeljene na strukturi mogu se koristiti za screening velikog broja spojeva iz biblioteke za identifikaciju pogodaka. Koristeći de novo tehnike dizajna lijekova, može se dizajnirati raznolik skup novih hemikalija ili molekula vodećeg spoja. Metode LBDD, uključujući pretraživanje sličnosti, pretraživanje substrukture, farmakoforski screening (na temelju liganda), kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR), itd., opsežno se koriste za identifikaciju i optimizaciju potencijalnih lijekova. U metodama koje se temelje na ligandima, samo se postojeće znanje o molekulama liganda koristi za generiranje modela farmakofora koji bi se mogao koristiti za predviđanje novih molekula s biološkom aktivnošću. Uz to, LBDD tehnike se također mogu koristiti za procjenu molekularnih svojstava

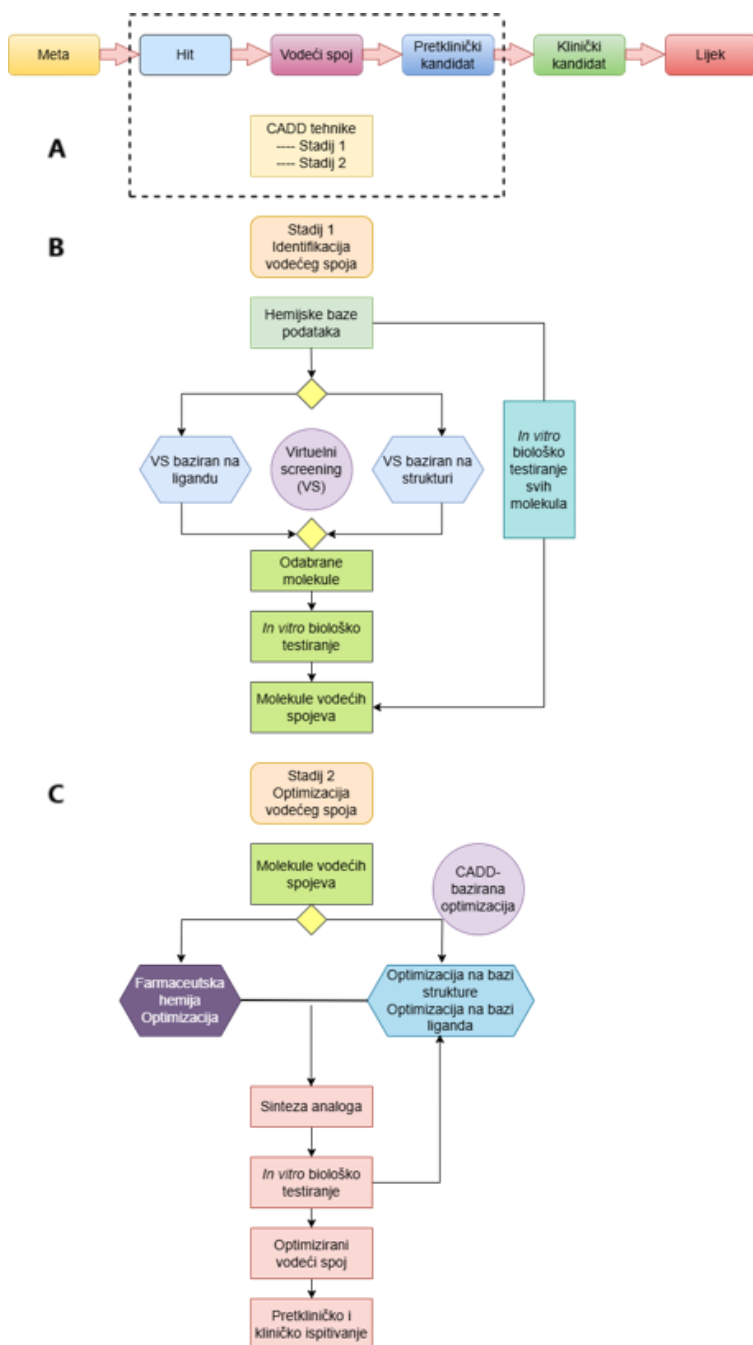
liganda, uključujući ADMET svojstva. Stoga su CADD tehnike izuzetno korisne za bolje otkrivanje i razvojni proces. Ove se metode uglavnom koriste u kombinaciji s eksperimentalnim metodama za efikasno otkrivanje i razvoj vodećih spojeva. **Slika 7.2** prikazuje različite faze otkrivanja lijeka i korištenje CADD metoda za identifikaciju i optimizaciju vodećih spojeva.

7.2 Osnove molekularnog dockinga

Molekularni docking je ključna tehnika u molekularnom modeliranju koja se koristi za predviđanje željene orijentacije vezanja jedne biomolekule s drugom, što dovodi do stvaranja stabilnog kompleksa. Razumijevanje biomolekularnih kompleksa ključno je za analizu asocijacija i energija vezanja, koje se procjenjuju pomoću specifičnih funkcija bodovanja. Način na koji biomolekule međusobno djeluju i usklađuju se utiče na biološke signale, izazivajući agonističke ili antagonističke efekte. Stoga je proučavanje afiniteta vezanja i orijentacije bitno za razumijevanje snage signala i bioloških odgovora. Osim toga, u uslovima bolesti, uvid u biomolekularne komplekse omogućuje racionalan dizajn inhibitornih malih molekula kao potencijalnih lijekova.

Molekularni docking može se definirati kao problematika optimizacije, s ciljem određivanja optimalne orijentacije liganda koji se najefikasnije veže na ciljni protein. Ova se interakcija često uspoređuje s modelom "ključ i brava", gdje **ligand** (ključ) mora imati ispravnu konformaciju da stane na mjesto **receptora** (brava). Međutim, u fiziološkim uslovima ni ligand ni receptor ne ostaju statični. Ligand prilagođava svoju konformaciju veznom mjestu, dok protein prolazi kroz strukturna prilagođavanja kako bi se prilagodio ligandu. Ove strukturne modifikacije mogu varirati od manjih pomaka aminokiselinskih ostataka do preuređivanja domene proteina velikih razmjera. Stoga efikasan docking pristup mora uključivati **model "induciranog uklapanja"**. Unatoč varijacijama u algoritmima za molekularni docking, svi se pristupi sastoje od dvije temeljne komponente: funkcije bodovanja i metode pretraživanja.

Funkcija bodovanja predstavlja hemijski model, procjenjujući slobodnu energiju danog molekularnog rasporeda i rangirajući ga prema tome.



Slika 7.2 A: Primjena tehnika računarski potpomognutog dizajna lijekova (CADD) u različitim fazama otkrivanja lijeka; B: primjena CADD-baziranog virtuelnog screeninga za identifikaciju vodećeg spoja; C: primjena CADD za optimizaciju vodećeg spoja. (preuzeto i prilagođeno iz Coumar, 2021)

Metoda pretraživanja istražuje moguće konfiguracije vezanja kako bi se identificirala optimalna poza. Docking je u biti problem optimizacije, gdje je cilj pronaći globalni minimum bodovne funkcije uzimajući u obzir varijable kao što su položaj, orijentacija i konformacija.

Početkom 1980.-ih započela su istraživanja molekularnog dockinga s rigidnim biomolekulama. Kako su se metodologije dockinga razvijale, uvođenje algoritama pretraživanja i bodovanja omogućilo je razmatranje fleksibilnosti liganda, što je dovelo do "polufleksibilnog" dockinga. Uz prepoznavanje konformacijskih promjena u biomolekulama izazvanih ligandom, sredinom 1990.-ih razvijeni su fleksibilni algoritmi za docking. Ovaj napredak je proširio aplikacije dockinga izvan jednostavnih interakcija protein-ligand kako bi uključio prenamjenu lijeka i predviđanje nuspojava.

Za postupak molekularnog dockinga potrebno je nekoliko ključnih komponenti: strukture receptora i liganada (bilo makromolekula ili malih molekula), konformacijske metode pretraživanja za uzorkovanje različitih konformacija receptora i liganda, te mehanizam rangiranja ili bodovanja za određivanje najbolje orijentacije dockinga. Trodimenzionalna struktura receptora može se dobiti pomoću eksperimentalnih tehnika kao što su rendgenska kristalografija i NMR ili putem računarskih metoda kao što je homološko modeliranje. Strukture liganda mogu se preuzeti iz hemijskih baza podataka ili ručno generirati pomoću računarskog programa za molekularno modeliranje. Budući da te strukture predstavljaju statične konformacije, koriste se algoritmi pretraživanja kako bi se identificirali njihovi fiziološki stabilni, niskoenergetski oblici. Da bi se dockirao ligand, mora se identificirati njegovo vezno mjesto na receptoru. Obično je to mjesto vezanja supstrata, ali u nekim slučajevima može biti uključeno i alosteričko mjesto. Protokoli dockinga generiraju energetsku kartu (poznatu i kao "mreža"; eng. *grid*) koja karakterizira oblik, veličinu i svojstva mjesta vezivanja. Ova mreža služi kao vodič za pronalaženje optimalne orijentacije liganda. Nakon što se konformacije generiraju korištenjem algoritama pretraživanja, one se spajaju na vezno mjesto receptora na temelju mreže. Izračuni energije interakcije daju početnu procjenu kvalitete svake dockirane poze, koja se zatim rangira u skladu s tim. Funkcije bodovanja koje se koriste za rangiranje ovise o različitim parametrima koji se odnose na afinitet vezanja.

Za provođenje docking studije bitni su sljedeći elementi:

- Informacije o meti – Struktura ciljnog proteina visoke razolucije, dobivena rendgenskom kristalografijom, NMR, cryo-EM ili homološkim modeliranjem, idealno s poznatim mjestom vezanja liganda. Ako nije poznato mjesto vezivanja, računarski programi mogu predvidjeti potencijalna mjesta vezivanja.
- Podaci o ligandu – Hemijska struktura liganda koji se testira na interakciju s metom. Razumijevanje ovih interakcija može pomoći u optimizaciji liganda i poboljšanju efikasnosti.
- Računarski program/alati za docking – Računarski programi koji se koriste za izvođenje studija dockinga za različite biomolekularne interakcije, kao što su kompleksi protein-ligand, protein-protein ili protein-DNK. Mnogi programi za docking dizajnirani za interakcije protein-ligand također podržavaju virtualni screening velikih biblioteka spojeva.
- Računarski resursi – Docking izračuni mogu se izvesti korištenjem standardne računarske opreme, računarskih sistema visokih performansi (eng. *High Performance Computing*, HPC) ili platformi temeljenih na *cloud* sistemu, ovisno o veličini studije. HPC sistemi omogućuju virtualne projekte screeninga velikih razmjera koji uključuju milione spojeva, što bi bilo nepraktično na običnom desktop računar.

Meta lijeka je biomolekula čija promjena, kao što je mutacija ili promjena ekspresije, može pridonijeti razvoju bolesti. Ligandi ili molekule lijeka koje se vežu na ove mete mogu modulirati njihovu funkciju i imati terapijske efekte. Napredak ćelijske i molekularne biologije, genomike i proteomike doveo je do identifikacije brojnih meta lijekova. Međutim, samo je određen broj tih meta strukturno karakteriziran i pohranjen u javnim bazama podataka. Metode računarskog modeliranja poput homološkog modeliranja i *ab initio* predviđanja strukture pomažu riješiti problem ovog nedostatka.

Većina prijavljenih meta lijekova su proteini, uključujući:

- G protein spregnuti receptori (GPCR),
- Enzimi (npr. različite kinaze, proteaze, fosfataze),

- Jonski kanali (npr. ligand i napon-ovisni kanali),
- Transporteri (npr. SGLT2),
- Strukturni proteini (npr. tubulin, membranski transportni proteini).

Proteini su bitne biološke makromolekule koje obavljaju različite funkcije unutar živih organizama, uključujući enzimsku katalizu, molekularni transport i skladištenje, hormonsku signalizaciju, strukturnu potporu i imunološku obranu. Enzimi djeluju kao biokatalizatori, olakšavajući gotovo sve biokemijske reakcije, dok skladišni proteini služe kao rezerve aminokiselina i metalnih jona. Transportni proteini pomažu pri premještanju molekula i jona unutar organizma, a hormoni funkcioniraju kao glasnici, prenoseći signale za regulaciju bioloških procesa. Strukturni proteini doprinose održavanju oblika i organizacije ćelija, dok antitijela prepoznaju i neutraliziraju strane tvari poput bakterija i virusa, igrajući ključnu ulogu u imunološkoj obrani. Nekoliko baza podataka pohranjuje i omogućuje pristup ciljanim strukturama i sekvencama za mete lijekova:

- Protein Data Bank (PDB) – Besplatno dostupan repozitorij za 3D strukture biomolekula, uključujući one sa i bez vezanih liganda,
- Banka biološke magnetske rezonancije (BMRB) – Pohranjuje biomolekularne podatke dobivene NMR spektroskopijom,
- DrugBank – Sveobuhvatna baza podataka o lijekovima, ligandima i njihovim odgovarajućim metama,
- UniProt – Baza podataka sekvenci proteina koja pruža funkcionalne i strukturne uvide,
- NCBI baza podataka o proteinima – Nudi opsežne informacije o sekvencama proteina iz GenBank, RefSeq i drugih izvora.

Ligand je mala molekula ili biomolekula (npr. peptid, antitijelo) koja se veže na metu, utičući na njenu funkciju i potencijalno dovodeći do terapijskih efekata. Nekoliko baza podataka pruža informacije o ligandima za studije dockinga:

- DrugBank – Sadrži detaljne podatke o lijekovima, uključujući mehanizam djelovanja i ciljne interakcije,

- PubChem – Najveća svjetska hemijska baza podataka s otvorenim pristupom, koja sadrži male molekule, biomolekule i hemijske strukture,
- CINK – Baza podataka s preko 230 miliona spojeva koji se mogu kupiti za virtuelni screening,
- NCI baza podataka – Sadrži oko 250.000 malih molekula za virtualni screening i studije dockinga.

Molekularni docking pomaže u predviđanju biomolekularnih interakcija na atomskom nivou. Naširoko se koristi u otkrivanju lijekova za modeliranje kako se male molekule vežu na ciljne proteine. Prije dockinga, i ligand i ciljne strukture moraju se optimizirati kako bi se korigovala geometrija i podesile ostale karakteristike koje eventualno nedostaju. Mjesto vezanja liganda, koje se često identifikira iz poznatih kokristaliziranih struktura, mora se definirati za računarski program za docking studiju. Ako su nepoznata, mjesta vezanja mogu se predvidjeti pomoću drugih programa specijaliziranih za ovu vrstu predviđanja.

Dostupni su različiti programi za docking studije. Među najpoznatijim su svakako AutoDock (besplatni alat koji se široko koristi za docking malih molekula), GOLD (komercijalni alat za docking široko korišten u virtuelnom screeningu i optimizaciji vodećeg spoja), Glide (alat za docking visoke tačnosti s višestrukim nivoima preciznosti), i slično. Virtuelni pregled (VS) je računarska tehnika koja se koristi za provjeru velikih hemijskih biblioteka za potencijalne kandidate za lijekove. Spojevi s najboljim rezultatom odabiru se za daljnju procjenu. Popularni VS alati uključuju računarske programe kao što su npr. AutoDock Vina (poboljšana verzija AutoDocka s bržim i preciznijim dockingom), FlexX (komercijalni VS alat) i slično. Za razliku od konvencionalnog, obrnuti/reverzni docking povezuje jedan ligand s više ciljnih proteina kako bi se identificirale potencijalne mete za vezanje. Ovaj pristup je koristan za istraživanje prenamjene lijekova (procjena odobrenih lijekova za nove mete), za predviđanje nuspojava (prepoznavanje interakcija pored ciljnog proteina), te za optimizaciju vodećeg spoja (rafiniranje svojstava vezanja liganda). Pregled nekoliko najčešće korištenih programa za docking i njihove osobine su dati u **Tabeli 7.1**.

Tabela 7.1 Primjeri docking programa koji se koriste u računarski-potpomognutom dizajnu lijekova i njihove osobine.

Docking program	Osobine	Algoritam uzorkovanja	Funkcija bodovanja
AutoDock	Automatizirani alat za docking koji se sastoji od autogrid-a, koji se koristi za izračunavanje mreže, i autodock-a, koji se koristi za docking liganda na mrežu koju stvara autogrid. Izgrađen je s poboljšanim algoritmom za	Genetski algoritmi, Monte Carlo	Bazirana na polju sile
DOCK	predviđanje poza vezanja dodavanjem novih značajki kao što je bodovanje polja sile poboljšano solvatacijom i fleksibilnošću receptora.	Inkrementalna konstrukcija, minimizacija energije	Bazirana na polju sile
FlexX	Alat za fleksibilni docking liganda. Potpuno je automatiziran, a docking se izvodi s inkrementalnim algoritmom konstrukcije.	Inkrementalna konstrukcija	Empirijska
Glide	Nudi nekoliko načina za virtuelni screening kao što je virtuelni screening visoke propusnosti, standardna preciznost i ekstra preciznost.	Isrpna pretraga, minimizacija energije, Monte Carlo	Empirijska
GOLD	Primjenjuje genetski	Genetski algoritmi	Empirijska,

ICM	algoritam za predviđanje položaja liganda. Može se konfigurisati. Može se koristiti za hemijsko grupiranje, traženje hemijske sličnosti, molekularno modeliranje, virtuelni screening liganada, potpuno fleksibilni docking itd.		bazirana na znanju
		Monte Carlo	Empirijska

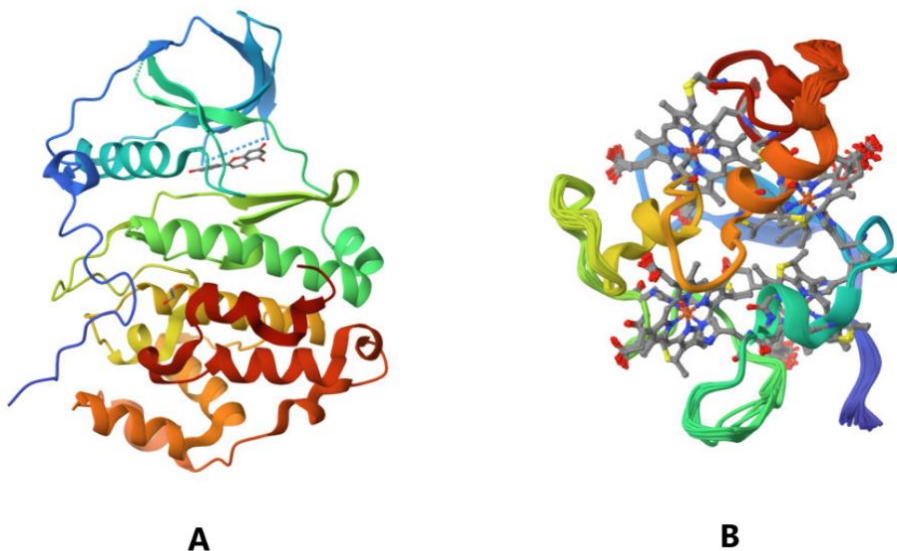
Postoje četiri glavna modela koji se koriste u molekularnom dockingu:

1. Model brave i ključa: Predložen od strane Fischer-a još 1894. godine, ovaj model sugerira da se ligand precizno uklapa u aktivno mjesto proteina zbog komplementarnih oblika. Ovaj koncept postavio je temelj za racionalni dizajn lijeka, ali različiti docking programi koriste različite algoritme za optimiziranje podudaranja oblika i veličine.
2. Model konformacijske izomerije: Ovaj model uzima u obzir fleksibilnost liganda, generirajući višestruke molekularne konformacije. Konformer s najnižom energijom smatra se globalnom konformacijom minimalne energije. Međutim, bioaktivna konformacija (oblik koji ligand poprima nakon vezanja) nije nužno konformacija s najnižom energijom, što zahtijeva temeljitu analizu uzorkovanih i optimiziranih konformera.
3. Model induciranog uklapanja: Ovdje vezanje liganda pokreće konformacijsku promjenu u proteinu, mijenjajući oblik veznog džepa kako bi se smjestio ligand. Ovaj mehanizam sugerira da rigidni docking može proizvesti netačne rezultate, budući da ne uzima u obzir dinamičku prirodu interakcija protein-ligand.
4. Model konformacijske selekcije: U ovom modelu, protein postoji u više konformacijskih stanja prije vezanja liganda. Ligand zatim "odabire" i stabilizira konformaciju više energije za vezanje. Za razliku

od modela induciranog uklapanja, gdje vezanje pokreće konformacijske promjene, ovdje se konformacijska promjena događa prije vezanja.

7.3 Eksperimentalno određivanje 3D strukture makromolekula

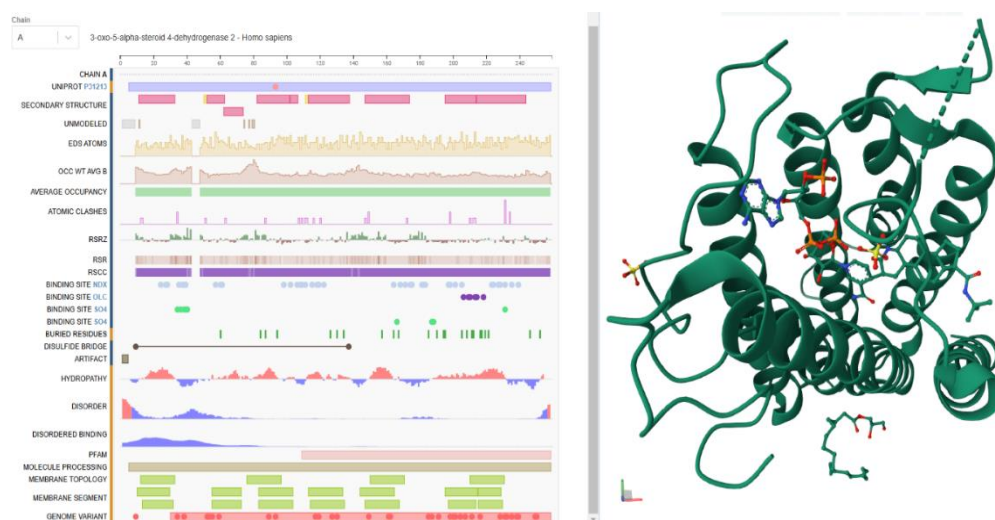
Primarne eksperimentalne tehnike za određivanje 3D strukture proteina su rendgenska kristalografija, NMR spektroskopija i kriogenska elektronska mikroskopija (eng. *Cryogenic electron microscopy*, cryo-EM). Svaka metoda ima prednosti i ograničenja. Kristalografija X-zrakama je metoda koja se najčešće koristi, pruža strukture visoke rezolucije (**Slika 7.3A**), ali zahtijeva kristalizaciju proteina, što može biti izazovno, posebno za membranske proteine. Cryo-EM se koristi za velike makromolekule i komplekse bez potrebe za kristalizacijom. Zahtijeva minimalan materijal uzorka, ali obično daje strukture niže rezolucije od rendgenske kristalografije. NMR spektroskopija je korisna za proučavanje dinamike proteina, ali zahtijeva velike količine stabilnih uzoraka proteina i nudi nižu rezoluciju od kristalografije X-zrakama (**Slika 7.3B**).



Slika 7.3 3D strukture proteina dobijene A: rendgenskom kristalografijom (PDB ID: 3AMY, rezolucija 2,3 Å); B: NMR spektroskopijom (PDB ID: 1A2I, 600 snimljenih konformera).

Rendgenska kristalografija ili kristalografija X-zrakama je temeljni alat u strukturnoj biologiji gdje se koristi za određivanje atomske i molekularne strukture kristala. Makromolekularna kristalografija ima ključnu ulogu i u preciznom određivanju kristalnih struktura makromolekula i njihovih kompleksa s ligandima, a nezamjenjiva je za dizajn lijekova na temelju strukture (SBDD). SBDD metode koriste strukturne podatke dobivene makromolekularnom kristalografijom za identificiranje ključnih mjesta i kritičnih interakcija odgovornih za biološke funkcije. Ove informacije su neophodne za dizajniranje efikasnih lijekova koji ciljaju specifične makromolekule uključene u puteve bolesti.

Tehnika se temelji na principu da atomi kristala raspršuju (difraktiraju) X-zrake u određenim smjerovima. Analizom intenziteta i uglova ovih difraktiranih zraka, generira se trodimenzionalna (3D) mapa gustoće elektrona, koja omogućava određivanje položaja atoma, njihovih hemijskih veza i bilo kojeg strukturnog poremećaja unutar kristala. Iako je postignut napredak i u drugim tehnikama, rendgenska kristalografija ostaje najmoćnija metoda za razjašnjavanje struktura makromolekula (**Slika 7.4**) kao što su proteini, DNK, lijekovi i vitamini.



Slika 7.4 Primjer sekvence i 3D strukture dobijene rendgenskom kristalografijom i pohranjene u Protein Data Bank za steroid 5-alfa-reduktazu 2 u kompleksu sa finasteridom (PDB ID: 7BW1).

Tehnika rendgenske kristalografije sastoji se od nekoliko koraka poput pročišćavanja proteina, njegove kristalizacije, izgradnje modela. Pročišćavanje ciljanog proteina bitno je za razumijevanje njegove strukture, biološke funkcije i mehanizma djelovanja. Proteini se mogu izolirati iz složenih smjesa pomoću tehnika pročišćavanja na temelju njihove veličine, afiniteta vezanja i hemijskih ili fizičkih svojstava. Odabir strategije pročišćavanja ovisi o jedinstvenim karakteristikama proteina od interesa. Kristalizacija proteina kritičan je prvi korak u određivanju strukture proteina kristalografijom X-zrakama. Uspjeh ove tehnike najviše ovisi o kvaliteti proteinskih kristala, što je dovelo do razvoja raznih naprednih metoda kristalizacije koje pomažu optimizirati uvjete rasta kristala za postizanje strukturnih podataka visoke rezolucije.

Kristalografsko usavršavanje ima za cilj optimizirati usklađivanje između atomskog modela i hemijskih ograničenja i eksperimentalnih podataka difrakcije. Cilj dotjerivanja strukture je doraditi kristalnu strukturu i postići tačne atomske parametre u usporedbi s početnim modelom. Ovaj proces je ponovljiv, s ciljem poboljšanja kvalitete strukturnog modela. Atomski položaji (x , y i z) i parametri pomaka za svaki atom prilagođeni su kako bi se poboljšalo slaganje između izračunatog strukturnog modela i uočene amplitude faktora strukture. Pročišćavanje strukture uključuje generiranje mapa gustoće elektrona i ponavljanje usklađivanja, kao što su preciziranja položaja, krutog tijela, ograničenog, nespontanog pojedinačnog B-faktora i popunjenosti.

Pročišćavanje strukture proteina postalo je brže i preciznije posljednjih godina zahvaljujući snazi naprednih računara, koja mogu efikasno obraditi složene jednačine i veliki broj uključenih varijabli. Dodatno, dostupnost brojnih kristalnih struktura dobivenih difrakcijom X-zraka u bazama podataka služi kao vrijedni referentni model, dodatno podržavajući i poboljšavajući proces usavršavanja.

7.4 Računarsko modeliranje 3D struktura proteina

Svaka klasa proteina ima jedinstvenu sekvencu aminokiselina koja diktira njihovu strukturu i funkciju. Određivanje trodimenzionalne (3D) strukture proteina ključno je za razumijevanje njegove biološke uloge. Predviđanje

strukture proteina na temelju njegove sekvence aminokiselina ostaje glavni fokus strukturne biologije.

Eksperimentalne metode kao što su rendgenska kristalografija, spektroskopija nuklearne magnetske rezonance (NMR) i kriogena elektronska mikroskopija omogućuju određivanje strukture proteina visoke rezolucije. Međutim, te su tehnike skupe, radno zahtjevne i dugotrajne, što ograničava njihovu upotrebu u većim razmjerima. Ako je trodimenzionalna (3D) struktura proteina nedostupna, koristi se najčešće računarska metoda homološkog modeliranja za generiranje modela temeljenog na srodnoj proteinskoj sekvenci.

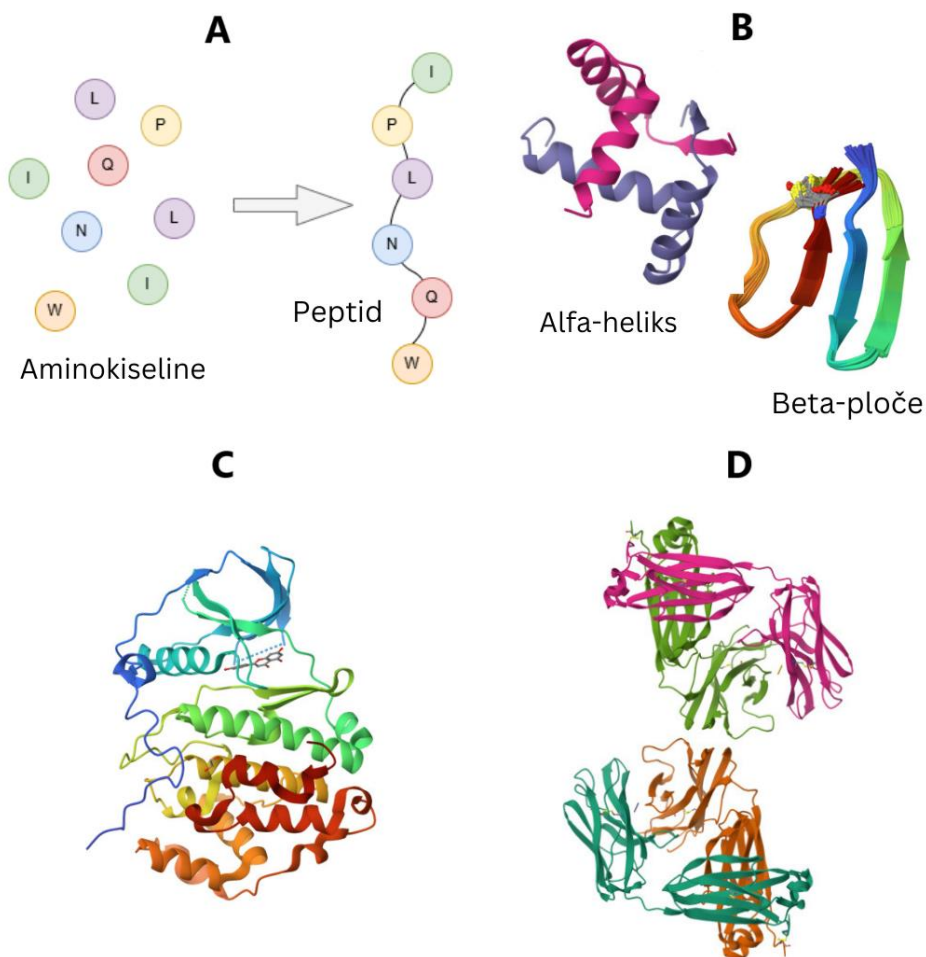
Baza podataka UniProtKB sadrži više od 250 miliona proteinskih sekvenci, uglavnom zahvaljujući napretku u velikim projektima sekvenciranja genoma. Međutim, samo 232.059 proteinskih struktura pohranjeno je u Protein Data Bank (PDB), javno dostupnom repozitoriju eksperimentalno utvrđenih proteinskih struktura. Ova značajna razlika (omjer struktura prema sekvencama = 0.0009) naglašava izazove povezane s eksperimentalnim određivanjem struktura. Kako bi se premostio ovaj jaz, razvijene su računarske metode za predviđanje strukture proteina. Ove metode spadaju u dvije glavne kategorije: pristupi temeljeni na predlošcima i pristupi bez predložaka.

Homološko modeliranje i modeliranje prema sličnosti nabora (eng. *threading*) spadaju pod modeliranje temeljeno na predlošku, dok je ab initio modeliranje pristup bez predloška. Razumijevanje strukture proteina zahtijeva poznavanje njegove hijerarhijske organizacije u primarnu, sekundarnu, tercijernu i kvarternu strukturu. Polipeptidni lanac ima *N*-kraj (slobodna amino grupa) na jednom kraju i *C*-kraj (slobodna karboksilna grupa) na drugom kraju. Proteini su konvencionalno predstavljeni s *N*-završetkom s lijeve strane i *C*-završetkom s desne strane.

Sekundarne strukture proizlaze iz lokaliziranog savijanja polipeptidnih segmenata (**Slika 7.5A**), stvarajući alfa-heliks i beta-nabrane ploče stabilizirane vodikovim vezama (**Slika 7.5B**). Bez stabilizacijskih interakcija, polipeptidni lanci poprimaju konformaciju nasumične zavojnice. Tercijerna struktura (**Slika 7.5C**) predstavlja cjelokupni 3D raspored proteina, određen interakcijama između bočnih lanaca aminokiselina (*R*-grupa), uključujući

hidrofobne interakcije, vodikove veze, jonske veze, dipol-dipol interakcije i van der Waalsove sile.

U nekim slučajevima disulfidne veze pridonose strukturnoj stabilnosti. Proteini sastavljeni od jednog polipeptidnog lanca dostižu svoju najvišu razinu organizacije na tercijernoj strukturi. Međutim, proteini s više podjedinica pokazuju kvarterne strukture (**Slika 7.5D**), stabilizirane vodikovim vezama i Londonovim disperzijskim silama.



Slika 7.5 Četiri nivoa strukturne organizacije proteina. A: primarni polipeptidni lanac aminokiseline; B: elementi sekundarne strukture (PDB ID: 1BAZ (alfa-heliks), PDB ID: 1IC9 (beta-ploče); C: tercijerna struktura (PDB ID: 3AMY); D: kvarterna struktura (PDB ID: 1MCL).

Određivanje funkcije nepoznatog proteina ostaje centralni izazov u biološkim istraživanjima. Funkcionalni uvidi mogu se dobiti pretraživanjem sličnosti sekvenci pomoću BLAST-a (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) ili filogenetske analize. Osim toga, strukturna sličnost između predviđene strukture proteina i poznatih PDB struktura može otkriti funkcionalna svojstva. Kada metode temeljene na sekvencama ne uspiju, kombinovanje sekvenci i strukturnih informacija može poboljšati funkcionalna predviđanja.

Zbog visoke cijene i zahtjevnosti rada eksperimentalnih metoda određivanja 3D strukture proteina, tehnike računarskog predviđanja pružaju bržu i troškovno učinkovitiju alternativu. Dva ključna računarska pristupa za predviđanje 3D strukture proteina uključuju modeliranje temeljeno na predlošku (homološko modeliranje i modeliranje prema sličnosti nabora) i modeliranje bez predloška (ab initio).

Homološko modeliranje predviđa proteinske strukture na temelju poznatih struktura sa značajnom sličnošću sekvenci. Proces uključuje:

1. Odabir najbolj-eg/ih predlo-ška/žaka – obično je potrebno najmanje 30% identičnosti niza kako bi se osigurala tačnost;
2. Usklađivanje sekvenci ciljnog proteinskog modela i predloška – Precizno poravnanje ključno je za uspješno modeliranje;
3. Izgradnja ciljanog proteinskog modela – Uključuje stvaranje okosnice, modeliranje petlji i predviđanje konformacije bočnog lanca;
4. Optimizacija modela – Minimizacija energije i simulacije molekularne dinamike poboljšavaju kvalitetu modela;
5. Validacija modela – Strukturna procjena osigurava stereohemijsku ispravnost i pravilan položaj atoma.

Modeliranje prema sličnosti nabora na temelju predloška (eng. *threading*) koristi se kada homologne strukture nisu dostupne, ali postoje strukture sa sličnim naborima. Metoda usklađuje ciljnu sekvencu s bibliotekom poznatih proteinskih nabora kako bi se identificiralo najbolje slaganje. Slijed se zatim navlači na okosnicu odabranog predloška, a struktura se pročišćava na temelju ograničenja presavijanja. **Ab initio modeliranje** koristi se kada ne postoji odgovarajući predložak. Predviđa strukture proteina na temelju fizičkih principa, bez oslanjanja na homologne strukture.

Proces uključuje:

- Konformacijsko pretraživanje pomoću energetske funkcije;
- Odabir modela;
- Rekonstrukciju svih atomskih struktura;
- Strukturno usavršavanje;
- Validaciju modela.

Ab initio metode teško mogu predvidjeti velike proteinske strukture (>300 aminokiselinskih rezidua) zbog izazova u konformacijskom traženju i dizajnu energetske funkcije.

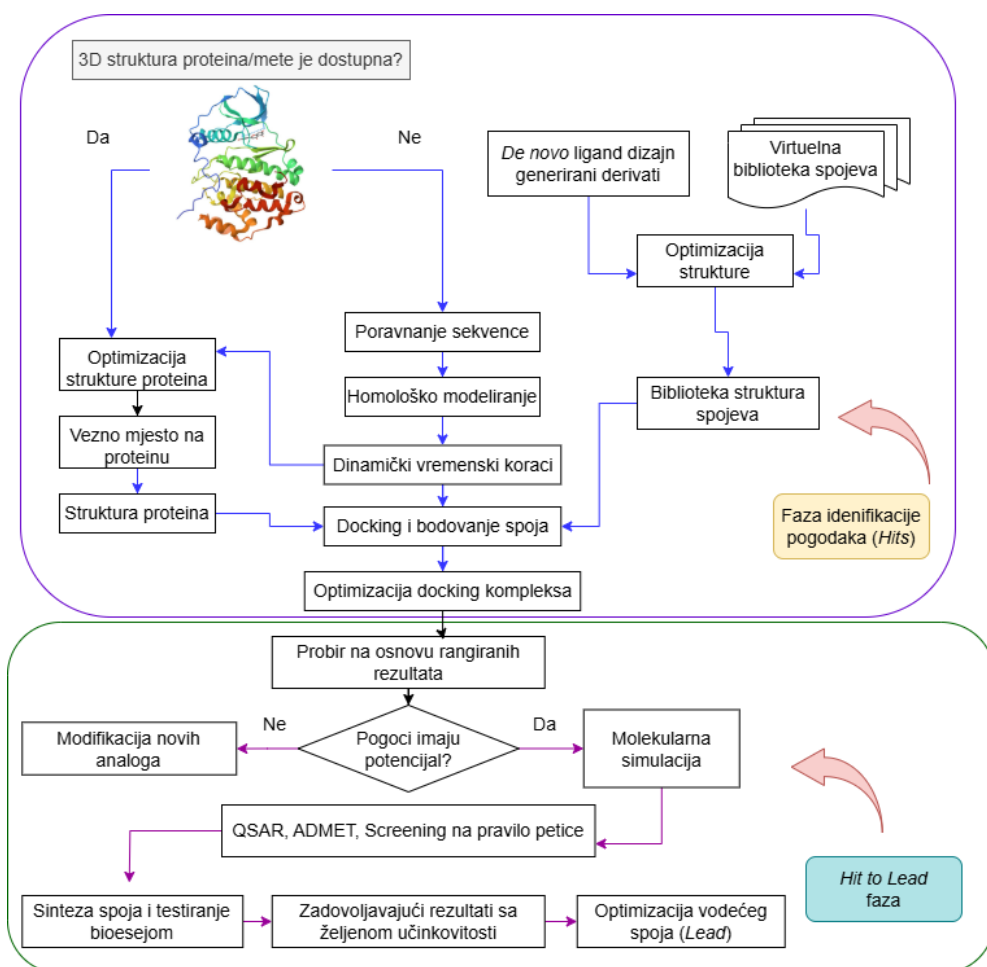
Predviđanje strukture proteina ostaje ključno, ali i izazovno područje u strukturnoj biologiji. Dok računarske metode pružaju vrijedne alternative eksperimentalnim tehnikama, predviđanje kompleksnih struktura proteina s visokom tačnošću ostaje teško, posebno u nedostatku poznatih predložaka. Istraživanja koja su u toku imaju za cilj poboljšati računarske tehnike, poboljšati konformacijsko uzorkovanje i poboljšati energetske funkcije kako bi se postigla tačnija predviđanja strukture proteina.

7.5 Biomolekularno prepoznavanje

Biomolekularno prepoznavanje događa se kroz hemijske interakcije između liganda i njegovog specifičnog receptora (ciljnog proteina) unutar živog organizma. Proteini su evoluirali tako da pokazuju visoku specifičnost u vezivanju liganda, osiguravajući precizne ćelijske funkcije. Razumijevanje ovih interakcija uveliko je poboljšano kristalnim strukturama atomske rezolucije. Brojne biohemijske baze podataka i računarski alati sada pružaju efikasne sisteme za prikupljanje, organiziranje, pohranjivanje i analizu ogromnih količina molekularnih podataka.

Osim toga, moguće je pristupiti strukturama Protein Data Bank (PDB) za proučavanje meta lijekova, što pomaže naporima u otkrivanju lijekova. Nauka o podacima uvela je nove algoritme, arhitekture i analitiku za upravljanje složenošću i raznolikošću molekularnih podataka. Ovi alati otkrivaju skrivene uvide i olakšavaju donošenje odluka u rješavanju problema. Informacije o strukturi proteina omogućuju primjenu računarskih tehnika, kao što je virtuelni screening, za identifikaciju potencijalnih kandidata za lijekove. U

ranom otkrivanju lijekova, pregledava se hiljade prirodnih proizvoda, biljnih ekstrakata i malih molekula kako bi se identificirali obećavajući kandidati za lijekove. Nakon što se pronađe potencijalni pogodak, on prolazi optimizaciju *hit to lead* (**Slika 7.6**). Prva kritična faza u otkrivanju lijeka je **identifikacija pogodaka** (eng. *hits*), gdje se identificiraju mali hemijski spojevi koji se vežu na ciljni protein i modificiraju njegovu funkciju. U idealnom slučaju, ti pogoci pokazuju specifičnost i efikasnost protiv mete, ubrzavajući razvoj lijeka s nižim stopama neuspjeha.



Slika 7.6 Shematski prikaz faze identifikacije pogodaka (*hits*) i faze *hit to lead* u postupku dizajna lijeka temeljenom na strukturi. (preuzeto i prilagođeno iz Coumar, 2021)

7.6 Različiti pristupi molekularnom dockingu

Molekularni docking može se kategorizirati u rigidni docking i fleksibilni docking na temelju fleksibilnosti molekula u interakciji. **Rigidni docking** pretpostavlja da i protein i ligand ostaju fiksirani, bez promjena u uglovima ili dužinama veza tokom procesa dockinga. **Fleksibilni docking** omogućava konformacijske promjene u ligandu, receptoru ili oboje, čineći ga računarski zahtjevnijim za izvođenje.

Prije dockinga, strukture proteina i liganda prolaze kroz procese smanjenja energije kako bi se poboljšala njihova konformacija. **Simulacije molekularne dinamike (MD)** mogu optimizirati tačnost predviđene 3D strukture. MD simulacije također se koriste za generiranje alternativnih konformacija ciljanog proteina prije molekularnog dockinga. MD simulacije provode se i nakon dockinga kako bi se procijenila stabilnost predviđenih načina vezanja, služeći kao ključni korak in silico filtriranja za odabir obećavajućih uspješnih spojeva.

Rigidni docking je pristup brzog dockinga u kojem strukture i receptora i liganda ostaju fiksirane, bez ikakvih vibracijskih stepena slobode. Temeljna pretpostavka iza rigidnog dockinga je da se vezanje liganda događa zbog komplementarne prirode receptora i liganda. Ta komplementarnost može biti strukturna, temeljena na molekularnom obliku ili površinskoj kompatibilnosti, ili hemijska, kao što se vidi u tehnici vruće tačke (eng. *hot-spot*).

Za procjenu komplementarnosti oblika, molekularna površina i receptora i liganda je opisana na temelju njihove površine dostupne otapalu (eng. *Solvent-Accessible Surface Area, SASA*). Nasuprot tome, tehnika vruće tačke procjenjuje hemijska svojstva grupa u interakciji, pod pretpostavkom da njihova kompatibilnost doprinosi vezivanju. Dok su metode geometrijske komplementarnosti efikasne i pouzdane, one ne uzimaju u obzir fleksibilnost receptora ili liganda.

Interakcije protein-protein često su vođene komplementarnošću oblika, zbog čega mnogi alati za simulaciju protein-protein dockinga provode ovaj pristup.

Budući da rigidni docking uključuje manje stepena slobode, on omogućuje brzi pregled miliona spojeva, što ga čini znatno bržim od metoda fleksibilnog dockinga. U kombinaciji s tehnikama konformacijskog uzorkovanja, rigidni docking može dati vrlo efikasne rezultate. Osim toga, budući da su hemijske značajke uključene u kriterije komplementarnosti, rigidni docking može se integrirati s pristupima koji se temelje na farmakoforima za velike screening studije.

Metode **polufleksibilnog dockinga** rade pod pretpostavkom da konformacija proteina korištena u procesu dockinga predstavlja njegovo bioaktivno stanje, na koje će se vezati ligand. Posljedično, samo ligand može biti fleksibilan, sa svim konformacijskim stepenima slobode uzetim u obzir. Međutim, ključno ograničenje ovog pristupa je da jedna konformacija proteina ne mora uvijek tačno predstavljati pravo bioaktivno stanje, što čini nemogućim objašnjenje za "inducirano uklapanje" vezanja. Nekoliko algoritama dockinga slijedi ovaj polufleksibilni model i mogu se kategorizirati na temelju njihovih konformacijskih strategija pretraživanja.

U tehnici **sistenskog pretraživanja** konformacije liganda sistemski se uzorkuju primjenom uniformnih inkremenata na svaki stepen slobode, generirajući sve moguće konformacije na kombinatorni način. Tehnika sistenskog pretraživanja istražuje cijeli konformacijski pejzaž dok se ne identificira struktura minimalne energije. Da bi se locirao globalni minimum, uzorkovanje se mora izvesti iz više početnih struktura preko različitih tačaka na konformacijskom pejzažu. Budući da to zahtijeva procjenu velikog broja konformacija, sistemske metode pretraživanja dodatno se usavršavaju korištenjem specijaliziranih tehnika uzorkovanja kako bi se povećala efikasnost i tačnost.

Metoda iscrpne pretrage slijedi strog pristup sistenskog pretraživanja, gdje se sve moguće konformacije generirane kombinacijom svih stepena slobode istražuju na uređen način. Međutim, bez odgovarajućih kriterija prekida, ovaj pristup može dovesti do kombinatorne eksplozije, čineći proces računski neizvedivim. Kako bi se to riješilo, algoritam *Glide* unaprijed izračunava mrežni prikaz aktivnog mjesta receptora, hvatajući njegov oblik i svojstva, te ga uparuje s bibliotekom predviđenih konformacija liganada minimalne

energije. Korištenjem ove mreže kao vodećeg faktora, konformacijski prostor liganda je značajno smanjen. Zatim se provodi pretraga visoke rezolucije, optimizirajući vezanje liganda kroz polja sile molekularne mehanike (MM) i pristup minimizacije temeljen na Monte Carlu.

U ovoj tehnici **pretraživanja na temelju fragmenata** ligand je podijeljen na manje fragmente, koji su neovisno rigidno spojeni na mjesto receptora. Fragmenti se zatim međusobno povezuju, uvodeći djelomičnu fleksibilnost tokom procesa sastavljanja. Pretraživanje temeljeno na fragmentima bila je prva tehnika docking pretraživanja, uvedena još 1986. godine. Od tada su razvijeni različiti pristupi na temelju različitih strategija povezivanja fragmenata.

Inkrementalna konstrukcija je proces u dva koraka koji razdvaja molekulu na rigidnu jezgru (osovinu) i fleksibilne komponente (bočne lance ili funkcionalne grupe). Druge metode temeljene na fragmentima oslanjaju se na kriterije geometrije udaljenosti (npr. DOCK) ili koriste brze algoritme za usklađivanje oblika, kao što je implementirano u docking programima kao što su ZDOCK i FlexX.

Konformacijski ansambl je tehnika koja povećava efikasnost rigidnog dockinga uvođenjem fleksibilnosti liganda kroz unaprijed generirani skup konformera, od kojih svaki varira u svim mogućim stepenima slobode. Ovi se konformeri zatim spajaju pomoću standardnog rigidnog protokola dockinga, što omogućuje brz i pouzdan proces dockinga.

Monte Carlo metode dockinga generiraju nasumične početne konfiguracije liganda i procjenjuju njihove rezultate vezanja unutar aktivnog mjesta receptora. Za svaki ligand, nasumična konformacija se dodjeljuje svim stepenima slobode korištenjem algoritma generatora slučajnih brojeva. Ta se konformacija zatim postavlja unutar receptorskog mjesta i ocjenjuje korištenjem unaprijed definirane funkcije bodovanja, kao što je energija vezanja. Zatim se na konformaciju primjenjuje mala modifikacija, a nova struktura se ponovno ocjenjuje. Ako nova konformacija ima bolji rezultat, prihvata se, a u suprotnom, njegovo prihvatanje određuje se korištenjem Metropolis kriterija, temeljenog na Boltzmannovoj funkciji vjerovatnosti. Ako nova konformacija zadovoljava kriterije prihvatljivosti, pohranjuje se kao novi

minimum. Ovaj se postupak ponavlja sve dok se ne uzorkuje unaprijed definisani broj konformacija liganda. Jedna od glavnih prednosti Monte Carlo metode pretraživanja je njezina sposobnost izbjegavanja zarobljavanja u lokalnim minimumima, jer se konformacije generiraju nasumično, neovisno o prethodnim stanjima. Međutim, budući da se prethodna stanja ne bilježe, ista se konformacija može ponovno pregledati više puta. Alat za docking kao što je AutoDock Vina implementira algoritme pretraživanja temeljene na Monte Carlu.

7.7 Rješavanje fleksibilnosti proteina u metodama dockinga

Jedno od primarnih ograničenja metoda dockinga je njihova nesposobnost da u potpunosti uzmu u obzir fleksibilnost proteina. Iako su razvijeni različiti pristupi za uključivanje različitih stepena konformacijske fleksibilnosti, samo je nekoliko njih bilo uspješno. Ove metode ili koriste jednu konformaciju proteina s fleksibilnim bočnim lancima ili koriste složene algoritme koji uključuju više konformacija proteina.

Pristupi **pojedinačne konformacije proteina** se oslanjaju na jednu strukturu proteina dok integriraju fleksibilnost na različitim nivoima. Meko spajanje je najjednostavniji pristup za uvođenje implicitne fleksibilnosti, posebno u bočnim lancima proteina. To se postiže smanjenjem van der Waalsovog (vdW) odbojnog člana u bodovnim funkcijama temeljenim na polju sile, dopuštajući bliže pakiranje liganda. Iako ovo oponaša inducirani učinak dockinga, računa samo na minimalnu fleksibilnost.

Pristup **fleksibilnosti bočnog lanca** pruža malo viši nivo fleksibilnosti dopuštajući kretanje u bočnim lancima ostataka aktivnog mjesta. Uvode se alternativne konformacije, često korištenjem biblioteka rotamera. Neki alati za docking implementiraju lokalne protokole pretraživanja za uzorkovanje ograničenih stepena slobode. Međutim, ova metoda ne uzima u obzir konformacijske promjene velikih razmjera u okosnici proteina, što ostaje značajno ograničenje.

Pristupi **višestrukih konformacija proteina**, kao napredniji protokoli dockinga, uključuju više konformacija proteina za modeliranje strukturne fleksibilnosti. Te se konformacije mogu dobiti pomoću eksperimentalnih

tehnika (kao što je rendgenska kristalografija ili NMR) ili računarskih metoda poput simulacija molekularne dinamike ili Monte Carlo simulacija. Za uključivanje strukturnih varijacija i povećanje tačnosti dockinga koriste se različite strategije.

Nekoliko je strategija razvijeno kako bi se objasnila fleksibilnost proteina u dockingu korištenjem višestrukih konformacija proteina. Ove se metode razlikuju po tome kako obrađuju i integiraju strukturne varijacije. Pristup prosječne mreže predstavlja zbirku proteinskih konformacija dobivenih različitim tehnikama uzorkovanja koja se sažima u jednu rešetku izračunavanjem prosjeka za skup. Dobivanje modela srednje vrijednosti se može izvesti jednolično ili s ponderiranom pristranošću prema specifičnim konformacijama. Metoda ujedinjenog opisa analizom skupa proteinskih konformacija identificira strukturno očuvane (rigidne) i varijabilne (fleksibilne) regije. Rigidne regije su spojene u pojednostavljenu atomsku reprezentaciju, dok su fleksibilne regije kombinovane na kombinatorni način kako bi se stvorio skup hibridnih ili "himernih" proteinskih struktura. Individualno spajanje konformacije je najdetaljnija fleksibilna strategija dockinga, gdje se ligandi spajaju zasebno u svaku konformaciju proteina koja je navedena kao ulaz. Pouzdanost rezultata uveliko ovisi o kvaliteti odabranih konformacija. U nekim slučajevima uključivanje fleksibilnosti proteina ne poboljšava značajno tačnost dockinga. Konformacije dobivene molekularnom dinamikom često ne poboljšavaju performanse dockinga tako efikasno kao višestruke eksperimentalno određene kristalne strukture. Određeni proteini, kao što su npr. renin i EGFR, prolaze kroz konformacijske promjene izazvane ligandom koje se moraju pažljivo razmotriti pri odabiru skupa struktura. Korištenje konformacija izvedenih iz struktura vezanih za ligand umjesto apo struktura može bolje obuhvatiti ove velike strukturne promjene, potencijalno dovodeći do tačnijih predviđanja dockinga.

7.8 Procjena docking poza i funkcija bodovanja

Procjena docking poza kritičan je korak u procesu dockinga. Prije finaliziranja orijentacije liganda, algoritmi za docking moraju procijeniti njegov položaj unutar veznog mjesta. Ova procjena ne samo da mora dati tačnu procjenu energije interakcije ligand-protein, već također mora biti računarski efikasna,

budući da je broj mogućih konfiguracija ligand-protein gotovo neograničen. Također, idealna funkcija bodovanja trebala bi biti nepristrana prema specifičnim metama, raditi dosljedno u različitim sistemima i održavati sličnu tačnost u različitim rasponima afiniteta vezanja. Poželjna je i interpretabilnost, što omogućuje korisnicima da razumiju kako promjene u pozi liganda utiču na bodovanje. Funkcije bodovanja mogu se kategorizirati u četiri glavne vrste:

1. Funkcije bodovanja temeljene na fizici: Ove metode procjenjuju interakcije ligand-protein uzimajući u obzir van der Waalsove i elektrostatske sile između svih atoma u sistemu. Neki modeli također uključuju doprinose vodikovih veza. U početku su se te funkcije oslanjale isključivo na izračune polja sile izvedene u gasovitoj fazi (ranija klasifikacija kao funkcije bodovanja polja sile). Tokom vremena, dodatne komponente koje nisu povezane s poljem sile, kao što su modeli solvatacije, uključene su kako bi se poboljšala tačnost.
2. Empirijske funkcije bodovanja: Ove funkcije procjenjuju afinitet vezivanja zbrajanjem različitih energetskih doprinosa, uključujući hidrofobne i hidrofilne interakcije, vodikove veze, jonske interakcije, steričke sukobe i entropijske efekte. Konačni rezultat se izvodi korištenjem statističkih tehnika kao što su multivarijantna linearna regresija ili metoda djelomičnih najmanjih kvadrata, koji dodjeljuju težine pojedinačnim energetskim komponentama na temelju skupa podataka za obuku kompleksa ligand-protein s poznatim afinitetima. Tačnost empirijskih funkcija bodovanja ovisi o kvaliteti i dosljednosti podataka o obuci.
3. Funkcije bodovanja temeljene na znanju: Također se nazivaju "potencijali temeljeni na znanju", ove funkcije bodovanja izvode interakcijske potencijale parova iz poznatih kompleksa protein-ligand. Strukturni podaci iz izvora kao što su Cambridge Structural Database ili Protein Data Bank koriste se za generiranje statističkih potencijala temeljenih na inverznom Boltzmannovom principu. Temeljna pretpostavka iza ovog pristupa je da učestalost opaženih međumolekularnih kontakata odgovara njihovoj energetskoj povoljnosti; što se određena interakcija češće događa, to je ona energetski povoljnija.

4. Bodovanje temeljeno na mašinskom učenju (eng. *Machine Learning*, ML): Također poznato kao bodovanje temeljeno na deskriptorima, tehnike ML-a sve se više koriste za pročišćavanje predviđanja dockinga. Iako se obično ne integrira izravno u programe za docking, bodovanje temeljeno na ML-u često se primjenjuje u fazi naknadne obrade za ponovno ocjenjivanje prethodno generiranih poza. Ove se metode oslanjaju na molekularne deskriptore ili interakcijske otiske prstiju za analizu interakcija ligand-protein pomoću naprednih algoritama učenja.

7.9 Energija vezivanja

Interakcije između biomolekula temelj su svih bioloških procesa. Za slobodne molekule, slobodna energija mjeri stabilnost u toplotnoj ravnoteži i označava količinu energije koja se oslobađa tokom formiranja kompleksa. Slobodna energija vezanja je promjena u slobodnoj energiji kada se dvije molekule (A i B) spajaju i prave kompleks i može se izračunati kao razlika između hemijskih potencijala kompleksa i potencijala pojedinačnih molekula A i B. Tokom takvog formiranja kompleksa, konformacijska entropija se kompenzira prema mogućnosti kompleksiranja.

Slobodna energija vezanja kompleksa može se izračunati različitim računarskim metodama korištenjem konformacijskog uzorkovanja. Ove metode slijede dva različita pristupa: **metode puta** kao što su termodinamička integracija i perturbacija slobodne energije i **metode krajnje tačke** kao što je molekularna mehanika Poisson-Boltzmanove površine (eng. *Molecular Mechanics Poisson-Boltzman Surface Area*, MM-PBSA) i molekularne mehanike generalizirane Bornove površine (eng. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area*, MM-GBSA).

Metode puta izračunavaju sve beskonačne promjene u višestepenom putu koji povezuje početno (nevezano) i konačno (vezano ili složeno) stanje, dok metode krajnje tačke generiraju i vezane i nevezane konformacije molekula i izračunavaju slobodnu energiju vezanja kao njihovu razliku. Metode puta i krajnje tačke mogu se izvesti korištenjem MD simulacija u eksplicitnoj solvataciji. Za razliku od eksplicitne solvatacije, primjena implicitnih pristupa

mogla bi smanjiti složenost analize slobodne energije kada se koristi s metodama krajnjih tačaka.

Molekularna mehanika (MM) često je jedini praktični pristup za modeliranje velikih, nesimetričnih hemijskih sistema kao što su proteini i polimeri. Kao empirijska metoda, MM ne uzima u obzir izričito elektrone, umjesto toga oslanja se na klasičnu fiziku za predviđanje molekularnih svojstava. Zbog ovog ograničenja, MM nije prikladan za proučavanje stvaranja ili kidanja veze, gdje dominiraju elektronički učinci. Osim toga, MM modeli uveliko ovise o sistemu, a predviđanja energije obično su korisna samo za komparativne studije, budući da na apsolutne vrijednosti utiču broj i vrsta atoma i njihova povezanost. Polje sile u MM služi kao empirijska aproksimacija odnosa strukture i energije unutar molekula, uravnotežujući brzinu i tačnost. MM modeli su visoko parametrizirani, što im omogućuje generiranje realističnih geometrija za većinu organskih molekula. Međutim, za nestandardne strukture mogu biti potrebni novi parametri, koji se obično dodjeljuju po analogiji i korištenjem dosljednih postupaka dodjele naboja unutar datog polja sile.

Tehnike računarskog modeliranja imaju za cilj povezati biološku aktivnost s molekularnom strukturom, što je ključni korak u otkrivanju lijekova. Temeljni aspekt ovog procesa je izračunavanje potencijalne energije molekule na temelju položaja atoma. Nakon što je funkcija potencijalne energije dostupna, koriste se tehnike optimizacije za pronalaženje molekularne konformacije s najnižom energijom. Za biološke makromolekule, površina potencijalne energije vrlo je složena, sadrži brojne lokalne minimume kao i globalni minimum. Standardni algoritmi za minimiziranje energije nastoje locirati samo najbliži lokalni minimum, a ne pravu konformaciju s najnižom energijom. Izazov je otežan eksponencijalnim povećanjem mogućih konformacija kako se povećava veličina molekule, što sistemsko pretraživanje čini nepraktičnim za velike molekule.

MMGBSA metoda se uspješno primjenjuje za procjenu slobodne energije vezanja u slučajevima stvaranja biomolekularnih kompleksa. Metode proračuna energije vezanja idu ruku pod ruku s metodama računarskog dizajna lijekova za uspostavljanje energetski povoljnih kompleksa za uspješan

razvoj terapeutika. Koristeći MMGBSA ili MMPBSA metodu, energija vezanja se može izračunati kao razlika u energiji vezanog i nevezanog stanja kao što je prikazano u sljedećim jednačinama:

$$\Delta G_{vezano} = \Delta G_{kompleks} - (\Delta G_{receptor} + \Delta G_{ligand}) \quad (1)$$

$$gdje\ je\ \Delta G = \Delta G_{gas} + \Delta G_{sol}$$

$$\Delta G_{gas} = \Delta E_{veza} + \Delta E_{uglav} + \Delta E_{diedar} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW} \quad (2)$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta E_{pol} + \Delta E_{nonpol} \quad (3)$$

$$\Delta E_{nonpol} = \gamma SASA + \beta \quad (4)$$

Izrazi $\Delta G_{kompleks}$, $\Delta G_{receptor}$ i ΔG_{ligand} predstavljaju prosječne slobodne energije kompleksa, receptora i liganda. Molekularna mehanička energija u plinovitoj fazi (ΔG_{gas}) izračunava se kao zbir unutarnje (vezne, uglovne, diedarske), elektrostatske i vdW energije. Energija solvatacije, ΔG_{sol} , uključuje polarne (ΔE_{pol}) i nepolarne (ΔE_{nonpol}) doprinose. Polarna komponenta slobodne energije vezanja može se izračunati korištenjem modela Poisson-Boltzmann (MMPBSA) ili generalizirane Bornove aproksimacije (MMGBSA) i definiranjem odgovarajućih vanjskih i unutarnjih dielektričnih konstanti za oponašanje potrebnog otapala, općenito vodenog medija. Nepolarna komponenta slobodne energije vezanja zahtijeva aproksimaciju SASA naših molekula od interesa korištenjem algoritama kao što je aproksimacija linearne kombinacije parnih preklapanja. Kombinacijom unutarnje energije i energije solvatacije i dobivanjem razlike između vezanog i nevezanog stanja može se izračunati energija vezanja kompleksa.

Zbog velike veličine molekula koje se koriste u računarskim studijama, moguće je podijeliti entropiju molekule na rotacijske, translacijske i vibracijske dijelove. Rotacija i translacijska entropija mogu se eliminirati obradom putanje nakon simulacija korištenjem algoritama poput krutog

rotora/harmonijskog oscilatora i stoga se pretpostavlja da samo vibracijska entropija većinom doprinosi računski izvedenoj energiji vezanja.

Tokom formiranja kompleksa uspostavlja se niz entalpijskih i entropijskih interakcija između proteina i liganda, koje su međusobno usklađene. Pojavljuje se varijacija entalpije (zbog stvaranja intra- i intermolekulskih nekovalentnih veza) i entropije (zbog desolvatacije) u sistemu, s posljedičnom varijacijom slobodne energije.

Afinitet vezanja između molekula, liganda (L) i proteina (P), karakterizira konstanta disocijacije (K_d):

$$K_d = [L][P]/[LP] \quad (5)$$

koji odgovara procesu $LP \leftrightarrow L + P$.

Temeljna jednačina koja upravlja svime je

$$\Delta G = \Delta H + T\Delta S \quad (6)$$

gdje je ΔG promjena slobodne energije reakcije, ΔH i ΔS su odgovarajuće promjene entalpije i entropije, a T je temperatura sistema.

Afinitet vezanja može se izraziti u smislu konstante ravnoteže (K) za stvaranje kompleksa između dvije molekule:

$$\Delta G^0 = RT \ln K_d \quad (7)$$

gdje je R univerzalna gasna konstanta, a T apsolutna temperatura.

Molekularna dinamika (MD) pruža alternativnu konformacijsku strategiju pretraživanja simulacijom kretanja atoma tokom vremena na temelju Newtonove mehanike. Dodjeljujući početne brzine atomima i razvijajući sistem tokom vremena, MD omogućuje makromolekuli da prevlada energetske barijere, za razliku od standardnih metoda minimizacije.

Posebno koristan hibridni pristup je simulirano žarenje, koje kombinira MD i minimizaciju energije. Prvo se temperatura sistema podiže kako bi se postiglo opsežno konformacijsko uzorkovanje. Temperatura se zatim postupno smanjuje, dopuštajući sistemu da se uspostavi u niskoenergetskoj konformaciji. Posljednji korak minimizacije provodi se kako bi se identificirala optimalna struktura. Da bi se odabralo polje sile i odgovarajuća metodologija

modeliranja za dati zadatak, važno je procijeniti raspon molekularnih sistema na koje je primjenjivo i vrste simulacija koje se mogu izvesti. Neka od najčešće korištenih polja sile su:

- AMBER (potpomognuta izgradnja modela s pročišćavanjem energije) izvorno je parametriran posebno za proteine i nukleinske kiseline, koristeći pet veznih i nevezujućih oznaka zajedno sa sofisticiranim elektrostatskim tretmanom i bez uključenih unakrsnih oznaka. Rezultati dobiveni ovom metodom mogu biti vrlo dobri za proteine i nukleinske kiseline, ali manje za druge sisteme, iako su objavljeni i parametri koji omogućuju simulaciju drugih sistema.
- CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) izvorno je osmišljen za proteine i nukleinske kiseline, a sada se koristi za niz makromolekula, molekularne dinamike, otapanje, pakiranje kristala, vibracijsku analizu i QM/MM (kvantna mehanika/molekularna mehanika) studije. Koristi pet valentnih oznaka, od kojih je jedna elektrostatska i osnova je za druga polja sile.
- GROMOS (Groningen Molecular Simulation) prilično je popularan za predviđanje dinamičkog kretanja molekula i tekućina, a također se koristi za modeliranje biomolekula. Koristi pet valentnih oznaka, od kojih je jedna elektrostatska.
- MM1-4 (Molecular Mechanics) su polja sile opće namjene za monofunkcionalne organske molekule. Prva verzija ove metode bila je MM1. MM2 je parametrizirana za mnogo funkcionalnih grupa dok je MM3 vjerovatno jedan od najtačnijih načina modeliranja ugljikovodika. MM4 je najnovija verzija s nekoliko poboljšanja.
- MMFF (Merck Molecular Force Field) također je polje sile opće namjene uglavnom za organske molekule. MMFF94 izvorno je dizajniran za simulacije molekularne dinamike, ali je također naširoko korišten za geometrijsku optimizaciju. Koristi pet valentnih oznaka, od kojih je jedna elektrostatska, a druga unakrsna. MMFF je parametriran na temelju ab initio izračuna visokog nivoa. MMFF94 sadrži parametre za veliki izbor funkcionalnih grupa koje se pojavljuju u organskoj i farmaceutskoj hemiji.

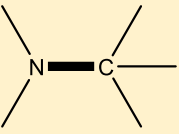
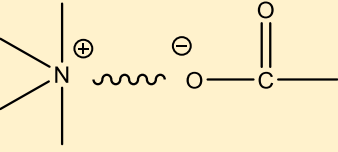
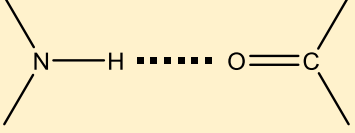
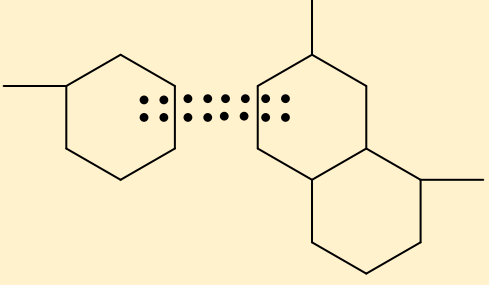
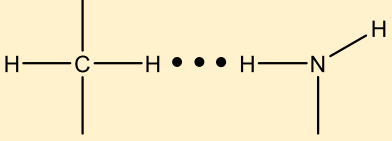
7.10 Ključne interakcije u vezivanju ligand-protein

Kao što je ranije već pomenuto, proteini imaju različite funkcije u biološkim sistemima, na primjer, djeluju kao mobilni glasnici, regulišu biohemijske putove (aktivacija/inhibicija drugih proteina), djeluju kao enzimi (katalizirajući reakcije), pokreću konformacijske promjene kao molekularni motori, detektuju signale vezanjem malih molekula, stvaraju selektivne kanale kroz ćelijske membrane. Proteini ostvaruju ove zadatke vezanjem nukleinskih kiselina, drugih proteina, malih molekula ili terapijskih antitijela na vrlo specifičan način. Ove interakcije utiču na kinetiku biohemijske reakcije i ćelijske prelaze s jednog u drugi sistem. Razumijevanje vezanja protein-ligand od vitalnog je značaja za procjenu potencije i efikasnosti lijeka. Ravnoteža između vezanog i nevezanog stanja kompleksa ligand-protein proizilazi iz kombinacije interakcija, uključujući Londonove disperzijske sile, van der Waalsove interakcije, vodikove veze, dipol-dipol interakcije i jonske veze (**Tabela 7.2**). Osim ovih nekovalentnih sila, proteini također mogu biti podvrgnuti kovalentnim modifikacijama kada određene hemijske grupe reaguju s odgovarajućim aminokiselinama kako bi formirale kovalentne veze.

Nekovalentne interakcije igraju ključnu ulogu u otkrivanju lijekova zasnovanih na strukturi i naširoko se proučavaju u različitim disciplinama, uključujući nauku o materijalima, hemiju, fiziku, farmakologiju i biologiju. U tipičnom modelu molekularne interakcije, razmatraju se sljedeće energetske komponente: energija desolvatacije, hidrofobne interakcije, elektrostatske interakcije, vodikova veza (donorske i akceptorske interakcije), van der Waalsove sile, energije kontakta (koje utiču na desolvataciju i savijanje proteina), kovalentna veza.

Razvijeno je nekoliko eksperimentalnih i računarskih pristupa za proučavanje interakcija protein-ligand, uključujući spektroskopiju, skupne biohemijske tehnike, studije pojedinačnih molekula i strukturnu analizu. Računarski alati za screening liganda sve su vrijedniji u farmaceutskoj industriji i akademskim istraživanjima. Simulacije molekularnog dockinga i molekularne dinamike pomažu u predviđanju makromolekularnih interakcija unutar mreža protein-protein interakcije (PPI).

Tabela 7.2 Jačina veza/interakcija između receptora i liganda.

Jačina veze/interakcije	Vrsta veze/interakcije
	 Kovalentna 
	 Jonska 
	 Vodikova 
	 Hidrofobne 
	 Van der Waals 

Budući da male molekule pokazuju veću fleksibilnost u vezivanju od kompleksa protein-protein, računarski resursi za docking malih molekula znatno su niži. Kao rezultat toga, docking malih molekula postao je glavni istraživački fokus u otkrivanju lijekova potpomognutom računarima. Docking se može dodatno poboljšati integracijom komplementarnih metoda kao što su homološko modeliranje i analiza PPI mreže, pružajući sveobuhvatniji strukturni skup podataka.

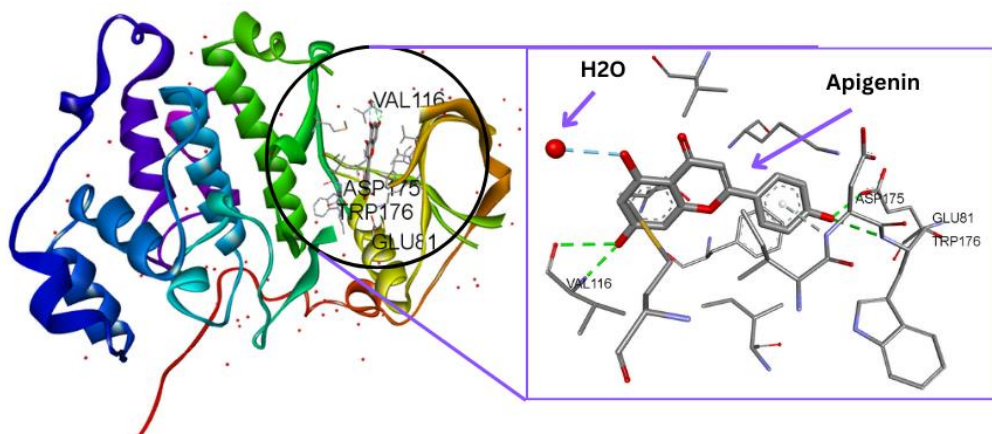
Elektrostatska energija igra ključnu ulogu u dizajnu lijekova, virtuelnom screeningu i protein-protein dockingu. Kada se lijek veže na ciljni protein, često dolazi do promjena u njegovom stanju protonacije. Razumijevanje

energije vezivanja malih organskih molekula omogućuje analiziranje njihove potencijalne interakcije na mjestu vezivanja proteina. Docking programi se oslanjaju na funkcije bodovanja koje zbrajaju različite vrste interakcija proteina i liganda za procjenu afiniteta vezanja. Mnoge funkcije bodovanja uključuju elektrostatske interakcije kao temeljnu komponentu docking studija protein-ligand. Budući da funkcije bodovanja koriste aproksimacije za modeliranje intermolekulskih i intramolekulskih interakcija, niti jedna funkcija nije savršena. Stoga se moraju pažljivo potvrditi ili kombinovati različite funkcije bodovanja kako bi se povećala pouzdanost rezultata dockinga.

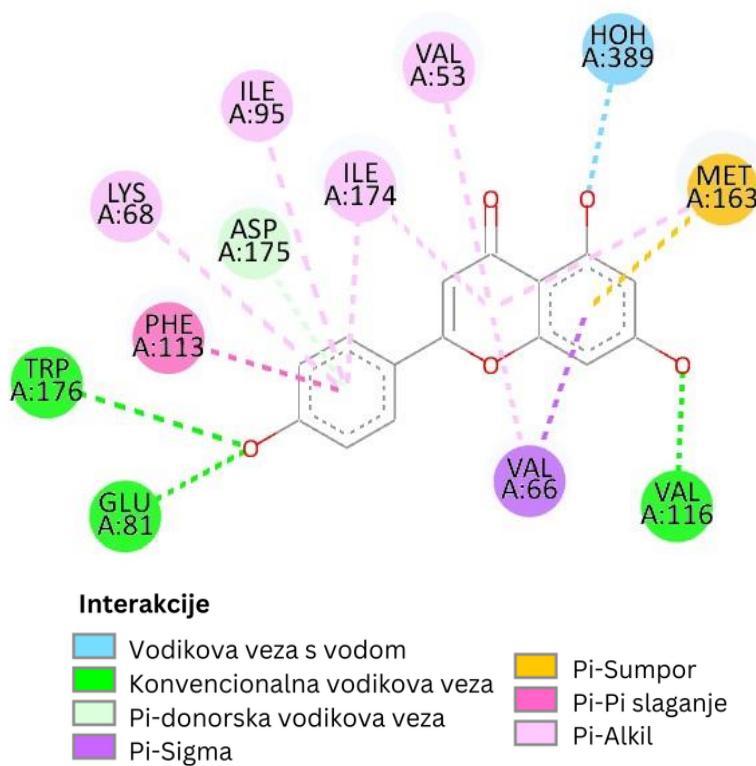
Van der Waalsove interakcije igraju značajnu ulogu u formiranju kompleksa protein-ligand. Te se sile mogu izračunati pomoću fizičkih modela, kao što je Lennard-Jonesov potencijal, koji tačno predviđa van der Waalsove interakcije kroz složene izračune. To ga čini korisnim alatom za simulacije molekularnog dockinga i virtuelni screening velikih baza podataka liganda. Predviđanje molekularnog vezanja u interakcijama protein-ligand i protein-protein ostaje veliki izazov u strukturnoj biologiji. Neke ključne poteškoće uključuju tačnu procjenu slobodnih energija vezanja spojenih stanja, uzimanje u obzir više orijentacija dockinga u visokoj rezoluciji, i uzimanje u obzir strukturnih preuređivanja i pomicanja spojnih površina tokom interakcije. Jedan od ponuđenih prijedloga kao odgovor na ove izazove je algoritam TreeDock koji minimizira van der Waalsovu energiju u dockingu proteina. Ovaj algoritam poboljšava pretraživanja dockinga krutog tijela procjenom višestrukih orijentacija dockinga pomoću višedimenzionalnih binarnih stabala pretraživanja.

Tradicionalni mehanizam djelovanja **nekovalentnih inhibitora** oslanja se na male molekule koje se nekovalentno vežu na svoje ciljne proteine, povećavajući selektivnost i snagu. Ovaj se proces optimizira pročišćavanjem oblika i nekovalentnih interakcija (npr. van der Waalsovih sila, vodikovih veza i mostova soli) između inhibitora i ostataka mjesta vezivanja. Neke empirijske funkcije bodovanja koriste aproksimacije temeljene na Lennard-Jonesovom potencijalu za procjenu tih interakcija u određenim biološkim sistemima. Dok se metode dockinga razlikuju između kovalentnih i nekovalentnih interakcija, većina glavnih tehnika usredotočena je na predviđanje načina vezanja nekovalentnih inhibitora.

Vodikova veza je kritični faktor u određivanju afiniteta vezanja mete za lijek. Procjena potencijala vodikove veze ključna je u dizajnu lijekova, budući da se te interakcije često događaju u vezivanju protein-ligand i pridonose molekularnoj stabilnosti. Vodikove veze stabiliziraju proteine utičući na njihove sekundarne strukture. Oni također igraju ključne uloge u savijanju proteina, interakcijama protein-ligand i katalizi. Interakcije vodikovih veza proizilaze iz dipol-dipol sila između donorskih (D) i akceptorskih (A) atoma. Ove interakcije poboljšavaju molekularnu stabilnost i ćelijsku funkciju, čineći njihovu preciznu karakterizaciju ključnom u biomolekularnim istraživanjima. Razumijevanje njihovog uticaja na biomolekularne interakcije je važno budući da se vodikove veze takmiče i s okolnim molekulama vode. Položaj atoma vodika unutar funkcionalnih grupa utiče na stvaranje vodikove veze. Tačni podaci o položajima atoma vodika u proteinima ključni su za identificiranje mreža vodikovih veza i razumijevanje njihove uloge u molekularnim interakcijama. Međutim, atomi vodika pokazuju značajnu pokretljivost, što dovodi do varijacija u protonacijskim, torzijskim i tautomernim stanjima. Također, preokreti bočnog lanca u ostacima histidina, glutamina i asparagina, uočeni u kristalografskim bazama podataka, dodatno kompliciraju izračune temeljene na strukturi. Vezanje liganda na protein složen je proces na koji utiču solvatacija i desolvatacija, pri čemu obje komponente u interakciji prolaze kroz djelomičnu desolvataciju. Ovaj termodinamički vođen slijed događaja olakšava optimalne interakcije između liganda i proteina, pri čemu **hidrofobni kontakti** igraju središnju ulogu. Hidrofobni dijelovi imaju tendenciju skupljanja zajedno, smanjujući njihovu izloženost vodenoj okolini. Zapravo su hidrofobne interakcije glavna pokretačka snaga u vezivanju protein-ligand i formiranju kompleksa. Poboljšanje hidrofobnih interakcija ključni je fokus u optimizaciji vodećeg spoja, budući da često uključuje povećanje molekularne težine liganda, rotirajućih veza i lipofilnosti – faktora koji mogu negativno uticati na ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost) osobina kandidata za lijek. Dizajniranje ligandada s visokim afinitetom vezanja uz zadržavanje povoljnih karakteristika ADMET-a je izazov koji često zahtijeva znatna ulaganja. **Slike 7.7 i 7.8** prikazuju vezne modele i interakcije važne za formiranje kompleksa apigenina sa humanom kazein kinazom 2.

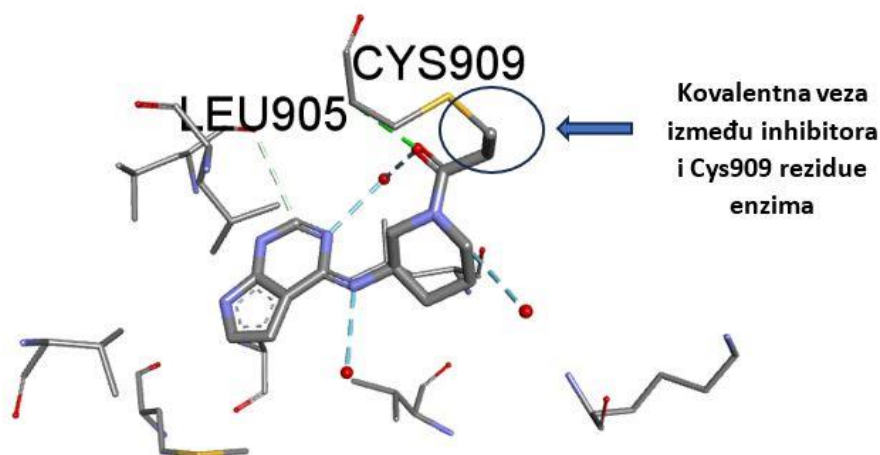


Slika 7.7 3D prikaz kompleksa apigenina sa humanom kazein kinazom 2 (PDB ID: 3AMY).



Slika 7.8 2D prikaz interakcija u kompleksu apigenina sa humanom kazein kinazom 2 (PDB ID: 3AMY).

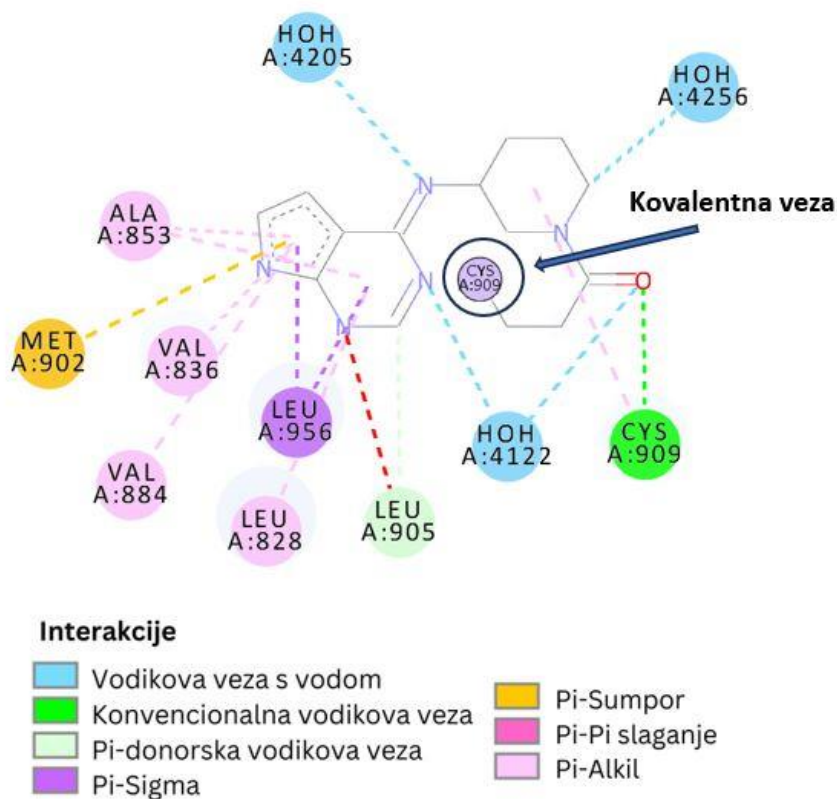
Druga vrsta interakcije u kompleksima protein-ligand je **kovalentna veza**, koja služi kao temelj za dizajniranje raznih lijekova u modernom otkrivanju lijekova. Kovalentni inhibitori nude jasne prednosti u odnosu na nekovalentne inhibitore, što dovodi do razvoja visoko selektivnih lijekova. Kovalentne veze obično se stvaraju između reaktivne funkcionalne grupe na ligandu, kao što je epoksi, hidroksilna ili karbonilna grupa, i nukleofilnog ostatka na proteinu, kao što je cistein, treonin, serin ili, rjeđe, lizin. Ova interakcija rezultira stvaranjem kovalentnih adukta. Za razliku od nekovalentnih interakcija, kovalentna veza je često ireverzibilna unutar poluživota proteina, što dovodi do stabilnog kompleksa lijek-protein koji ne slijedi klasičnu dinamiku ravnoteže. Razvoj selektivnih ireverzibilnih kovalentnih inhibitora bio je ključno područje istraživanja zbog njihovog značajnog utjecaja na ljudsko zdravlje i liječenje bolesti. **Slike 7.9 i 7.10** prikazuju vezne modele i interakcije važne za formiranje kompleksa kovalentnog inhibitora sa janus kinazom 3.



Slika 7.9 3D prikaz kompleksa kovalentnog inhibitora sa janus kinazom 3 (PDB ID: 5TTS).

Kovalentni lijekovi već su pokazali svoju terapijsku efikasnost, s gotovo 30% lijekova koji ciljaju enzime na tržištu klasificiranih kao kovalentni inhibitori. Unatoč njihovim prednostima, modeliranje kovalentnih interakcija i ireverzibilne inhibicije ostaje izazov u računarskom otkrivanju lijekova. Razvijeno je nekoliko in silico metoda za simulaciju tih interakcija, ali usavršavanje je u toku. Računarski programi za molekularni docking kao što

su GOLD i AutoDock uključuju kovalentni docking putem tehnika kao što su pristup "atoma veze", metode temeljene na mreži i modifikacije fleksibilnih bočnih lanaca.



Slika 7.10 2D prikaz interakcija u kompleksu kovalentnog inhibitora sa janus kinazom 3 (PDB ID: 5TTS).

Slično interakcijama protein-ligand, **nukleinske kiseline** također stupaju u interakciju s malim organskim molekulama. Razumijevanje ovih interakcija je od značaja za dizajniranje i optimizaciju liganada za regulaciju gena. Vezivanje između malih molekula i nukleinskih kiselina može biti kovalentno ili nekovalentno. Interakcije ligand-nukleinska kiselina mogu se okarakterisati kao: nespecifične elektrostatičke interakcije, žlijebno vezivanje i interkalacija ili π -slaganja.

Osim spajanja ligand-nukleinska kiselina, **interakcije protein-nukleinska kiselina** predstavljaju značajan aspekt biomolekularnih interakcija. Ove

interakcije, posebno između proteina i DNK, prate ili direktne ili indirektne mehanizme prepoznavanja/čitavanja. U direktnom prepoznavanju, DNK-vezujući proteini stupaju u interakciju s bazama nukleinskih kiselina putem komplementarne vodikove veze, igrajući ključnu ulogu u biološkim događajima. U indirektnom prepoznavanju, proteini prepoznaju DNK na osnovu njenih strukturnih svojstava, a ne na osnovu direktnih interakcija specifičnih za bazu, što je mehanizam koji se često uočava kada se javlja manje direktnih interakcija.

Interakcije protein-protein (PPI) su također obećavajuće terapijske mete. Proteini, kao dinamičke biomolekule, stupaju u interakciju s drugim proteinima, peptidima, nukleinskim kiselinama i lipidima kako bi izvršili različite ćelijske funkcije. PPI su fundamentalni za ćelijske funkcije, pokrećući većinu bioloških procesa, uključujući komunikaciju između ćelija, koja formira zamršene mreže poznate kao interaktom. Moduliranje ovih interakcija predstavlja priliku za regulaciju bioloških procesa u bolesnim stanjima, čineći njihovu karakterizaciju ključnom za terapijski napredak. Ciljanje PPI ostaje izazov zbog raznolikosti partnera u interakciji proteina. Računarski pristupi su jedna od metoda koje se mogu koristiti za određivanje načina interakcije PPI putem molekularnog dockinga, koje može slijediti metodu zasnovanu na ili bez predloška. Docking zasnovan na predlošku je brz i pouzdan jer se oslanja na poznatu strukturu dimera za vođenje modeliranja kompleksa protein-protein, eliminirajući potrebu za funkcijama bodovanja. Suprotno tome, docking bez predloška uključuje algoritme za docking i bodovanje slične onima koji se koriste u docking protokolima za male molekule.

7.11 Primjena dockinga u optimizaciji molekula potencijalnih lijekova

Optimizacija vodećeg spoja uključuje hemijske modifikacije poznatog i dobro karakteriziranog organskog spoja koji se naziva **vodeća ili matična molekula**, kako bi se poboljšala njegova potencija i svojstva slična lijeku. Ova poboljšanja mogu postići:

- Povećanje specifičnosti za ciljno mjesto,
- Jačanje potencije,

- Poboljšanje apsorpcije i bioraspoloživosti,
- Smanjenje toksičnosti,
- Modificiranje fizičko-hemijskih svojstava kako bi se poboljšala topljivost, metabolizam i propusnost.

Ovaj proces u više koraka ključni je aspekt farmaceutske hemije, s ciljem maksimiziranja afiniteta ciljnog vezanja uz osiguranje in vitro i in vivo efikasnosti. Optimizacija potencijalnih lijekova slijedi iterativni pristup, koristeći različite strategije kao što su:

- Analogni dizajn
- Modifikacije R-grupa (npr. alkil/aril supstitucije)
- Varijacije prstena i lanca (širenje, skupljanje, spajanje)
- Strukturne promjene (pojednostavljenje, rigidnost)
- Konformacijske prilagodbe
- Bioizosterične zamjene
- Zamjena osnovne građe
- Docking tehnike, uključujući metode relativne slobodne energije vezivanja (eng. *Relative Binding Free Energy*, RBFE).

Iako ove modifikacije često povećavaju afinitet vodećeg spoja prema njegovoj meti, one također mogu povećati molekularnu težinu (MW), lipofilnost i strukturnu složenost, što potencijalno dovodi do slabe apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti (ADMET). Studije najprodavanijih lijekova pokazuju da jednostavnije molekule često pokazuju bolja farmakokinetička svojstva. Stoga, kako bi se učinkovito optimizirala i farmakološka i farmakokinetička svojstva, ti se faktori uzimaju u obzir istovremeno u procesu optimizacije vodećih spojeva.

Koncept da mali molekularni fragmenti mogu formirati visokokvalitetne interakcije - koje se zatim mogu optimizirati u ligande visokog afiniteta prvi je predložio Jencks 1981. godine. Ovaj pristup, koji se danas naširoko koristi, uključuje stvaranje moćnih spojeva od fragmenata niske molekularne težine koji se pridržavaju "pravila trice" (**Tabela 7.3**). Iako se pogoci temeljeni na fragmentima obično slabo vežu, oni često uspostavljaju specifične, visokokvalitetne interakcije sa svojom metom, za razliku od HTS pogodaka, koji se mogu vezati kroz višestruke slabe, suboptimalne interakcije.

Tabela 7.3 Parametri „pravila trice“ za molekule slične fragmentima i „pravila petice“ za molekule slične lijekovima.

Parametar Pravilo	Slično fragmentu Pravilo trice	Slično lijeku Pravilo petice
Granica		
Molekulska težina	<300	≤500
Lipofilnost (clogP)	≤3	≤5
Donori vodikovih veza	≤3	<5
Akceptori vodikovih veza	≤3	≤10
Efikasnost liganda (LE)		
LE	0,38	0,29
Kvalitet uklapanja	0,55	0,81

Za razvoj virtuelne biblioteke, optimizacija potencijalnog lijeka temeljena na fragmentima slijedi ove korake:

- Usklađenost s pravilom trice,
- Odabir funkcionalnih grupa koje poboljšavaju vezanje,
- Izbjegavanje reaktivnih, nestabilnih ili toksičnih gradivnih jedinica.

Za optimizaciju vodećih spojeva temeljenu na strukturi, fragmenti sa slabijim interakcijama u veznom džepu mogu se zamijeniti fragmentima koji bolje odgovaraju uz očuvanje strukture jezgre liganda. Dodatne strategije uključuju:

- Povezivanje ili spajanje pogodaka fragmenata koji se ne preklapaju,
- Korištenje razdvojnih dijelova molekule za održavanje izvorne orijentacije uveza.

Kako bi se poboljšala učinkovitost lijeka, uzima se u obzir nekoliko mjera i pravila, uključujući:

- Pravilo petice (Ro5),
- Izvan pravila petice (bRo5),
- Termodinamičko i kinetičko profiliranje,
- Mjere efikasnosti liganda, prvi put uvedene 1999. godine, koje kvantificiraju molekularna svojstva koja utiču na afinitet vezanja.

Optimizacija potencijalnog lijeka putem dockinga slijedi četiri glavne strategije:

1. Poboljšanje van der Waalsovih interakcija za poboljšano geometrijsko uklapanje u vezni džep,
2. Uključivanje jakih vodikovih veza,
3. Povećanje hidrofobnih interakcija,
4. Ograničavanje molekularne fleksibilnosti radi smanjenja konformacijske entropije.

Učinci solvatacije i desolvatacije također se pažljivo razmatraju, budući da značajno utiču na predviđanja vezanja ligand-protein. Izračuni relativne slobodne energije vezanja (RBFE) pomažu u procjeni promjena u slobodnoj energiji vezanja kako se struktura liganda mijenja.

Razvoj računarskih metoda - uključujući računarstvo visokih performansi, GPU-ove i napredne algoritme uzorkovanja značajno je poboljšao tačnost RBFE procjena. Afiniteti vezanja obično se izražavaju kao rezultati spajanja, koji spadaju u tri kategorije: na temelju polja sile, na temelju znanja i na empirijskim temeljima.

Nekoliko se metoda koristi za procjenu afiniteta vezanja biblioteka spojeva za optimizaciju vodećeg spoja:

- Perturbacija slobodne energije (eng. *Free Energy Perturbation*, FEP),
- Energija linearne interakcije (eng. *Linear Interaction Energy*, LIE),
- Molekularna mehanika Poisson-Boltzmann,
- Kvantna mehanika (QM).

FEP simulacije pokazale su se vrlo efikasnim u procjeni slobodnih energija vezanja između molekula i ciljnih proteina, često nadmašujući druge RBFE tehnike. Za razliku od tradicionalnih metoda, FEP je posebno koristan kada su razlike u slobodnoj energiji male, što omogućuje:

- Vrlo precizna predviđanja afiniteta vezivanja,
- Paralelno, neovisno izvođenje simulacija,
- Robusne performanse čak i s efektom otapala.

Brojne studije uspješno su primijenile FEP za strukturnu optimizaciju i molekularnu ciljnu analizu, uključujući istraživanje inhibitora SARS-CoV-2.

Molekularno spajanje uključuje opsežno konformacijsko pretraživanje unutar prostora vezanja kako bi se odredio najpovoljniji način vezanja. Tačnost ove metode uveliko ovisi o pouzdanosti njenih bodovnih funkcija, koje se temelje na energiji i rangiraju poze na temelju faktora kao što su vodikova veza, elektrostatske interakcije, π - π slaganje, van der Waalsove sile i efekti desolvatacije. Postizanje optimalnih rezultata zahtijeva tačnost balansiranja, funkcije bodovanja i računске utroške. Za izračune krajnjih tačaka koriste se metode poput molekularne mehanike Poisson–Boltzmannove površine (MMPBSA) i molekularne mehanike generalizirane Bornove površine (MMGBSA) ranije pomenute.

Dok su pristupi koji se temelje na kvantnoj mehanici (QM) naširoko poznati zbog svoje visoke tačnosti i detaljnih opisa, klasične metode često pružaju bolju učinkovitost za složene biohemijske sisteme i procese. Poisson–Boltzmannova površina dostupna otapalu (eng. *Poisson-Boltzmann Solvent-Accessible Surface Area*, PBSA) uzima u obzir doprinose otapala pri izračunavanju slobodne energije. Također MMPBSA pristup uključuje i entalpijske i entropijske doprinose, kao što je opisano u jednačinama 8-11.

$$\Delta G_{vezano,aq} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{MM} + \Delta G_{vezano,solv} - T\Delta S \quad (8)$$

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{kovalentno} + \Delta E_{elektrostatsko} + \Delta E_{vdw} \quad (9)$$

$$\Delta E_{kovalentno} = \Delta E_{veza} + \Delta E_{ugao} + \Delta E_{torzija} \quad (10)$$

$$\Delta G_{vezano,solv} = \Delta E_{pol} + \Delta E_{nonpol} \quad (11)$$

Promjena molekularne mehaničke energije gasne faze (ΔE_{MM}) uključuje promjene kovalentne energije (prilagodbe veze, ugla i torzije), promjene elektrostatske energije i van der Waalsove varijacije energije. Promjena energije bez solvatacije ($\Delta G_{vezano,solv}$) sastoji se od polarnih i nepolarnih doprinosa, s polarnim učincima otapala procijenjenim pomoću generalizirane Bornove metode parova i Poisson–Boltzmannove jednačine distribucije.

Doprinosi nepolarnih otapala obično se izračunavaju putem metode površine dostupne otapalu (SASA), koristeći jednačinu (12):

$$\Delta G_{nonpol} = \gamma SASA + \beta \quad (12)$$

gdje γ predstavlja površinsku napetost, a β je faktor korekcije.

Tan i saradnici predložili su ažuriranu jednačinu (13 i 14) koja uključuje slobodnu energiju disperzije i slobodnu energiju formiranja šupljina, procijenjenu preko volumena dostupnog otapalu, kako bi se poboljšali ΔG_{nonpol} izračuni.

$$\Delta G_{nonpol} = \Delta G_{disperzije} + \Delta G_{šupljine} \quad (13)$$

$$\Delta G_{nonpol} = \Delta G_{disperzije} + \gamma SAV + \beta \quad (14)$$

Brojne studije naglašavaju uspješnu primjenu MMPBSA/MMGBSA bodovanja u optimizaciji vodećih spojeva i naprednim izračunima slobodne energije.

7.12 Izazovi u studijama molekularnog dockinga

Protokoli molekularnog dockinga prvenstveno su dizajnirani za najčešće terapijske mete – proteine. Tačnost rezultata dockinga u velikoj mjeri ovisi o kvaliteti ulaznih podataka, posebno o strukturama liganada i receptora. Pored kvaliteta unosa, faktori kao što su funkcije potencijalne energije, algoritmi pretraživanja i funkcije bodovanja također značajno utiču na pouzdanost rezultata.

Strukture liganda mogu se dobiti iz različitih baza podataka ili ručno crtati. Programi za crtanje mogu generirati hemijske strukture, dok baze podataka kao što su ZincDB, ChemBank i PubChem pružaju pristup ogromnoj kolekciji spojeva. Osiguranje pouzdane 3D strukture s ispravnim dužinama veza, uglovima i enantiomernim konfiguracijama je od ključnog značaja. Na primjer, pretvaranje struktura iz 1D SMILES formata u 3D ponekad može dovesti do netačnih konformacija, posebno u aromatičnim prstenovima unutar makrocikličkih spojeva. Neki programi za docking rješavaju ove probleme na način da generišu više niskoenergetskih konformacija i testiraju ih prije dockinga, ili omogućavaju fleksibilne stepene slobode tokom dockinga. Prvi

metod, iako sveobuhvatan, je računski intenzivan, dok je drugi praktičniji i efikasniji. Napredak u algoritmima pretraživanja zasnovanim na pravilima poboljšao je preciznost fleksibilnog dockinga. Osim toga, neophodna je pažljiva inspekcija tipova atoma, jer neki algoritmi za docking zamjenjuju nepoznate ili jedinstvene tipove atoma lažnim atomima, što dovodi do netačnih rezultata i proračuna energije.

Tautomeri, izomeri koji se razlikuju po repozicioniranju atoma vodika, doprinose strukturnoj i hemijskoj raznolikosti molekula. Preko 25% lijekova pokazuje tautomeriju, što može značajno uticati na orijentaciju vezivanja liganda i snagu interakcije. Stoga pristupi dockinga naglašavaju precizno postavljanje atoma vodika kako bi se održale precizne interakcije vodikove veze. Slično tome, različita stanja protoniranja mogu uticati na vezivanje liganda mijenjajući hiralnost i obrasce vodikove veze. Stanja protoniranja zavise od fizioloških uslova kao što su pH, rastvarač i temperatura. Dok algoritmi za docking balansiraju između brzine i preciznosti, možda neće uzorkovati sve funkcionalne tautomere liganada. Fiziološki pH aktivnog mjesta može varirati u zavisnosti od izloženosti rastvaraču, okoline koja se vezuje za vodikovu vezu i pKa susjednih ostataka. Da bi se osigurali pouzdani rezultati dockinga, neophodno je pažljivo pripremiti ulazne strukture i tumačiti rezultate dockinga imajući na umu ova razmatranja.

Preciznost nevezanih interakcija između liganda i njegovog receptora ovisi o pravilnoj karakterizaciji oba molekula. Elektrostatičke i van der Waalsove interakcije određuju se korištenjem atomskih jonskih radijusa i distribucije naboja, kako je definirano u standardnim poljima sile. Dok su jonski radijusi dobro dokumentovani za različite hemijske vrste, dodjeljivanje tačnih naboja liganda ostaje složen izazov zbog ogromne hemijske raznolikosti liganda. Formalni naboj liganda je određen njegovim sastavnim hemijskim grupama, dok parcijalni naboji proizilaze iz efekata polarizacije elektrona. Ovi parcijalni naboji, koji predstavljaju distribuciju elektrona unutar molekula, mogu se dodijeliti različitim metodama, uključujući pristupe kvantne mehanike, poluempirijske proračune, metode zasnovane na polju sile i potpuno empirijske tehnike. Među njima, QM i poluempirijske metode su najpreciznije, ali računski zahtjevne. Metode zasnovane na polju sile ili empirijske metode nude brže proračune i općenito daju pouzdane rezultate za molekule slične

lijekovima, iako možda nisu prikladne za neorganske spojeve i spojeve s koordinativno vezanim metalom. Pogrešna dodjela naboja može dovesti do neusklađenih parova naboja između liganada i receptora, stvarajući lažno negativne rezultate.

Sve veća dostupnost malih organskih molekula u bazama podataka proširila je skup potencijalnih liganada. Kako bi se pojednostavile studije molekularnog dockinga, ove baze podataka se filtriraju korištenjem unaprijed definiranih **fizičko-hemijskih kriterija**. Dva uobičajena pravila filtriranja uključuju Lipinski pravilo petice za molekule slične lijekovima, i „pravilo trice“ za dizajn lijekova zasnovan na fragmentima. Oba okvira procjenjuju molekularnu težinu, potencijal vodikove veze i koeficijent raspodjele oktanol-voda ($\log P$) kako bi se predvidjela oralna bioraspodjelivost i sličnost lijeku. Dodatno, jedinjenja se provjeravaju prema filteru Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) kako bi se eliminirale molekule sklone nespecifičnim interakcijama. Drugi pristup je uklanjanje reaktivnih grupa (na primjer, akrilamida i hloraacetamida) koje mogu uzrokovati lažno pozitivne rezultate u HTS screeningu. Primjena ovih kriterija screeninga smanjuje broj potencijalnih liganada, štedeći računarske resurse i poboljšavajući efikasnost virtuelnog screeninga. Dizajn lijekova zasnovan na fragmentima dodatno optimizuje ovaj proces fokusirajući se na manje molekularne fragmente sa velikom pokrivenošću hemijskog prostora.

Visokokvalitetna ciljna struktura je neophodna za studije dockinga. Bez obzira na izvor, struktura mora biti **rafinirana** kako bi se osigurala tačnost. Za strukture dobijene rendgenskom kristalografijom, ključni pokazatelji kvaliteta uključuju:

- R-faktor i rezolucija – procjena ukupnog kvaliteta strukture,
- B-faktor i popunjenost – ukazuje na stabilnost na atomskom nivou (niže vrijednosti ukazuju na manju strukturnu fleksibilnost).

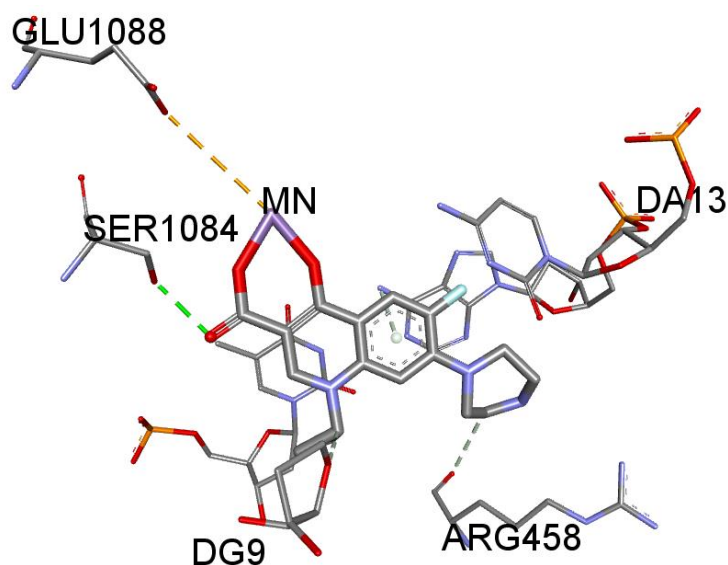
Neke proteinske strukture pokazuju visoke B-faktore u regijama kao što su neuređene petlje, koje možda neće biti dobro snimljene rendgenskom kristalografijom. Dodatno, alternativne konformacije bočnog lanca prijavljene u kristalnim strukturama zahtijevaju pažljiv odabir na temelju biološke funkcije proteina. Ljudske greške i ograničenja računarskih programa također

mogu dovesti do netačnosti u strukturalnim interpretacijama. Kada eksperimentalno određene strukture nisu dostupne ili su niske rezolucije, može se koristiti homološko modeliranje. Međutim, tačnost homoloških modela u velikoj mjeri zavisi od kvaliteta poravnanja sekvenci i odabira predloška. Nakon dobijanja strukturnog modela, potrebno je dalje usavršavanje, kao što je ispravljanje nedostajućih atoma i veznih uglova, provjera konformacije osovine i bočnog lanca, te uklanjanje nerelevantnih molekula kao što su soli ili komponente pufera. Programi za docking su dizajnirani da prepoznaju samo standardne aminokiseline i baze nukleinskih kiselina. Stoga se neprirodne aminokiseline (npr. selenometionin) i post-translacijske modifikacije moraju vratiti u njihove izvorne oblike prije samog dockinga.

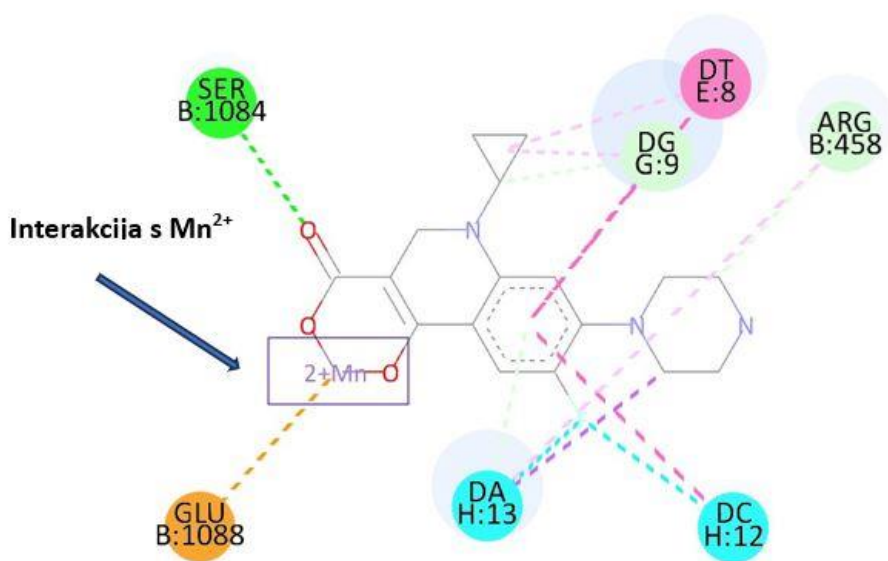
Baš kao što tautomerna stanja utiču na interakcije liganda, **protonacijska stanja** aminokiselina značajno utiču na rezultate molekularnog dockinga. Isti izazovi sa kojima se susreću pri određivanju protonacijskih stanja liganada odnose se na ciljne proteine i nukleinske kiseline, prvenstveno zbog varijabilnosti pH. Aktivna mjesta često sadrže višestruke protonabilne ostatke, što dovodi do nekoliko mogućih kombinacija stanja protoniranja. Identifikacija ispravnog uzorka protonacije zahtijeva temeljno razumijevanje strukture i funkcije ciljnog molekula.

Metalni joni i kofaktori igraju vitalnu ulogu u enzimskoj katalizi, zbog čega je njihova tačna zastupljenost u docking studijama bitna. Međutim, modeliranje interakcija ligand-metal i protein-metal ostaje izazov zbog njihove djelimično kovalentne prirode. Da bi se ovo riješilo, preporučljivo je koristiti docking programe opremljene specijaliziranim funkcijama bodovanja za komplekse koji sadrže metal. **Slike 7.11 i 7.12** prikazuju vezni model i interakcije u kompleksu između ciprofloksacina i DNK giraze iz *Staphylococcus aureus*, gdje se uočavaju interakcije farmakofora ciprofloksacina s jonom mangana iz DNK giraze. Jaki elektrostatički uticaj metalnih jona komplikuje ocjenjivanje vezivanja liganda. Osim toga, uklanjanje esencijalnih kofaktora (npr. NADP, hem) može poremetiti rezultate dockinga, jer ove molekule često direktno učestvuju u interakcijama supstrata ili su neophodni za enzimsku funkciju. Odluka o zadržavanju ili uklanjanju

kofaktora ovisi o cilju docking studije - da li se cilja na kompetitivnu ili alosterijsku inhibiciju.



Slika 7.11 3D prikaz kompleksa ciprofloksacina i DNK giraze iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT).



Slika 7.12 2D prikaz interakcija u kompleksu ciprofloksacina i DNK giraze iz *Staphylococcus aureus* (PDB ID: 2XCT).

Molekule vode također zahtijevaju pažljivo razmatranje u docking studijama. U nekim enzimima, posebno proteazama, molekule vode igraju ključnu ulogu u katalizi. U tim slučajevima, prije docking studije treba utvrditi da li ukloniti molekule vode ako je ligand dizajniran da ih zamijeni ili ih zadržati ako doprinose stabilnosti i interakcijama liganda. Temeljno razumijevanje strukturnih i funkcionalnih uloga molekula vode u aktivnom mjestu je neophodno prije nego što se odluči o njihovom uključivanju ili isključivanju iz docking studije.

Definiranje mjesta vezivanja je neophodan korak u virtuelnom screeningu i dockingu. Prilikom ciljanja na poznato mjesto vezivanja, područje pretraživanja treba da pokrije regiju koju zauzimaju poznati ligandi, uz dopuštanje mogućih alternativnih načina vezivanja. Međutim, pretjerano veliki prostor za pretraživanje smanjuje tačnost i povećava proračune. Da bi se optimizirala tačnost dockinga, preporučuje se uključivanje endogenih molekula u biblioteku za screening. Ove molekule služe kao kontrole validacije za optimizaciju parametara bodovanja i pretraživanja i kao referentne tačke za procjenu rezultata dockinga.

Za nukleinske kiseline, mjesta vezivanja mogu se kategorizirati na osnovu strukturnih karakteristika, kao što su glavni i manji žljebovi DNK. Glavni žlijeb je širi i pristupačan proteinima i peptidima, dok je manji žlijeb uži i prihvata male molekule. U RNK, ovaj trend je obrnut: glavni žlijeb vezuje male molekule, dok manji žlijeb stupa u interakciju sa proteinima. Osim toga, visoko nabijena fosfatna osovina privlači jone metala i molekule vode. Budući da male molekule moraju poremetiti ovu hidratacijsku ljusku da bi postigli snažno vezivanje, visoki polaritet je ključni zahtjev za ligande koji se vezuju za nukleinsku kiselinu. Osim žlijebnog vezivanja, ligandi će također stupati u interakciju s nukleinskim kiselinama putem interkalacije ili slaganja preko terminalnih baza. Međutim, ove interakcije je teško precizno uhvatiti pomoću docking studija, što ih čini izazovnijim aspektom dizajna lijekova usmjerenih na nukleinske kiseline.

Čak i sa visokokvalitetnim ulaznim podacima, efikasnost bilo kojeg docking programa u velikoj mjeri zavisi od njegovog **algoritma pretraživanja i funkcije bodovanja**, koji balansiraju brzinu i tačnost. Budući da se docking

programi često koriste za pregled velikih hemijskih baza podataka, njihove funkcije bodovanja moraju biti dovoljno precizne da minimiziraju lažno pozitivne rezultate. Funkcije bodovanja služe za dvije osnovne svrhe – predviđanje poze (određivanje potencijalnih konformacija vezivanja, koje se oslanja na metodu uzorkovanja) i rangiranje (procjena i redoslijed predviđenih poza na osnovu energetskih proračuna). Funkcije bodovanja dijele se u tri glavne kategorije: empirijske, funkcije zasnovane na znanju i funkcije zasnovane na polju sile. Svaki tip je razvijen na osnovu specifičnih skupova podataka, koji mogu uvesti ograničenja kada se radi o visoko nabijenim veznim mjestima ili okruženjima u kojima dominiraju hidrofobne/hidrofilne interakcije. U takvim slučajevima, razvoj funkcija bodovanja specifičnih za metu može poboljšati performanse. Prije izvođenja velikog virtuelnog screeninga, korisnici bi trebali provjeriti funkcije bodovanja koristeći poznati skup liganada specifičnih za cilj. Osim toga, fleksibilnost proteina ostaje izazov za napredne funkcije bodovanja koje uključuju polarizabilnost.

Postoje dvije velike zamke u **funkcijama bodovanja**: procjenjivanje entalpijskih doprinosa (zbog svoje aditivne prirode, veći ligandi mogu dobiti više rezultate jednostavno zato što imaju više interakcija, a ne zbog jakog, specifičnog vezivanja), i zavisnost od algoritma pretraživanja (preciznost funkcija bodovanja je inherentno povezana sa koliko dobro algoritam uzorkuje puni konformacioni pejzaž). Kompleksnost molekula – koja proizilazi iz faktora kao što su veličina molekula, fleksibilnost i stepen slobode i liganda i receptora – takođe utiče na performanse funkcije bodovanja. Jedna strategija za poboljšanje efikasnosti je pojednostavljivanje prostora konformacionog pretraživanja integracijom eksperimentalnih podataka ili korištenjem objedinjenog modela bodovanja koji uzima u obzir sve kritične parametre koji utiču na pejzaž dockinga.

8

Osnovni koncepti sintetske biologije biljaka

Irma Mahmutović-Dizdarević

Sintetska biologija se tipično definira kao naučna disciplina koja ima za cilj kreiranje novih odlika u živim sistemima, tako da oni čine ili proizvode nešto korisno. U svom osnovu, sintetska biologija predstavlja kombinaciju postulata DNK tehnologije, principa genetičkog modificiranja i upotrebe kompjuterskih alata koji omogućavaju dizajniranje novih životnih procesa ili izmjenu postojećih na način da postanu korisniji. Dizajniranjem i kreiranjem genetičkih sistema korištenjem standardiziranih i zamjenjivih dijelova, sintetska biologija otvara mogućnosti reprogramiranja bioloških entiteta s ciljem poboljšanja održivosti.

Sintetska biologija biljaka je multidisciplinarno naučno polje koje kombinira principe sintetske biologije, genetike, biotehnologije i botanike za dizajniranje i izgradnju novih biljnih sistema ili modifikovanje postojećih. Vrlo često podrazumijeva i kreiranje novih biosintetskih puteva u biljkama, promjenu njihovog genetskog materijala ili inženjering novih bioloških funkcija kako bi se postigla sigurna produkcija hrane, biogoriva ili s ciljem poboljšanja sveukupne održivosti individua i njihovog okoliša. Kao podskup sintetske biologije biljaka moguće je izdvojiti i tzv. **sintetsku botaniku**, disciplinu koja je isključivo usmjerena na biljne organizme i koja stavlja naglasak na razumijevanje funkcija i procesa u biljkama, te evolutivnih strategija i obrazaca kroz genetički inženjering.

Sintetska botanika neizostavno obuhvata primjenu inženjerskih principa za kreiranje novih biljnih svojstava ili sistema, ali uvijek sa aspekta biljne

fiziologije. Sintetska biologija biljaka potencijalno nudi veliku korist bioekonomiji, zato što može modificirati biljne organizme tako da imaju veću nutritivnu ili farmakološku vrijednost, reducirati oslobađanje i akumulaciju štetnih komponenti, te ponuditi solidnu osnovu za održivu agrikulturu. Istovremeno, zbog mogućnosti sistemske manipulacije, testiranja specifičnih hipoteza i rasvjetljavanja mehanizama koji stoje iza istraživanih procesa, sintetska biologija biljaka može pomoći u razumijevanju brojnih problema iz domena fundamentalne biologije biljaka.

Kako bi se istražio veliki potencijal biljaka za ekspresiju kompleksnih osobina potrebni su: učinkoviti alati i metode genetičkog inženjeringa; jednostavnije višćelijske biljne osnove (eng. *chassis*: šasija, postolje, osnova; Izraz *chassis* u sintetskoj biologiji se odnosi na ćelijskog domaćina koji se koristi kao recipijent modificiranih bioloških sistema, a potreban je za propagiranje genetičke informacije i ekspresiju gena) podložne brzjoj analizi; te kontrola biosinteze, transporta i pohrane metabolite u specijaliziranim ćelijama unutar kompleksnih biljnih tkiva.

8.1 Najvažniji pristupi u sintetskoj biologiji biljaka

Sintetska biologija biljaka obuhvata brojne metode i tehnologije, kao i njihove kombinacije, a među glavnim se izdvajaju: genetički inženjering i CRISPR/Cas9; upotreba sintetskih bioloških dijelova i standarda; inženjering metaboličkih puteva; dizajn i upotreba sintetskih promotora i regulatora; projektovanje biljnog mikrobioma; optogenetički i hemijski induktori; projektovanje biljnih bioreaktora; skrining visoke propusnosti, te mašinsko učenje; konstrukcija sintetskih puteva; te metode iz oblasti sintetske ekologije biljaka.

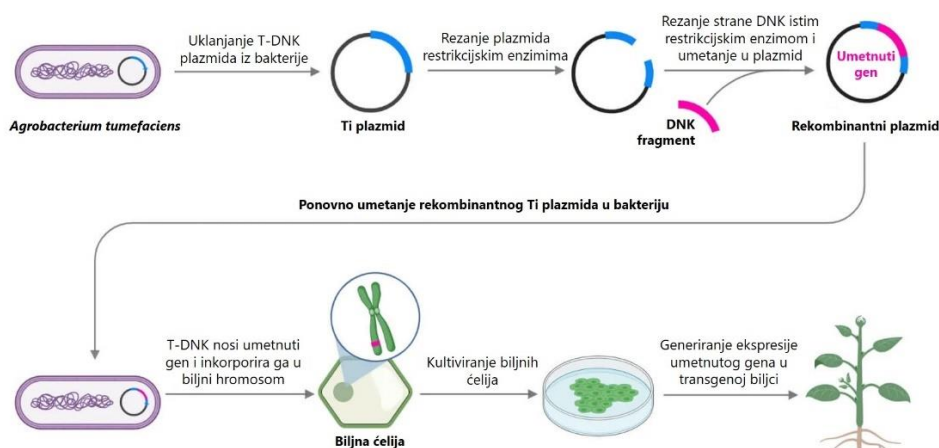
CRISPR/Cas tehnologija uređivanja genoma promijenila je molekularnu biologiju biljaka iznad svih očekivanja. S obzirom da se radi o robusnoj tehnologiji, koja ima visoku specifičnost i programibilnost, moguća je precizna genetička manipulacija biljnih vrsta od interesa, a često se radi o biljkama koje imaju nutritivnu i farmakološku vrijednost. Nadalje, na CRISPR/Cas platformi ponikle su brojne druge metode biotehnologije koje nalaze primjenu kako u fundamentalnim istraživanjima tako i u oblasti sintetske biologije biljaka. Tehnologije targetiranja gena kod biljaka počivaju

na tzv. popravkama usmjerenim na homologiju (eng. *Homology-Directed Repair*, HDR), koje omogućavaju precizno uređivanje genoma kroz introdukciju insercija, zamjenu sekvenci i nukleotidne supstitucije. Ipak, kroz HDR se ostvaruje mala učinkovitost uređivanja, što limitira širu upotrebu ovog koncepta. Kao alternativne tehnologije u literaturi se navode uređivanje baza posredovano deamiazom, te uređivanje posredovano reverznom transkriptazom.

Navedene tehnike ne podrazumijevaju formiranje dvolančanih lomova i ne zahtijevaju donorsku DNK. Ovi alati zasnovani na CRISPR/Cas tehnologiji induciraju precizno uređivanje sekvenci i dosta su učinkovite kod biljaka. Nove CRISPR/Cas tehnologije koje se koriste za precizno uređivanje biljnih genoma su i: uređivanje citozinskih baza (eng. *Cytosine Base Editing*, CBE); uređivanje adeninskih baza (eng. *Adenine Base Editing*, ABE); uređivanje dualnih baza (eng. *Dual Base Editing*, DBE); CBE-zasnovana precizna delecija DNK (eng. *CBE-Based Precise DNA Deletion*); *prime* uređivanje (eng. *Prime Editing*, *prime*: glavni, osnovni, prvi, najbolji, najvažniji...) itd. CRISPR/Cas9 uređivanje genoma se vrlo uspješno primjenjuje kod biljaka, u prvom redu modelnih objekata kao što su *Arabidopsis* sp., *Nicotiana* sp., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Citrus × sinensis* i *Marchantia polymorpha* L.

Metode koje se koriste za **transformaciju biljaka** mogu se svrstati u **direktne** i **indirektne** metode. Transformacija biljaka posredovana sa *Agrobacterium tumefaciens* je vrlo svestran alat genetičkog inženjstva koji se koristi i danas, a otkriven je prije gotovo pola stoljeća. Sama tehnika počiva na spoznaji da Gram-negativna, štapičasta, zemljišna bakterija *A. tumefaciens* prirodno prenosi svoju T-DNK (na Ti plazmidu koji uzrokuje tumor biljke domaćina; eng. *Tumor inducing*) u svaku ranjenu, odnosno inficiranu biljnu ćeliju. Na temelju tog fenomena, moguće je kreirati proces transfera nekog gena, najprije inkorporiranjem u T-DNK bakterije, a potom introdukcijom u biljni genom. T-DNK se integriše na više različitih mjesta u biljnom nuklearnom genomu (**Slika 8.1**). Naravno, od prvih deskripcija metodologije, napravljene su brojne izmjene kako bi se proširila primjena i povećala učinkovitost, osobito kod ekonomski važnih vrsta biljaka, npr. žitarica. Cilj ovih izmjena je povećanje frekvencije transformacije, kao i generisanje

stabilnih transgenih kopija koje imaju potencijal da izazovu svojevrsnu revoluciju u modernoj agrikulturnoj praksi. Ova tehnika pripada indirektnim metodama transformacije. Pored *Agrobacterium*-posredovane transformacije, potrebno je napomenuti da se za introdukciju strane DNK u biljne ćelije može koristiti i direktna metoda bombardiranja nanočesticama (tzv. genski pištolj; eng. *gene gun*). Ova tehnika isporuke strane DNK posredstvom mikroprojektila često se kolokvijalno naziva *biolistika*, što bi predstavljalo skraćeni naziv za „biološku balistiku“. Moguće je transformirati nuklearne genome, te genome organela kao što su plastidi i mitohondriji. Direktna transformacija obuhvata i elektroporaciju i mikroinjektiranje.



Slika 8.1 Osnovni postupci u tehnici direktne, *Agrobacterium*-posredovane transformacije biljaka. (preuzeto i prilagođeno iz Microbe Notes, 2022)

Korištenje modularnih DNK komponenti s ciljem postizanja genetičkih/metaboličkih puteva, kao i alata za bihevioralnu predikciju iz mehaničkih modela, te implementacija standarda koji omogućavaju sastavljanje dijelova načinjenih od različitih proizvođača i kreiranje svojevrsnih biblioteka dobro okarakterisanih, standardiziranih komponenti su u centru paradigme sintetske biologije.

Sintetska biologija biljaka obuhvata upotrebu **sintetičkih bioloških dijelova** (promotora, kodirajućih sekvenci, terminatora itd.) i **standarda** koji se mogu kombinovati s ciljem kreiranja predvidivih ishoda u istraživanim biljnim

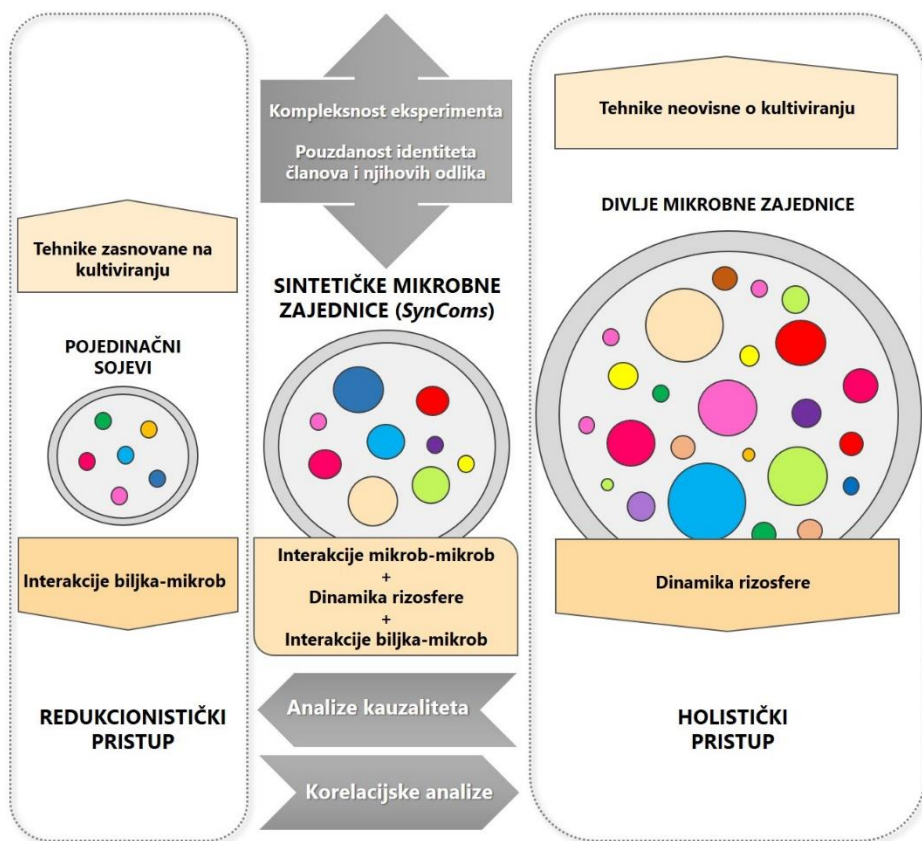
organizmima. Standardizirani dijelovi, čije je zajedničko kolokvijalno ime „**biobricks**“ (eng. *brick*: cigla) koriste se u dizajniranju i generiranju novih biosintetskih puteva i/ili metaboličkih mreža u biljakama. *BioBrick* standard za sastavljanje je poznat kao prvi široko prihvaćeni biološki standard, koji je obuhvatio pohranu velikog broja dijelova (primarno iz modificiranih prokariota) u tzv. Registar standardnih bioloških dijelova (eng. *Registry of Standard Biological Parts*). Biljke kao eukariotski organizmi trebaju drugačiju genetsku sintaksu za sastavljanje gena i metaboličkih puteva, a i plazmidi koji se koriste za transformaciju biljaka često zahtijevaju specifične uvjete. Iako su neke metode ovisne o preklapanju (tzv. Gibson sastavljanje) veoma učinkovite, one zahtijevaju specijalizirane oligonukleotide i amplifikaciju svih standardnih dijelova (čak i onih koji su dobro okarakterizirani) kod svakog novog protokola sastavljanja, osim u slučaju kada se koriste standardizirana preklapanja. Upotreba restrikcijskih enzima tipa IIS za sastavljanje standardnih dijelova (poznato kao *Golden Gate Cloning*) predstavlja alternativni pristup jer su dijelovi podložni promjeni, ali i jednostavnijem i jeftinijem sastavljanju na automatiziran način, bez upotrebe posebnih alata i reagensa. Brojne poznate i često korištene sekvence su adaptirane za ovaj vid sastavljanja, te je usvojena zajednička sintaksa koja omogućava razmjenu DNK dijelova kod biljaka. Ova zajednička sintaksa opisuje 12 fuzijskih mjesta s ciljem sastavljanja eukariotskih transkripcijskih jedinica i utvrđenih standarda koji dalje omogućavaju razmjenu i ponovnu upotrebu standardnih dijelova bez posebnih adaptacija.

Nadalje, jedan od važnih zadataka i problema kojima se bavi sintetska biologija biljaka je **inženjering metaboličkih puteva**. Dodavanjem, deletiranjem ili izmjenom gena, odnosno enzima u metaboličkim putevima biljaka, moguća je produkcija visoko vrijednih jedinjenja kao što su biogoriva, farmakološki aktivne supstance ili neki drugi hemijski spojevi. Ove tehnike često podrazumijevaju preusmjeravanje postojećih biosintetskih puteva biljke, a nekada i uvođenje potpuno novih. Za potrebe kontrole genske ekspresije u biljkama na specifičan i prilagodljiv način dizajniraju se sintetički promotori koji mogu biti inducibilni i koji se aktiviraju se kao odgovor na okolišne signale, svjetlost ili hemijske supstance. Na ovaj način ostvaruje se fina kontrola nad time kada i gdje dolazi do ekspresije gena. Nadalje, sintetički

regulatorni elementi se mogu koristiti za kontrolu genske ekspresije na nivou translacije, čime se zapravo kontrolira sveukupni biljni odgovor.

U domen sintetske biologije biljaka neizostavno spada i **projektovanje biljnog mikrobioma**. Pod pojmom „biljni mikrobiom“ smatra se zajednica mikroba koji žive oko i unutar same biljke. S obzirom na činjenicu da biljni mikrobiom može poboljšati zdravlje i rast biljaka, često se implementiraju metode inženjeringa korisnih mikroba ili probira specifičnih mikrobnih zajednica koje mogu poboljšati unos nutrijenata, otpornost na bolesti ili toleranciju na stres. Također, ovo može uključivati i korištenje postulata sintetske biologije za razvoj mikroba koji mogu proizvoditi hormone rasta biljaka ili fiksirati azot, što bi smanjilo potrebu za korištenjem hemijskih đubriva.

Sintetičke mikrobne zajednice (eng. *Synthetic microbial communities*, „SynComs“) sadrže pažljivo odabrane vrste mikroba zadužene za postizanje željene funkcije mikrobioma. Stvaranje mikrobnog biofilma, proizvodnja sekundarnih metabolita i sposobnost induciranja otpornosti biljaka neke su od mikrobnih osobina koje treba uzeti u obzir pri dizajniranju sintetičkih mikrobnih zajednica. Naravno, mikrobne zajednice asocirane sa biljkama nisu sastavljene nasumično. Ekološke teorije sugeriraju da te zajednice imaju definiranu filogenetsku organizaciju strukturiranu općim pravilima kreiranja životne zajednice. Koristeći mašinsko učenje moguće je izučavanje tih pravila i targetiranje mikrobnih funkcija koje generiraju željene fenotipove biljaka. Dobro strukturirane skupine će vjerovatno dovesti do stabilne sintetičke mikrobne zajednice koja dobro uspijeva pod uticajem različitih stresora iz okoliša. Ipak, osiguranje mikrobne kolonizacije i dugoročne stabilnosti fenotipa biljke je i dalje jedan od izazova koji treba prevladati, jer se sintetička zajednica može vremenom promijeniti usljed mikrobnog horizontalnog transfera gena i mutacija. Danas postoje različiti pristupi u razumijevanju uloge korijenškog mikrobioma u biljkama, a s obzirom na strategiju obrade informacija izdvajaju se **redukcionistički** i **holistički** pristup (**Slika 8.2**). Upotreba sintetičkih mikrobnih zajednica predstavlja izvjesni „srednji put“ razumijevanja, koji na specifičan način povezuje znanja stečena izučavanjem pojedinih mikrobnih sojeva i onih znanja generisanih istraživanjem kompletnih mikrobioma.



Slika 8.2 Pristupi u razumijevanju uloge biljnog mikrobioma.

Ukoliko je u eksperiment uključen veći broj mikroorganizama, očekivano je i da kompleksnost studije raste, dok se istovremeno smanjuje pouzdanost identiteta članova i njihovih odlika. Redukcionistički pristupi počivaju na analizi uzročnosti, tj. kauzaliteta, dok se holistički pristupi primarno oslanjaju na korelacijske analize.

Optogenetika je tehnika koja koristi prirodne ili genetski modificirane fotoreceptore u transgenskim organizmima za manipuliranje biološkim aktivnostima uz pomoć svjetlosti. Za razumijevanje bioloških procesa u ćelijama, poput signalnih puteva, kretanja proteina i metaboličkih procesa, potrebni su precizni alati za manipulaciju. Optogenetika omogućava kontrolu ćelijskih procesa uz pomoć svjetlosti, a istraživanja pokazuju da se može primijeniti u visokoj prostorno-vremenskoj rezoluciji. U posljednje tri decenije razvijene su brojne optogenetičke tehnike koje nalaze primjenu kod

animalnih, fungalnih i prokariotskih stanica. Optogenetika može kontrolirati protein-protein interakcije fuzijom proteina od interesa (POI) za dimerizirajuće proteine osjetljive na svjetlo (DP), čime se omogućava targetiranje proteina od interesa na specifičnoj subcelularnoj lokaliji i/ili regulacija njihove aktivnosti. Također, kontrola ekspresije gena od interesa (GOI) je fundamentalni pristup u optogenetici. Tako se korištenjem infracrvenog svjetla (IC) za indukciju ekspresije gena od interesa pod kontrolom promotora proteina toplotnog šoka (eng. *Heat-Shock Protein*, HSP), utilizira intrinzični odgovor ćelija na toplotu.

Opisani su i sistemi ekspresije koji koriste dimerizirajuće proteine osjetljive na svjetlo, fuzirane na DNK-vezujuće domene i regulatore transkripcije u kombinaciji sa sintetičkim promotorskim elementima. Još jedan često korišteni optogenetički pristup je manipulacija jonskog fluksa duž ćelijske membrane korištenjem jonskih kanala osjetljivih na svjetlo, kao što su kanal rodopsina (eng. *Channel rhodopsins*, ChRs) ili jonske pumpe. Jedan od vrlo poznatih postupaka u optogenetičkoj regulaciji funkcije proteina uključuje fuziju proteina od interesa za tzv. LOV domenu (eng. *Light-Oxygen-Voltage*) koja je prvobitno opisana kao domena biljnih fototropina, ali je kasnije detektovana i kod drugih organizama. U ovom procesu nophodno je učešće flavin-mononukleotida (FMN) ili flavin-adenin-dinukleotida (FAD) kao kofaktora. Nadalje, optogenetičke manipulacije proteinske aktivnosti se postižu hromofor-asistiranom svjetlosnom inaktivacijom (eng. *Chromophore-Assisted Light Inactivation*, CALI), koja koristi fuziju proteina od interesa na fluorescentne proteine (FP), uz visoku produkciju reaktivnih oksigenskih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koje ireverzibilno oksidiraju proteine od interesa.

Korištenje optogenetike kod biljaka je dugo vremena bilo otežano usljed kombinacije bioloških i tehničkih izazova kao što su nedostatak kofaktora, prisustvo endogenih fotoreceptora, te potreba biljaka za svjetlom zbog procesa fotosinteze, a što bi potencijalno aktiviralo optogenetičke alate. Kao što je i ranije naglašeno, biljna optogenetika se susreće sa različitim ograničenjima, najprije vezanim za činjenicu da je svjetlo neophodno za rast i razvoj biljke. Ova činjenica predstavlja izazov jer usljed potrebe biljke za svjetlom može doći do neželjene aktivacije optogenetičkih procesa. Ipak,

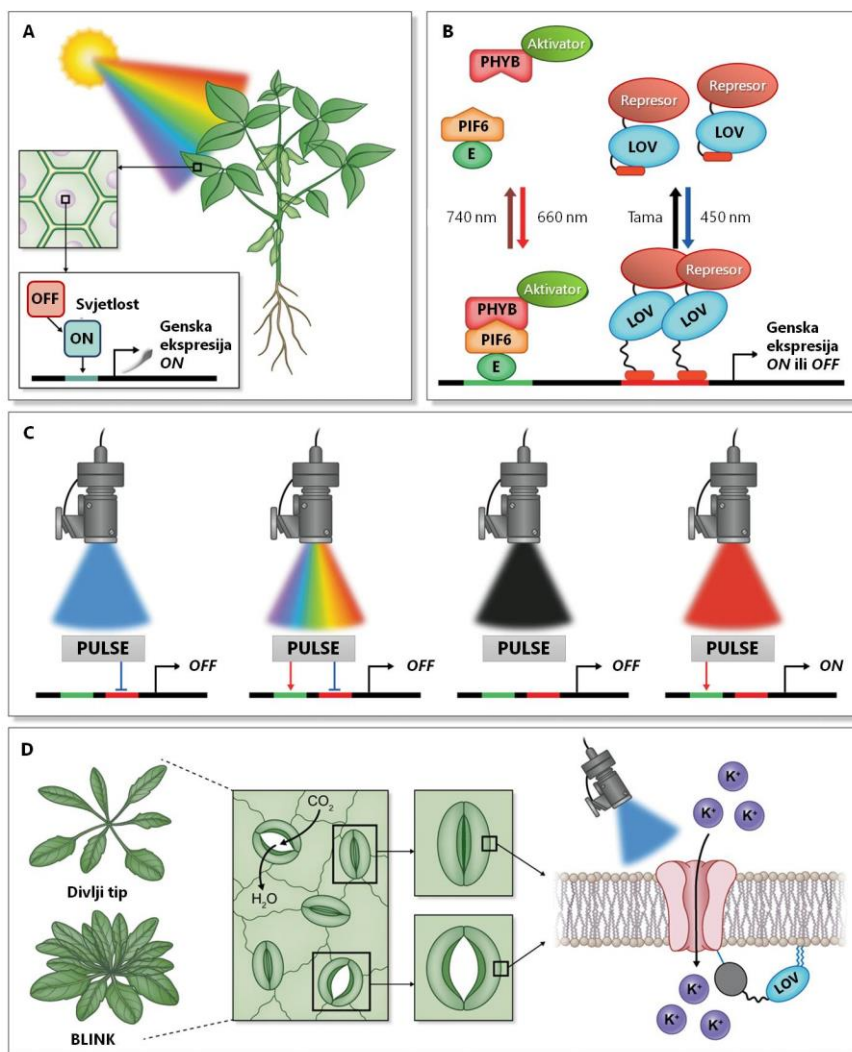
recentne studije iz ove oblasti pokazuju da se optogenetika može uspješno primijeniti kod biljaka. Prvi primjeri optogenetičke kontrole genske ekspresije su zabilježeni kod *Nicotiana benthamiana* Domin i *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., odnosno njihovih protoplasta deriviranih iz PHYB-PIF interakcija. PHYB je akronim fitohroma B (eng. *Phytochrome B*), dok PIF stoji za protein, faktor interakcije sa fitohromom (eng. *Phytochrome-interacting factor*).

S ciljem optimizacije optogenetičkih metoda razvijen je i tzv. **PULSE** (eng. *Plant Usable Light-Switch Elements*) sistem, koji nije osjetljiv na bijelo svjetlo širokog spektra, ali se može aktivirati upotrebom crvenog svjetla. S obzirom da optogenetika podrazumijeva inženjering i implementaciju fotoreceptora za kontrolu ćelijskih procesa posredstvom svjetla, dizajnirani su posebni proteini ili proteinske domene osjetljive na svjetlost, kako bi nastalni sintetički foto-prekidači (eng. *photoswitches*). PULSE sistem kombinira dva različita foto-prekidača za kontrolu inicijacije transkripcije od sintetičkog bipartitnog promotora. Jedan od njih je inženjersan od transkripcijskog faktora zasnovanog na LOV, tzv. EL222 proteinu. EL222 je fotosenzitivni protein koji reaguje na plavu svjetlost. Usljed djelovanja plavog svjetla dolazi do rearanžiranja u ovoj molekuli, što vodi ka dimerizaciji otkrivanjem C-terminalnog DNK-vezujućeg efektor na površini fotosenzorne LOV domene. Ovaj modul je označen kao *Blue-off* modul (**Slika 8.3**).

Drugi je zasnovan na PHYB-PIF6 foto-prekidaču i označava se kao *Red-on* modul. S obzirom da protein EL222 dimerizira i veže se na ciljanu DNK sekvencu u uslovima plavog svjetla, moguća je inhibicija transkripcije ukoliko dođe do fuzije sa posebnom represorskom domenom, EAR (eng. *Ethylene-Responsive Element Binding Factor-Associated Amphiphilic Repression*). EAR domene inače dovode do transformacije DNK-vezujućih proteina u represore. Stoga, PULSE sistem omogućava učinkovitu optogenetičku manipulaciju genske ekspresije kod biljaka pod standardnim uslovima, s obzirom na to da se transkripcija zaustavlja kod bijelog svjetla posredstvom *Blue-off* modula, a aktivira samo kod monohromatskog crvenog svjetla uz aktivnost *Red-on* modula. Za sada je PULSE sistem pokazao uspjeh u upotrebi kod cijelih biljaka, ali i protoplasta, što otvara brojne aplikativne mogućnosti (**Slika 8.3**).

Optogenetički alati se koriste i za povećanje biljnog odgovora na svjetlo. Fuzija foto-prekidača LOV2-Jα sa minijaturnim Kcv jonskim kanalom, rezultira sintetičkim K⁺ kanalom koji se inducira djelovanjem plavog svjeta i označava kao BLINK1. Inače, Kcv je najmanji protein koji formira funkcionalni kanal kalijumovih jona, a ima virusno porijeklo, od *Paramecium bursaria* Chlorella virusa 1 (PBCV-1). Sintetički BLINK1 jonski kanal se zatvara u mraku, a njegovo otvaranje je odgovor na plavo svjetlo, te je tako omogućen obostrani protok jona u ovisnosti od gradijenta koncentracije K⁺ duž membrane. Recentne studije sugeriraju da BLINK1 može modificirati stomatalne pokrete kod *Arabidopsis* vrsta, kada dođe do ekspresije u ćelijama pomoćnicama stoma. Fototropin (PHOT) okida otvaranje stoma pod djelovanjem plavog svjetla aktiviranjem membranske H⁺-ATP-aze, čija aktivnost promovira preuzimanje K⁺ jona, što je neophodno da se izazovu promjene volumena i turgora u ćelijama pomoćnicama. Ova osobita ekspresija BLINK1 u ćelijama pomoćnicama koristi istu talasnu dužinu kao i PHOT da osigura kinetiku otvaranja stoma dodavanjem još jednog puta utilizacije kalija koji je posredovan svjetlom. BLINK1 također povećava stopu zatvaranja stoma u mraku, vjerovatno promoviranjem efluksa kalija, što je posljedica njegove spore kinetike obnavljanja.

U konačnici, BLINK1 ekspresija kod biljaka dovodi do povećanja produkcije biomase, osobito u uslovima fluktuirajućeg svjetla, a to je tipično za vanjski rast, jer se ovaj ubrzani stomatalni odgovor bolje sinhronizira sa okolišnim promjenama svjetla, zbog osiguranja asimilacije ugljika, dok je istovremeno vodni status održan. Sa ovim pristupom može se premostiti neželjena stimulacija signalizacije endogenog fotoreceptora, jer se koristi isti kvalitet svjetla za pokretanje otvaranja stoma i aktiviranje BLINK1 (**Slika 8.3**). Recentna istraživanja sugeriraju mogućnost šire upotrebe optogenetičkih principa kod biljaka. Kod biljaka se pristupi optogenetike uglavnom istražuju u smislu kontrole membranskog potencijala i transkripcije, a aplikativni domen ovih tehnika se ilustrira kroz hormonsku i svjetlosnu signalizaciju, imuni odgovor, te diferencijaciju i diobu ćelija.



Slika 8.3 Upotreba optogenetičkih alata kod biljaka. A: Potreba biljke za bijelim svjetlom je ograničavajući faktor u optogenetici, jer će svaki introducirani foto-prekidač biti aktiviran ambijentalnim svjetlom. B, C: Dizajn i funkcioniranje PULSE alata za kontrolu genske ekspresije kod biljaka u prisustvu ambijentalnog svjetla, kombiniranjem dva foto-prekidača. Jedan je zasnovan na bakterijskom receptoru plavog svjetla (EL222) i isključuje gensku ekspresiju u uslovima plavog svjetla (*Blue_{off}*), dok drugi aktivira ekspresiju u uslovima crvenog svjetla (*Red_{on}*), a modificiran je iz PHYB. Sistem je aktivan samo u prisustvu monohromatskog crvenog svjetla, a gasi se u svakom drugom slučaju (ambijentalna/bijela svjetlost, plava svjetlost ili u mraku). D: Optogenetička optimizacija biljne fiziologije. Plavo svjetlo aktivira BLINK1, što izaziva ulazak K^+ jona u ćelije pomoćnice stoma. Dolazi do otvaranja stoma i pojačane asimilacije CO_2 , dok je vodni status očuvan, a sveukupni efekat je povećanje biomase. (preuzeto i prilagođeno iz Christie i Zurbriggen, 2020)

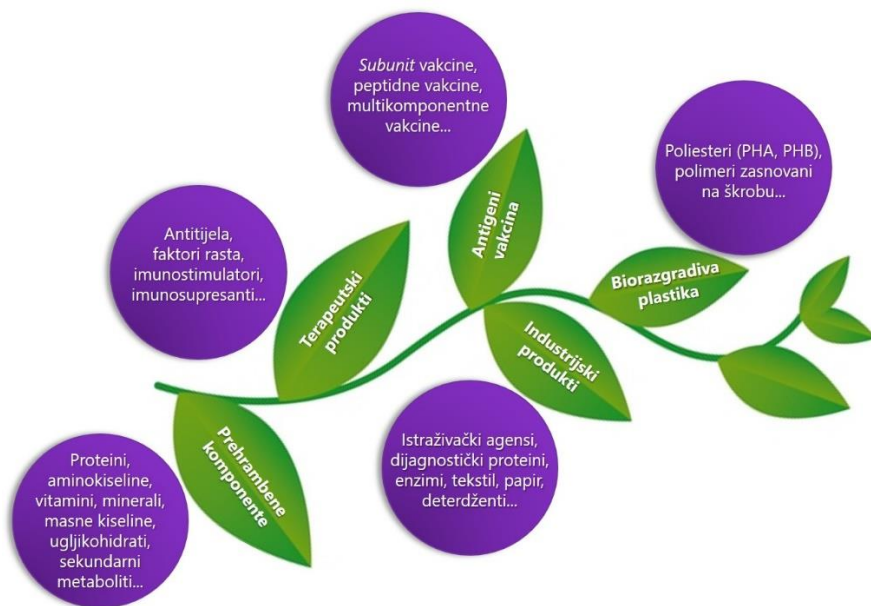
Upotreba biljnih bioreaktora je također aktualna istraživačka tema u okviru sintetske biologije biljaka. Kod ove tehnike, genetički modificirane biljke se koriste kao hemijske fabrike koje proizvode različite visoko vrijedne supstance kao što su sekundarni metaboliti, farmakološki aktivni proteini, enzimi, osobiti ugljikohidrati itd (**Slika 8.4**). Neki od primjera obuhvataju produkciju α -galaktozidaze A, koja se koristi u terapiji Fabryjeve bolesti (poremećaj lizosomalnog deponovanja, tzv. sfingolipidoza, gdje dolazi do nakupljanja glikolipida u tkivima) u kulturi ćelija duhana. Nadalje, kod *Arabidopsis* sp. je produkovan humani intrinzični faktor s ciljem prevladavanja deficita vitamina B12; u endosperm riže je uveden biosintetski put provitamina A itd.

Tehnologije velike propusnosti omogućavaju istraživačima da brzo testiraju efekte različitih genetskih modifikacija na osobine biljaka, što ubrzava provođenje procesa sintetske biologije u biljnim domaćinima. Također, veliki skupovi podataka, računarska biologija i metode mašinskog učenja postaju suštinski alati za predviđanje funkcije gena i optimizaciju sintetičkih bioloških konstrukata. Biljna sintetska biologija obuhvata i generisanje tzv. **genetskih krugova** (eng. *Genetic circuits*), što stoji u neposrednoj vezi sa metaboličkim putevima biosinteze.

Sintetska ekologija biljaka podrazumijeva dizajniranje biljaka koje bi specifično interreagovala jedne sa drugima, odnosno sa svojom okolinom. Tako je, na primjer, moguće konstruirati biljke koje bi ulazile u nove oblike simbioze i druge tipove interakcije sa drugim organizmima, poboljšavajući na taj način funkcije cijelog ekosistema. Svi navedeni alati i koncepti potencijalno omogućavaju prevazilaženje izazova koje nose tradicionalne metode uzgoja biljaka, ali i stvaranje biljaka sa novim odnosno poboljšanim osobinama. Aplikacija takvih pristupa pomaže u osiguranju sigurnosti hrane, održivosti životne sredine, ali i ublažavanju posljedica globalnih klimatskih promjena.

8.2 Sintetska biologija biljnih prirodnih produkata

Biljke proizvode brojne prirodne produkte koji se odlikuju različitim strukturama i bioaktivnim svojstvima, osobito kada su u pitanju sekundarni metaboliti uključeni u biološke i okolišne procese.



Slika 8.4 Biljni bioreaktori se koriste za sintezu brojnih visoko vrijednih spojeva.

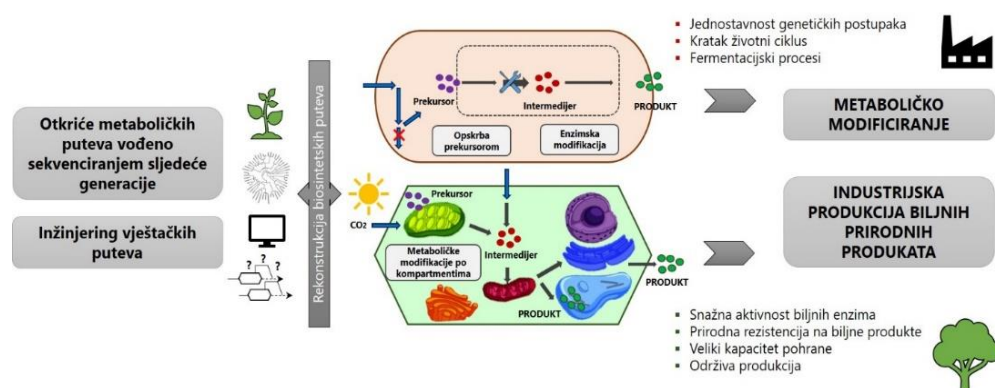
Ovi **biljni prirodni produkti** (eng. *Plant Natural Products*, PNPs) se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, te imaju sveukupno veoma veliku vrijednost u ljudskom društvu. Ipak, tradicionalne metode ekstrakcije, praćene prekomjernom eksploatacijom mogu dovesti do iscrpljivanja biljnih resursa i do svojevrsne okolišne polucije zbog male zastupljenosti prirodnih produkata porijeklom iz biljaka. Nadalje, kompleksna struktura mnogih produkata otežava hemijske sinteze do mjere da su gotovo u potpunosti neučinkovite.

Sa napretkom sintetske biologije strategijama zasnovanim na genomici, proteomici, metabolomici itd., postignut je veliki uspjeh u produkciji biljnih prirodnih produkata u genetički modificiranim domaćinima. Zbog njihove dobro definirane metaboličke pozadine i relativne jednostavnosti genetičke manipulacije, mikrobne stanice kao što su *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Corynebacterium glutamicum* se dosta koriste u navedene svrhe. Standardne strategije mikrobne sinteze podrazumijevaju genetičko modificiranje, odnosno inženjering domaćina, planiranje i rekonstrukciju metaboličkih puteva, reguliranje metaboličkih mreža i na koncu inženjering proteina. Učinkovita produkcija biljnih prirodnih produkata zahtijeva značajne

napore u vještačkom modificiranju mikroba, s obzirom na njihove specifične metaboličke puteve sa veoma striktnim regulatornim mehanizmima. Ipak, rekonstrukcija heterolognih mikroorganizama je gotovo nemoguća kod izuzetno kompleksnih i nejasnih metaboličkih puteva.

U novije vrijeme, postoji sve više navoda o progresu u biosintezi biljnih prirodnih produkata u biljkama. Kompleksni višećelijski eukariotski sistem je postao važna tema u istraživanjima iz domena sintetske biologije. Modificiranje biljnih domaćina na različite načine postalo je komplementarna alternativa za produkciju velike količine kompleksnih prirodnih produkata. U poređenju sa jednoćelijskim mikroorganizmima, biljke predstavljaju bolje sisteme za sintezu PNP, što se može dovesti u vezu sa tri ključna aspekta: visoka ekspresija i aktivnost enzima deriviranih iz biljaka; raznolikost endomembranskih sistema i organela koji pružaju najpodesnije mjesto za odvijanje reakcija; te visoka tolerancija na toksičnost prirodnih biljnih produkata i njihovih intermedijera.

Definiranje ključnih katalitičkih elemenata u biosintetskom putu je osnova za heterolognu produkciju prirodnih produkata. Ipak, do danas je poznat samo dio biosintetskih puteva, ali sa napretkom u tehnologiji sekvenciranja sljedeće generacije (eng. *Next-generation sequencing*, NGS), komputacijskoj biologiji, te sintetskoj biologiji, razvijene su brojne tehnike pretrage gena (eng. *Gene-mining techniques*) (**Slika 8.5**).



Slika 8.5 Biosinteza biljnih prirodnih produkata u mikrobima i biljkama.

8.3 Metabolički putevi biljnih prirodnih produkata i sekvenciranje

Brzi razvoj sekvenciranja čini mogućim rasvjetljavanje genetičke osnove brojnih biljnih vrsta, kao i genskih varijacija na individualnom i populacionom nivou. Ova tehnologija je vremenom postala osnova za pretragu gena i istraživanje biosintetskih mehanizama prirodnih biljnih produkata. Za analizu specifičnih metaboličkih puteva, od velike pomoći je **transkriptom** vrsta. Svakako, pretraga i definiranje gena kandidata koji sudjeluju u sintezi specifičnih prirodnih biljnih produkata među desetinama, stotinama, pa i hiljadama gena je vrlo izazovan proces. Ipak, moguće je identificirati gene kandidate komparativnom analizom uzoraka sa različitom kompozicijom hemokonstituenata u ciljnim metaboličkim putevima, a uzorci mogu biti porijeklom iz različitih biljnih vrsta, kolekcija ili mutanta, te je moguća njihova indukcija određenim stimulusima. Diferencijalna analiza transkriptoma može se raditi na različitim uzorcima kako bi se detektovali geni kandidati i omogućile dalje funkcionalne analize.

Putevi sekundarnih metabolita kod mikroorganizama često egzistiraju na nivou genskih klastera na hromosomima, što je od velike pomoći za analizu biosintetskih puteva metabolita, detekciju bioloških komponenti ili genetičko modificiranje. Recentna istraživanja biljnih genoma detektovala su gene za biosintezu posebnih biljnih sekundarnih metabolita aranžirane u klastere na biljnim hromosomima.

Biljni genski klasteri su sastavljeni od najmanje tri nehomologna gena involvirana u različite hemijske puteve. Danas postoje i brojni kompjuterizirani alati koji su razvijeni s ciljem lakše identifikacije rastućeg broja putativnih biljnih genskih klastera, čime se ubrzava otkriće biosintetskih puteva prirodnih biljnih produkata, ali i dizajn sintetskih klastera u heterolognim domaćinima. Verifikacija metaboličkih puteva zasnovana na izmjeni genske ekspresije podrazumijeva tzv. *knockdown/knockout* gene. **Knockdown** gena je termin koji se odnosi na tehnike zaustavljanja ili smanjenja ekspresije jednog ili više ciljanih gena, dok **knockout** gena predstavlja tehniku genetičkog inženjerstva koja ima za cilj inaktivaciju ili uklanjanje jednog ili više gena iz organizma. Trenutno, glavni pristup za

funkcionalnu verifikaciju ciljnih metaboličkih puteva u izvornim biljkama je inhibiranje funkcije svih ili dijela enzima delecijom gena ili utišavanjem genske ekspresije s ciljem detekcije promjena u sekundarnim metabolitima, što posljedično omogućava identifikaciju funkcije gena kandidata za određeni metabolički put. Sa pojavom CRISPR/Cas9 tehnologije uređivanja genoma olakšana je funkcionalna verifikacija ključnih enzima i regulatornih elemenata. Osim činjenice da je riječ o vrlo moćnoj i versatilnoj tehnici, CRISPR/Cas9 može izvršiti simultani genski *knockout* velikog broja gena, što je u ovom smislu vrlo bitno.

Rekonstrukcija metaboličkih puteva zasnovana na platformama sintetske biologije može biti vrlo praktična. Mikrobi i modelni biljni organizmi se često koriste za rekonstrukciju puteva brojnih važnih prirodnih produkata biljaka. Mikroorganizmi kao što su *E. coli* i *S. cerevisiae* imaju veliku biosintetsku aktivnost i u ovom smislu su detaljno izučavani. Međutim, ekspresija enzima u mikrobnim sistemima često predstavlja problem kod post-translacijskih modifikacija i zahtijeva višestruko genetičko modificiranje. Genetički elementi kod biljaka, kao što je citohrom P450 su neučinkoviti kada se transferiraju u heterogene mikroorganizme. Stoga, postalo je izuzetno važno identificirati ključne enzime i determinirati slijed reakcije korištenjem biljnih domaćina. Neki od najpoznatijih primjera biosinteze biljnih prirodnih produkata posredstvom modificirane biosinteze u biljnim ćelijama predstavljeni su u **Tabeli 8.1.**

8.4 Sinteza biljnih prirodnih produkata u biljnim stanicama i genetičke modifikacije

Putevi sekundarnih metabolita biljaka su kompleksni i mogu biti linearni, ciklični ili aranžirani u trodimenzionalne mreže sa brojnim elementima. Zbog brojnih otežavajućih okolnosti u korištenju mikroba u produkciji aktivnih materija, sve više istraživanja je usmjereno na **metaboličke izmjene biljaka**, ponajviše zato što svi integralni ili barem parcijalni elementi biosintetskih puteva brojnih ciljanih prirodnih biljnih produkata u njima već postoje. Kao što je poznato, biljke posjeduju tri glavna genetička sistema: nuklearni, plastidni i mitohondrijalni, a transformacija s ciljem usmjerene biosinteze ciljnih produkata se uglavnom odnosi na nuklearni i plastidni genom.

Tabela 8.1 Primjeri biljnih prirodnih produkata sintetiziranih u biljnim domaćinima metodama genetičke modifikacije.

Biljni domaćin za transformaciju	Sintetizirani sekundarni metaboliti
<i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp.	Artemisinin Pačulol/santalen Diterpeni Sklareol Taksadien Taksol
<i>Taxus</i> sp.	Delfinidin
<i>Rosa</i> × <i>hybrida</i>	Pterostilben
<i>Vitis vinifera</i> L.	Piceatanol Resveratrol Dihidrokvercetin
<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge	Astragalozyd
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Izoflavon
<i>Pelargonium sidoides</i> DC.	Kumarin Fenolske komponente
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	Triterpenoidi
<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.	Ginsenozyd
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Taksadien Antocijanin
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Izoprenoidi Geraniol Limonen Artemisinin Artemisininska kiselina Seskviterpenoidi Damarenediol-II Protopanaksatriol/protopanaksadiol Skvalen Antocijanin
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Cijanidin-3-O-rutinozyd Taksadien/taksadien-5-ol Diosgenin Triterpen Katarantin/tabersonin Etopozid aglikon N-formildemekolcin Striktozyd Durin
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	β-karoten Gama-aminobuterna kiselina

	Provitamin A
	Antocijanin
	Fenilpropanoidni flavonoidni derivati
	Delfinidin
	Petunidin
	Flavonoidi
	Flavonoli
	Vitamin E
<i>Lycium ruthenicum</i> Murray/L.	Antocijanin
<i>barbarum</i> L.	
<i>Hyosciamus</i> sp.	Tropan alkaloidi
<i>Atropa belladonna</i> L.	Hiosciamin
	Tropan alkaloidi
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Vanilin
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Karoteonidi
<i>Mentha</i> × <i>piperita</i>	Limonen
	Ulje mente
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Tanšinon
<i>Scutellaria bornmuelleri</i> Hausskn.	Hrisin
ex Bornm.	Vogonin
	Baikalein
<i>Artemisia annua</i> L.	Artemisinin
<i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i>	Delfinidin
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Silimarin
<i>Lactuca sativa</i> L.	Vitamin E
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G.Don.	Vinkristin
	Vinblastin
<i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino/	Berberin
<i>Thalictrum minus</i> L.	
<i>Oryza</i> sp.	β-karoten
	Ksantaksantin
	Astaksantin
	Antocijanin
<i>Zea mays</i> L.	β-karoten
	Karoteonidi
	Vitamini

U domeni genetičkih modifikacija nuklearnog genoma s ciljem biosinteze biljnih prirodnih produkata uglavnom se spominju multipla genska kotransformacija (s ciljem rekonstrukcije metaboličkih puteva), kombinatorna transformacija (za skrining transgenih biljaka sa visokim prinosom), te prolazna genska ekspresija (za brzu produkciju ciljnih supstanci).

Integrisanje multiplih transgena u nuklearni genom biljke i osiguranje stabilne ekspresije tih gena u budućim generacijama je oduvijek bilo u fokusu sintetske biologije. Na primjer, kroz *Agrobacterium*-posredovanu multigensku kotransformaciju, uspješno je izvršena introdukcija kompletnog biosintetskog puta β -karotena u endosperm riže. U subsekventnim studijama, pojavile su se kantaksantinska i astaksantinska riža. I kantaksantin i astaksantin su vrlo vrijedne bioaktivne molekule koje se rijetko produciraju u višim biljkama, ali se na ovaj način mogu u njih introducirati. Kao modelni organizam, biljka duhana je dosta korištena u istraživanjima sintetske biologije. Heterologna sinteza artemisinina kod vrste *Nicotiana tabacum* postignuta je kotransformacijom nekoliko artemisinin sintaza i posebnih enzima, čime su se povećale zalihe prekursora i prinosi artemisinina. Nadalje, *Nicotiana benthamiana* može biti podesna platforma za produkciju visokovrijednih diterpenoida. Sinteza biljnih sekundarnih metabolita je usko povezana sa regulacijom endogenih transkripcijskih faktora.

Postoji mnogo načina za povećanje nivoa biljnih sekundarnih metabolita aktiviranjem ekspresije gena za sintazu. Tako je, na primjer, **pojačanjem ekspresije** specifičnih gena porijeklom iz vrste *Anthriscum majus* postignuta stabilna produkcija antocijanina kod *N. tabacum*. Osim duhana, i druge biljke su se pokazale kao adekvatni domaćini. Zbog svog kratkog životnog ciklusa, male veličine genoma i učinkovite homologne rekombinacije, vrsta *Physcomitrella patens* se pokazala kao dobar modelni organizam. Ova vrsta je ranije izučavana u kontekstu sinteze taksadiena deriviranih iz predstavnika roda *Taxus*, a zbog svoje prirodne tolerancije na terpenoide i jednostavnog metaboličkog profila endogenih terpenoida, *P. patens* je postala široko korištena za ekspresiju gena za biosintezu terpenoida i rekonstrukciju metaboličkih puteva. Kao što je već naglašeno, CRISPR/Cas9 sistem je veoma moćan alat za metabolički inženjering biljaka. Primjeri koji to ilustriraju su recimo akumulacija sadržaja antocijanina kod paradajza, kao i deletiranje autoinhibitorne domene enzima glutamat dekarboksilaze koji igra ključnu ulogu u sintezi gama-aminobuterne kiseline (moguće je povećanje prinosa produkta do 15 puta). **Multiple gensko uređivanje** je korišteno i kod metaboličkog modificiranja sadržaja izoflavona kod soje i to tako da je simultanim targetiranjem tri gena postignuta trostruka mutacija visoke

efikasnosti. Još jedan od primjera nalazi se kod osobitih linija vrste *Atropa belladonna* sa velikim prinosom hiosciamina, a bez anizodamina i skopolamina, usljed CRISPR/Cas9 posredovane disrupcije hiosciamin-6 β -hidroksilaze.

Kombinatorna transformacija neizostavno podrazumijeva rasvjetljavanje i rekonstrukciju sve većeg broja opisanih metaboličkih puteva velike kompleksnosti. Ipak, zbog najčešće dugotrajnih i zahtjevnih ciklusa tradicionalne transformacije, to može biti izazovno. Jedan od potencijalnih načina prevazilaženja navedenog problema ilustriran je kroz proces kombinatorne nuklearne transformacije na primjeru biosintetskog puta karotenoida, gdje je konačni cilj produkcija višestruko transgenih biljaka u kratkom vremenu. Ovaj postupak je zapravo multifunkcionalne prirode i može se koristiti za modificiranje metaboličkih puteva, te za kontrolu drugih biohemijskih, fizioloških ili razvojnih procesa. Do sada je ostvareno mnogo transformacija s ciljem kreiranja kombinatornih biblioteka transformanata, pri čemu svaki od njih posjeduje različitu kombinaciju transgena sa varirajućim brojem kopija i genomskih aranžmana, što nadalje rezultira različitim nivoima ekspresije. Za sada se čini da praktično ne postoji ograničenje broja transgena koju se mogu unijeti u biljku u jednoj transformaciji, što čini ovaj metod vrlo moćnom formom kotransformacije. Stabilna transformacija sa dobrom reproducibilnosti ima potencijal produkcije na široj skali, ali ne treba zaboraviti činjenicu da su transgene biljke najčešće druga generacija, pa je njihov nastanak veoma zahtjevan.

Metode prolazne genske ekspresije se mogu koristiti za ekspresiju rekombinantnih proteina u serijama unutar nekoliko dana, a potom za kotransfer gena kandidata u biljke s ciljem rapidne produkcije ciljnih komponenti. Brojni ekspresijski sistemi ovog tipa su zasnovani na biljnim virusima, gdje visok nivo ekspresije rekombinantnog proteina zavisi od brze replikacije i transmisije virusa u biljci domaćinu. Dosadašnja istraživanja u ovom polju ilustriraju mogućnost produkcije visoko kvalitetnih biljnih prirodnih produkata, s posebnim akcentom na brzu kombinatornu transformaciju za sintezu novih PNP derivata, što opet stoji u direktnoj vezi sa otkrićem novih lijekova.

8.5 Genetičko modificiranje plastida

Plastidni genetički inženjering je dosta zanimljiv zbog snažne ekspresije gena u plastidima, tačnosti homolognih rekombinacija i obrazaca slaganja gena u operone. Nadalje, na ovaj način se mogu izbjeći izvjesni bezbjedonosni problemi za okoliš, koji su povezani sa transmisijom polena, jer se kod većine skrivenosjemenjača plastidi nasljeđuju po majčinskoj liniji. Ipak, konvencionalna transformacija hloroplasta je uglavnom ograničena na porodicu Solanaceae, s tim da postoje navodi i o učinkovitoj plastidnoj transformaciji na *Arabidopsis* modelu. Nove metode plastidne transformacije korištenjem nanočestica ubrzavaju razvoj tehnologije i njenu primjenu kod brojnih vrsta biljaka. Za biljke koje ne mogu biti podvrgnute procesu hloroplastne transformacije, postoje drugi načini sticanja stranih hloroplastnih gena, a oni stoje u vezi sa posebnim načinima horizontalnog genskog transfera. S obzirom da postoje brojne kopije hloroplastnog genoma u svakoj ćeliji, veći nivo akumulacije proteina se može postići posredstvom transgena umetnutih u hloroplastni genom (u poređenju sa nuklearnim genomom), a operonski obrasci hloroplastnih gena olakšavaju regulaciju ekspresije transgena. Metileritrol fosfatni put biosinteze je unikatan za biljke i odvija se u hloroplastima. Stoga je transformacija hloroplasta najčešće korištena s ciljem povećanja produkcije izoprenoidnih komponenti. Insercijom cijelog mevalonatnog puta u hloroplastni genom biljke *N. tabacum* dolazi do veće akumulacije mevalonata, karotenoida, skvalena, sterola i triacilglicerola. Štaviše, preusmjeravanje reakcije u plastide uvijek vodi poboljšanju produkcije. Jedan od dobrih promjera koji to potvrđuje je opisan kod duhana gdje je targetiranjem seskviterpenoid sintaze postignut oko 40.000 puta veći prinos.

8.6 Hloroplastna i nuklearna transformacija

U prirodnim uslovima, biljni prirodni produkti se sintetiziraju u različitim dijelovima biljne ćelije, a enzimi katalitičkih reakcija su locirani na različitim organelama, smanjujući na taj način toksične efekte intermedijera. Strategija kombiniranja nuklearne i hloroplastne transformacije s ciljem izmjene orijentacije različitih reakcija u metaboličkim putevima često daje dobre rezultate. Na primjer, artemisinin je uspješno sintetiziran u biljci duhana s

povećanim prinosom modificiranjem mevalonatnog puta i usmjeravanjem biosinteze artemisinina na tri različita dijela ćelije. Iako postoji dosta studija na temu mehanizama genske ekspresije u kloroplastima, relativno malo se zna o drugim tipovima plastida. Skorija istraživanja sugeriraju da bi tehnologije transformacije u ne-zelenim plastidima mogle ubrzati razvoj biljnih prirodnih produkata kod različitih jestivih biljaka, te potencijalno riješiti probleme povezane se akumulacijom toksičnih nusprodukata.

Sekundarni metaboliti biljaka oduvijek predstavljaju važan izvor lijekova. Zbog ograničenja resursa, potrebno je utvrditi održive puteve opskrbe izvorima sekundarnih metabolita. Iako broj poznatih prirodnih produkata prevazilazi 500.000, biosintetski putevi većine prirodnih produkata nisu identificirani. Stoga, analiza i biosinteza komponenti droga ima veoma veliki značaj. Do danas su uspješno implementirane određene ćelije-fabrike biljnih prirodnih produkata, te su čak dostigle industrijski nivo. Tako je na primjer mikroba produkcija artemisinina, resveratrola, likopena i astaksantina uspješno komercijalizirana. S druge strane, mikroba produkcija nekih specifičnih biljnih prirodnih produkata je još uvijek otežana zbog kompleksnosti metaboličkih puteva, niske aktivnosti enzima deriviranih iz biljaka u mikrobnom domaćinu, te toksičnosti produkata. Korištenje biljaka za sintezu vrijednih produkata ima osobite prednosti. U tom smislu, najvažniji postulati su povezani sa snažnijom ekspresijom biljnih enzima u biljkama kao domaćinima, zatim sa toksičnim djelovanjem nekih komponenti (na primjer alkaloida i fenola) na mikroorganizme, kao sa i kompleksnim organelama i membranskim strukturama biljaka koje omogućavaju specifičan i detaljan umjetni dizajn. U konačnici, biljke sintetiziraju različite tipove vrijednih produkata kroz fotosintezu bez potrebe za suplementacijom, što ima prednosti sa strane ekonomske isplativosti i održivosti.

8.7 Fitogena sinteza nanočestica

Nanotehnologija se pojavila kao tekovina dotadašnje nauke, u 21. stoljeću, a u meritumu svojih studija obuhvata sintezu, upravljanje i primjenu materijala čija je veličina manja od 100 nm. **Nanočestice** imaju značajnu primjenu u različitim sektorima društva kao što su okoliš, poljoprivreda, hrana, biotehnologija, biomedicina, lijekovi itd. Prepoznata je njihova uloga u

prečišćavanju otpadnih voda i monitoringu okoliša, a koriste se i kao funkcionalni dodaci hrani, te kao antimikrobna sredstva. Najvažnija svojstva nanočestica su vezana za samu njihovu prirodu, bioraspoloživost i biokompatibilnost, zbog čega se odlikuju izvrsnim antiinflamatornim, antimikrobnim, antitumorskim i bioaspsorptivnim potencijalom. Generalno, čestice čiji je promjer od jednog do 100 nm zovu se nanočestice ili ultrafine čestice. Nanočestice se mogu kategorizirati na osnovu njihovog oblika, veličine i hemijskih karakteristika, te se razlikuju ugljikove, metalne, keramičke, lipidne, semikonduktorske i polimerne nanočestice. Metalne nanočestice su napravljene isključivo od metalnih prekursora, a među najpoznatijima su srebrene, zink-oksidne, bakarne, zlatne, aluminijumske i željezne. Postoje tri glavne metode sinteze nanočestica, prepoznate kao fizička, hemijska i biološka sinteza. Fizički pristup je onaj koji u logičkom smislu ide odozgo prema dole (eng. *Top-down approach*), dok su hemijske i biološke tehnike nazvane kao *bottom-up* pristupi, odnosno oni koju su usmjereni odozdo prema gore. **Biološka metoda sinteze** se označava i kao zelena sinteza nanočestica i može se odvijati posredstvom biljaka, mikroorganizama (alge, bakterije, fungi, aktinomicete) ili biomimetički (posredstvom proteina, ćelija, polena i enzima).

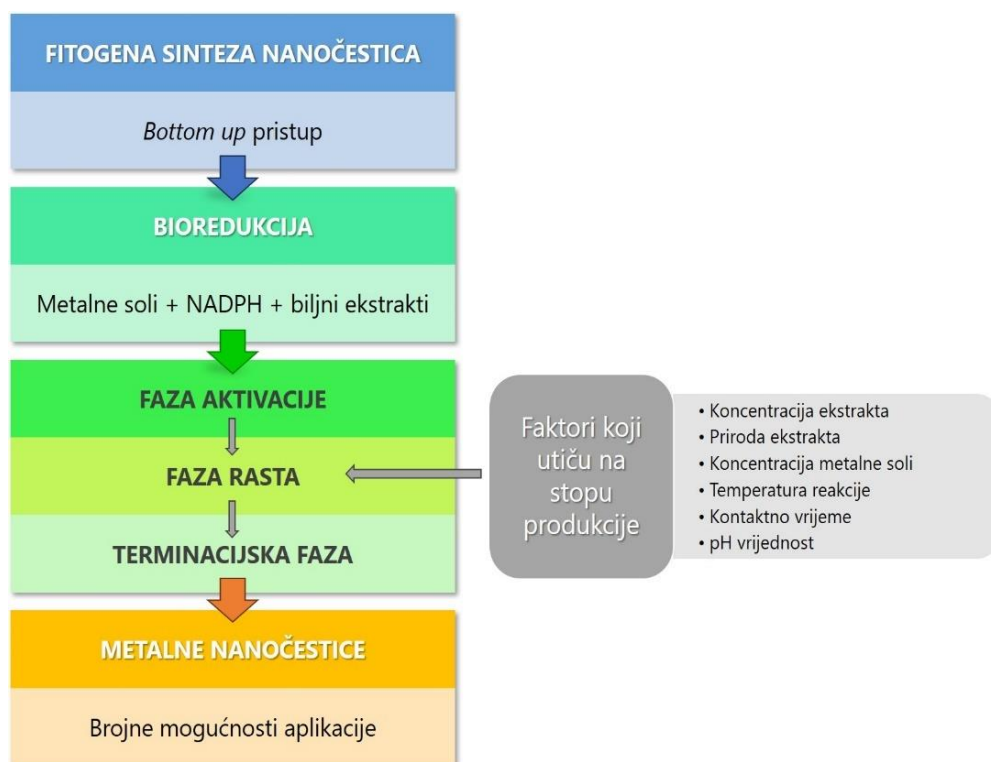
8.7.1 Metode zelene sinteze

Metode takozvane **zelene sinteze** predstavljaju ekološki prihvatljiv način sinteze nanočestica/nanostruktura sa poboljšanjem učinkovitosti, a s ciljem aplikacije u biomedicini. Osnovni atributi biogene sinteze nanočestica su biokompatibilnost i smanjena/eliminirana toksičnost. Ovakve tehnologije također podrazumijevaju korištenje manje energije za pokretanje samih reakcija, čime se smanjuju i troškovi proizvodnje. Sinteza fitogenih nanočestica, odnosno sinteza posredstvom biljaka, ima brojne prednosti u poređenju sa upotrebom drugih mikro- ili makroentiteta, najprije zbog jednostavnosti i pogodnosti koje dovode do produkcije nanostruktura u većem obimu. Sposobnost biljaka da akumuliraju teške metale je odavno poznat fenomen, a u posljednje tri decenije brojna istraživanja su usmjerena na upotrebu biljnih ekstrakata za proces redukcije metalnih jona. Ovakve studije neizostavno tretiraju različite biljne dijelove i kalkuliraju njihove odlike

u kontekstu povećanja produkcije novih nanostruktura. Kada je u pitanju fitogeni način sinteze, u fokusu je produkcija srebrenih i zlatnih nanočestica. **Fitogeni sintetski proces** omogućava hemijskim konstituentima biljaka da ispoljavaju sinergističku aktivnost, odnosno da djeluju kao redukcijski ali i stabilizirajući agensi. Nanočestice se mogu sintetizirati kroz *ex vivo* i *in vivo* procese. *Ex vivo* način fitogene sinteze nanočestica se odvija kroz korištenje biljnih ekstrakata deriviranih iz različitih biljnih dijelova, dok *in vivo* sinteza podrazumijeva uvođenje biljke u medij obogaćen metalima. Različite biljke kao što su *Ocimum sanctum* L., *Azadirachta indica* A.Juss., *Acalypha indica* L., *Citrus × limon*, *Helianthus annuus* L., te *Hibiscus × rosa-sinensis* se koriste u redukciji kod sinteze metalnih nanočestica i nanočestica metalnih oksida. Produkcija nije ograničena samo na listove i cvjetove, već se mogu koristiti i drugi biljni dijelovi kao što su sjeme i grančice. Na primjer, srebrene nanočestice se uspješno proizvode iz ekstrakta sjemenki grožđa i koriste za kataliziranje hemijskih reakcija.

Fitogene nanočestice se ekstenzivno koriste u zdravstvu, kao i u okolišnim procesima remedijacije. U zdravstvenom sistemu, fitogene nanočestice se koriste kao antimikrobni agensi, zatim kod dentalnih implanta, u terapiji kancera, procesu zacjeljivanja rana, u sistemima za administraciju lijekova, te kao biosenzori. Kada su u pitanju ekološki procesi remedijacije, fitogeni nanomaterijali se koriste kao katalitički agensi, čestice koje ulaze u interakciju sa teškim metalima, te za procese degradacije boja. Sinteza nanočestica posredovana biljkama predstavlja biološki metod za sintezu nanočestica korištenjem biljnih ekstrakata. U kratkom periodu, dolazi do sinteze nanočestica sa biljnim ekstraktom, uz proces miješanja sa otopinom metala kao što su zlato i srebro ili neki drugi tipovi metalnih soli. Mehanizam sinteze uključuju tri faze: aktivaciju, rast i terminaciju. Redukcija metalnih jona i nukleacija atoma metala se odvija u fazi aktivacije, za čim slijedi faza rasta kada dolazi do spajanja manjih nanočestica u veće, te u konačnici dolazi do terminacije koja rezultira željenim nanočesticama. Faza koja se odvija nakon procesa bioredukcije još nosi naziv nukleacijska faza (**Slika 8.6**). Odlike, stopa produkcije i kvantitet fitogenih nanočestica su pod uticajem faktora kao što su priroda i koncentracija biljnog ekstrakta, koncentracija metalnih soli, temperatura, kontaktno vrijeme i pH vrijednost. Fitogene nanočestice

obuhvataju različite metale i njihove okside, kao što su srebro, zlato, paladijum, indijum oksid, željezo, željezni oksid, bakar, bakarni oksid, cink oksid, titanijum dioksid, magnetit, platina, mangan oksid itd., a veličina i oblik značajno variraju u odnosu na biljku koja je uključena u proces sinteze. Karakterizacija nanočestica se vrši na osnovu oblika, disperziteta, veličine i površine. Često korištene tehnike karakterizacije su transmisijska i skenirajuća elektronska mikroskopija, difrakcija X zrakama, UV-Vis spektrofotometrija itd.



Slika 8.6 Osnovni koraci u sintezi nanočestica posredovanoj biljkama.

U dosadašnjim istraživanjima, nanočestice bakarnog oksida i željeza su sintetizirane korištenjem ekstrakata biljaka kao što su: *Azadirachta indica* L., *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Myrica gale* L., *Catharanthus roseus* (L.) G.Don., *Acalypha fruticosa* Forssk., *Capsicum annuum* L., *Beta vulgaris* L., *Datura metel* L., *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob., *Euphorbia heterophylla* L., *Jatropha curcas* L., *Swietenia mahogany* (L.) Jacq., *Magnolia* sp., *Myristica fragrans* Houtt., te *Sorghum* sp.. Također, iz ekstrakata biljaka kao što su na primjer: *A. vera*, *Allium sativum* L., *A. indica*, *Boswellia ovalifoliolata* N.P.Balakr.

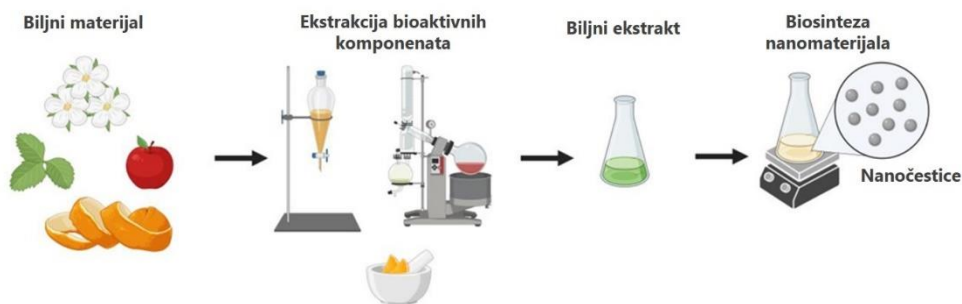
& A.N.Henry, *Citrus × limon*, *Coleus amboinicus* Lour., *Calotropis procera* (Aiton). W.T.Aiton, *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl., *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees, *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Citrus × sinensis*, *Citrus reticulata* Blanco, *Carica papaya* L., *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Chenopodium album* L., *Curcuma longa* L., *Dioscorea batatas* Decne., *Eclipta prostrata* (L.) L., *Eucalyptus* sp., *Gomphrena globosa* L., *Memecylon edule* Roxb., *Musa × paradisiaca*, te *Solanum torvum* Sw. sintetizirane su srebrene nanočestice. Neke od biljaka čiji su ekstrakti poslužili za fitogenu sintezu zlatnih nanočestica su: *Terminalia chebula* Retz., *Tasmannia lanceolata* (Poir.) A.C.Sm., *Vitex negundo* L., *Sesbania drummondii* (Rydb.) Cory, *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, *Rosa rugosa* Thunb., *Psidium guajava* L., *Hygrophila spinosa* T. Anderson, *Cassia fistula* L., *Coriandrum sativum* L., *Allium cepa* L. itd. Biljne vrste *Anacardium occidentale* L., *Berberis vulgaris* L., *Catharanthus roseus* (L.) G.Don, *Piper betle* L., *Solanum trilobatum* L., *Annona squamosa* L., te *Glycine max* (L.) Merr. su primjeri biljaka korištenih u ekstrakciji paladijumskih nanočestica.

8.7.2 Primjena fitogenih nanočestica

Biljke i njihovi derivati su još od antičkih vremena prepoznati kao izuzetno važni za cjelokupno čovječanstvo. Brojne biljne vrste posjeduju značajan **bioaktivni potencijal** što se kontinuirano potvrđuje studijama iz oblasti fitofarmakologije. Većina bioaktivnih molekula u biljkama su sekundarni metaboliti, uključeni u procese kao što su odbrana od patogena i polinacija. Među glavnim fitokonstituentima sa farmakološkom aktivnošću prepoznati su alkaloidi, flavonoidi, tanini, saponini i terpeni. Upotreba ljekovitih biljaka počiva na tradicionalnim znanjima koja je neophodno naučno validirati. Postoje brojni pristupi u pripremi i aplikaciji biljnog materijala, a metodologija pripreme svakog od pripravaka je indicirana ekstrakcijom ciljane grupe molekula, za koje je neophodno evaluirati fizičko-hemijske parametre. Sinergija nanotehnologije i biotehnologije, kao i bionanotehnologije pojavila se kao učinkovita alternativa za različite primjene u kontekstu održivog razvoja. Priroda, kroz opskrbu biljnim resursima pomaže nanotehnologiji kroz biološke funkcije koje favoriziraju interakciju između nanostruktura i medija za njihovu disperziju.

Stoga je bionanotehnologija svojevrsna „čista“ i kolokvijalno rečeno **eco-friendly** opcija u rješavanju brojnih pitanja, kao što je razvoj potencijalnih antimikrobnih agenasa, kroz interakciju medija za disperziju i nanostruktura, ali i unutar okolišnog sektora kada se implementiraju tehnike remedijacije i obnavljanja.

Bionanotehnologija integrira benefite biljnih ekstrakata sa velikom snagom nanostruktura. U tom smislu, biljni ekstrakt sa ljekovitim odlikama i velikim antioksidativnim potencijalom pruža odličan medij za disperziju, u kojem bi se stabilizirale nanočestice, a u konačnici olakšava njihovo pristizanje do preciziranih meta (**Slika 8.7**). Tako, ako biljni ekstrakt posjeduje antimikrobni potencijal, a kombinira se sa nanočesticama, dolazi do ostvarivanja sinergijskog efekta između ovih komponenti. Pri tome se uočava i smanjena toksičnost. Ovo se dešava najprije zbog redukcije u upotrebi prekursora i činjenice da je nanosistem održiv kroz kombiniranje nanostruktura i odabranih ekstrakata. Različiti biljni produkti posjeduju drugačiji kapacitet ekstrakcije i može se govoriti o brojnim metodama njihove karakterizacije. Takvi biljni produkti imaju različit potencijal za sintezu nanomaterijala.



Slika 8.7 Biosinteza nanomaterijala sa bioaktivnim odlikama iz različitih biljnih dijelova. (preuzeto i prilagođeno iz Antunes Filho i sar., 2023)

Kao što je navedeno, nanočestice derivirane uz pomoć biljaka tehnikama zelene sinteze nalaze široku primjenu u različitim elementima ljudskog djelovanja. Jedan od najvažnijih aspekata njihove aplikacije povezan je sa biološkom aktivnošću. Kada je u pitanju **antioksidativna aktivnost** u terminima fitogene sinteze nanočestica, najveći broj istraživanja je usmjeren na zamjenu supstanci kao što su jake baze i stabilizatori, ekstraktima biljaka koje posjeduju antioksidativni kapacitet i koje imaju mogućnost

transformacije metalnih soli u metalne okside ili metalne nanočestice. U tom smislu je prepoznata važnost polifenola, vitamina i enzima, koji osim navedenog, mogu prevenirati agregiranje nanočestica.

Antibiotska rezistencija koja je rastući globalni zdravstveni problem usmjerava nova istraživanja ka identifikaciji antimikrobnih lijekova prirodnog porijekla. Zbog velikog diverziteta molekula koje proizvode, brojni biljni ekstrakti posjeduju baktericidni i bakteriostatski potencijal. Nanomaterijali ispoljavaju različite mehanizme antimikrobnog djelovanja. Metalne nanočestice oštećuju proteine, inhibiraju sintezu ćelijskog zida bakterija, uzrokuju disrupciju bakterijske plazma membrane, oštećenja DNK, generiraju reaktivne oksigenske vrste i preveniraju formiranje bakterijskih biofilmova. Nanočestice od različitih materijala posjeduju različite mehanizme antimikrobnog djelovanja. Tako na primjer, nanočestice niklovog oksida promjera 2-16 nm se mogu sintetizirati korištenjem ekstrakta lista biljke *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a njihova antibakterijska aktivnost je dokazana protiv *Streptococcus mutans*. Fitogena sinteza srebrenih nanočestica veličine 15-20 nm sa kubičnom kristalnom strukturom, iz vodenog ekstrakta rizoma biljke *Coptis chinensis* Franch. uz modifikacije površine nanomaterijala sa hitozanskim biopolimerom navodi ovaj antibakterijski nanosistem protiv *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Sličan efekt je zabilježen kod srebrenih nanočestica sintetiziranih iz lista *Ocimum gratissimum* L. protiv *E. coli* i *Staphylococcus aureus*. Cink-oksidne nanočestice sintetizirane korištenjem ekstrakta biljke *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants veličine 5-30 nm također posjeduju antibakterijsku aktivnost. Nanočestice bakarnog oksida sintetizirane uz vrstu *Guilandina bonduc* L. posjeduju antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus* i *Aeromonas* sp. Novi pristupi fitofabrikacije nanočestica sa antibakterijskim odlikama razvijeni su korištenjem prirodnih flavonoida kao što su kvercetin pentaosfid, kvercetin sulfonska kiselina i apigenin trifosfat sa srebrenim nanočesticama, a njihova aktivnost je dokazana na *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli* i *Citrobacter freundii*. Također, korištenjem selena i ekstrakta ploda *Emblica officinalis* Gaertn. sa visokim antioksidacijskim kapacitetom observirana je učinkovitost na brojne patogene kao što su *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium*

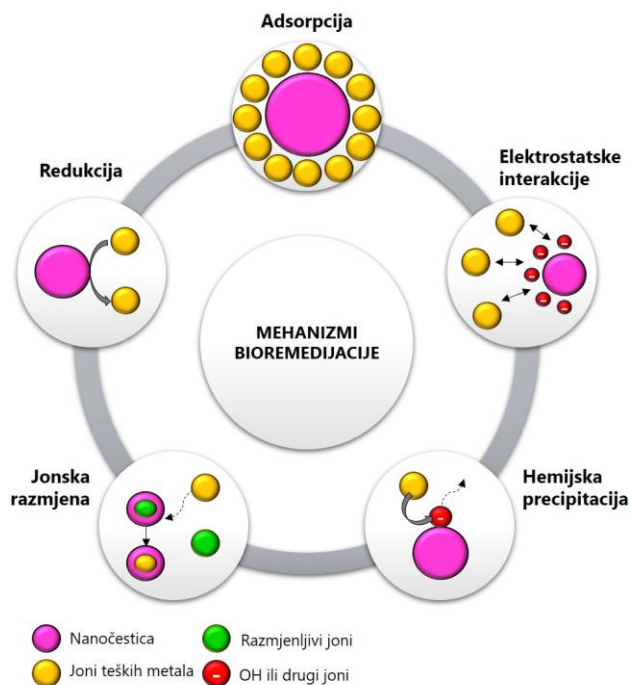
anthophilum i *Rhizopus* sp. Sinergizam između antimikrobnog biljnog ekstrakta i metalnih nanočestica sintetiziranih u ovom disperznom mediju povećava baktericidne i bakteriostatske efekte, što se potencijalno može primijeniti i na sinergiju sa antibioticima, osobito kada su u pitanju multirezistentni mikroorganizmi. Određene fitogene nanočestice pokazuju i antivirusno djelovanje, kao što je to slučaj kod Newcastle disease virusa.

Poznato je da je **kancer** jedan od vodećih uzroka smrti širom svijeta, pa u tom smislu korištenje kombinacije ljekovitih biljaka sa nanomaterijalima potencijalno otvara nove ideje i puteve liječenja. Jedan od ohrabrujućih primjera koji to potvrđuje je dokazana **citotoksična aktivnost** na humani adenokarcinom kolona i humani adenokarcinom pluća, postignuta upotrebom vodenog ekstrakta biljke *Deverra tortuosa* (Desf.) DC., koji je poslužio u sintezi nanočestica cink oksida. Inače je u pitanju grmolika biljka nativna za arapsku ekoregiju, a koja se od davnina koristi u tradicionalnoj medicini kao analgetik, diuretik, te protiv stomačnih tegoba i dijabetesa. Savremene studije su dokazale brojne bioaktivne fitokonstituente u ovoj biljci.

Fitogene nanočestice posjeduju i **antilarvalni kapacitet**, što je osobito važno u suzbijanju insekata vektora brojnih bolesti. U prvom redu se misli na komarce, koji su vektori brojnih emergentnih i reemergentnih virusa, a čiji areal je značajno izmijenjen usljed antropogenih pritisaka u pogledu destrukcije i konverzije staništa. Nadalje, zelene nanočestice se mogu primijeniti i u **zaštiti usjeva**, koji su vrlo često pogođeni različitim nametnicima. Tako je ekstrakt nanočestica dobijen iz biljke *Crocus sativus* L. uspješan u suzbijanju gljivice *Verticillium dahliae*, dok je korištenjem ploda limuna i nanočestica titanij oksida postignuta inhibicija bakterije *Dickeya dadantii*.

Važna primjena fitogenih nanomaterijala je u **zaštiti okoliša**. Okoliš koji je čist i lišen polutanata je praktično imperativ u održivom životu svih bioloških sistema. Nanočestice dervirane zelenom sintezom iz biljaka se koriste u gotovo svakom akcionom planu zaštite okoliša, počevši od jednostavne bioremedijacije i degradacije boja, pa sve do uklanjanja metala i organskih polutanata iz otpadnih voda. **Bioremedijacija** metalnih jona počiva na mogućnosti biljaka da akumuliraju jone metala. Brojne fitogene nanočestice

su producirane korištenjem metala, na primjer željezne nanočestice iz vrste *Eucaliptus globulus* Labill. koje imaju sposobnost adsorpcije hroma. Nadalje, toksične boje prisutne u industrijskom efluentu mogu izazvati poluciju vodenih tijela, a većina toksičnih boja su identificirane i kao kancerogeni agensi. Iz navedenih razloga je vrlo važno da studije sugeriraju mogućnost remedijacije takvih polutanata, kao što je dokazano na primjeru eliminacije metilensko plave uz pomoć nanočestica željeznog oksida produkovanih iz ekstrakta lista *Hibiscus* sp. Fitogene nanočestice se mogu koristiti i u **tretmanu otpadnih voda**, gdje većina interakcija uključuje elektrostatsko privlačenje metalnih jona, pa dolazi do uklanjanja teških metala, pigmenata, pesticida i različitih organskih polutanata. Adsorptivno uklanjanje organskih polutanata uključuje remedijaciju fosfora, amonijuma, te drugih jona, a mehanizmi remedijacije podrazumijevaju hemisorpciju, elektrostatsko uklanjanje i hemijsku difuziju (**Slika 8.8**). Kao što je vidljivo, fitogene nanočestice imaju vrlo veliku aplikativnu vrijednost, a pored navedenog može se istaći da se koriste i u **kulturi biljnih tkiva**, te kao **biosenzori**.



Slika 8.8 Mehanizmi bioremedijacije teških metala posredstvom fitogenih nanočestica.

LITERATURA

- Aljoundi, A., Bjjj, I., El Rashedy, A., & Soliman, M. E. (2020). Covalent versus non-covalent enzyme inhibition: Which route should we take? A justification of the good and bad from molecular modelling perspective. *The Protein Journal*, 1-9.
- Altammar, K. A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1155622.
- Antunes Filho, S., Dos Santos, M. S., Dos Santos, O. A. L., Backx, B. P., Soran, M. L., Opriş, O., Lung, I., Stegarescu, A., & Bououdina, M. (2023). Biosynthesis of Nanoparticles Using Plant Extracts and Essential Oils. *Molecules*, 28(7), 3060.
- Bajrović, K., Jevrić-Čaušević, A., & Hadžiselimović, R. (2005). *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju*. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju.
- Barnum, C. R., Endelman, B. J., & Shih, P. M. (2021). Utilizing Plant Synthetic Biology to Improve Human Health and Wellness. *Frontiers in Plant Science*, 12, 691462.
- Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022). Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*, 73(1), 58-69.
- Benkovic, S. J., Valentine, A. M., & Salinas, F. (2001). Replisome-mediated DNA replication. *Annual review of biochemistry*, 70, 181-208.
- Berry, M., Fielding, B., & Gamielien, J. (2015). Practical considerations in virtual screening and molecular docking. *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology*, 21(1), 487-502.
- Bhushan, D., Shoran, S., Kumar, R., & Gupta, R. (2024). Plant biomass-based nanoparticles for remediation of contaminants from water ecosystems: Recent trends, challenges, and future perspectives. *Chemosphere*, 365, 143340.
- Boehm, C. R., Pollak, B., Purswani, N., Patron, N., & Haseloff, J. (2017). Synthetic Botany. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(7), a023887.

- Brandt, O., & Hoheisel, J. D. (2004). Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends in Biotechnology*, 22(12), 617-22.
- Brooker, R. J. (2012). *Genetics: Analysis & Principles* (4th ed.) The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Brooker, R. J. (2024). *Genetics: Analysis & Principles* (8th ed.). The McGraw-Hill LLC.
- Christie, J. M., & Zurbriggen, M. D. (2020). Optogenetics in plants. *New Phytologist*, 229, 3108–3115.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2004). *Stanica: Molekularni pristup*. Medicinska naklada.
- Coumar, M. S. (Ed.). (2021). *Molecular docking for computer-aided drug design: Fundamentals, techniques, resources and applications*. Academic Press.
- Dale, J., Schantz, M., & Plant, N. (2012). *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Davidović, S., Aleksić, J. M., Stevanović, M., & Kovačević Grujičić, N. (2023). Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije. *Trends in Molecular Biology*, 3, 18-37.
- Deiman, B., van Aarle, P., & Sillekens, P. (2002). Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology*, 20(2), 163-79.
- Gao, C., & Nielsen, K. K. (2013). Comparison between Agrobacterium-mediated and direct gene transfer using the gene gun. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 940, 3–16.
- Hartwell, L., Goldberg, M. L., Fischer, J. A., & Hood, L. E. (2018). *Genetics: From Genes to Genomes* (6th ed.). McGraw-Hill Education.
- Hoeijmakers J. H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*, 361(15), 1475-1485.
- Holenz, J., Mannhold, R., Kubinyi, H., & Folkers, G. (Eds.). (2016). *Lead generation: Methods and Strategies, 2 Volume Set*. John Wiley & Sons.
- Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239-1249.
- Katsila, T., Spyroulias, G. A., Patrinos, G. P., & Matsoukas, M. T. (2016). Computational approaches in target identification and drug discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 177-184.

- Kelman, Z., & O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 71-200.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J. (Eds.). (2012). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2012). *Concepts of Genetics* (10th ed.). Pearson Education, Inc.
- Komar, A. (Ed.). (2009). *Single Nucleotide Polymorphisms. Methods in Molecular Biology™*. Humana Press.
- Krajnović, M. (2013). Prognostički značaj aberantne metilacije CpG ostrvaca u patogenezi akutne mijeloidne leukemije. Doktorska disertacija.
- Lengauer, T. (Ed.). (2002). *Bioinformatics - From Genomes to Drugs*. WILEY-WCH.
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D., & Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(16), 1923-1938.
- Liu, W., & Stewart, C. N. Jr. (2015). Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science*, 20(5), 309-317.
- Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends in Analytical Chemistry: TRAC*, 98, 19-35.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clarck, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms* (12th ed.). Pearson Benjamin Cummings.
- Maia, E. H. B., Assis, L. C., de Oliveira, T. A., da Silva, A. M., & Taranto, A. G. (2020). Structure-based virtual screening: From classical to artificial intelligence. *Frontiers in Chemistry*, 8, 1-18.
- Marín, O., González, B., & Poupin, M. J. (2021). From Microbial Dynamics to Functionality in the Rhizosphere: A Systematic Review of the Opportunities with Synthetic Microbial Communities. *Frontiers in Plant Science*, 12, 650609.
- Martins, S. J., Pasche, J., Silva, H. A. O., Selten, G., Savastano, N., Abreu, L. M., Bais, H. P., Garrett, K. A., Kraisitudomsook, N., Pieterse, C. M. J., &

- Cernava, T. (2023). The Use of Synthetic Microbial Communities to Improve Plant Health. *Phytopathology*, 113(8), 1369–1379.
- Mohsa, R. C., & Greig, N. H. (2017). Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3(4), 651-657.
- Oliveira, B. B., Veigas, B., & Baptista, P. V. (2021). Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next "Gold Standard". *Frontiers in Sensors*, 2, 752600.
- Pavlica, M. (2012). *Mrežni udžbenik iz genetike*. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Pérez-Sánchez, H. (Ed.). (2012). *Bioinformatics*. IntechOpen.
- Postlethwait, J. H., & Hopson, J. L. (2010). *Life*. Cengage Learning.
- Rizzo, P., Chavez, B. G., Leite Dias, S., & D'Auria, J. C. (2023). Plant synthetic biology: from inspiration to augmentation. *Current Opinions in Biotechnology*, 79, 102857.
- Røkke, G., Korvald, E., Pahr, J., Oyås, O., & Lale, R. (2014). BioBrick assembly standards and techniques and associated software tools. *Methods in Molecular Biology*, 1116, 1-24.
- Sahoo, M., Arsha, N., Baral, P. R., & Klumpp, S. (2021). Accuracy and speed of elongation in a minimal model of DNA replication. *Physical Review E*, 104(3), 034417.
- Savić Pavićević, D., & Matić, G. (2011). *Molekularna biologija 1*. NNK International.
- Seidel, T., Schuetz, D. A., Garon, A., & Langer, T. (2019). The pharmacophore concept and its applications in computer-aided drug design. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 110, 99-141.
- Shaoshuai, L., Wang, K., Moammar, H., Xingguo, Y., Aili, L., Long, M., & Karl-Heinz, K. (2024). Enemies at peace: Recent progress in *Agrobacterium*-mediated cereal transformation. *The Crop Journal*, 12(2), 321-329.
- Shikata, H., & Denninger, P. (2022). Plant optogenetics: Applications and perspectives. *Current Opinion in Plant Biology*, 68, 102256.
- Streips, U. N., & Yasbin, R. E. (Eds.). (2002). *Modern Microbial Genetics* (2nd ed.). Wiley-Liss, Inc.

- Subašić, Đ. (2006). *Molekularna biologija - Primjena u medicini i transgenetici*. Klinički centar Univerziteta u Sarajevu.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877-82.
- Verma, S. K., & Das, A. K. (eds.). (2021). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier.
- Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Shank, D. D. (1992). Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(1), 392-6.
- Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations* (5th ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Yang, C., & Tan, W. (Eds.). (2013). *Molecular Beacons*. Springer.
- Yang, J. S., & Reyna-Llorens, I. (2023). Plant synthetic biology: Exploring the frontiers of sustainable agriculture and fundamental plant biology. *Journal of Experimental Botany*, 74, 3787-3790.
- Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(11), 661-677.
- Zhu, X., Liu, X., Liu, T., Wang, Y., Ahmed, N., Li, Z., & Jiang, H. (2021). Synthetic biology of plant natural products: From pathway elucidation to engineered biosynthesis in plant cells. *Plant Communications*, 2(5), 100229.

Baza podataka

RCSB Protein data bank, <https://www.rcsb.org/>

Struktura

1A2I (<https://doi.org/10.2210/pdb1A2I/pdb>)

1BAZ (<https://doi.org/10.2210/pdb1BAZ/pdb>)

1IC9 (<https://doi.org/10.2210/pdb1IC9/pdb>)

1MCL (<https://doi.org/10.2210/pdb1MCL/pdb>)

2XCT (<https://doi.org/10.2210/pdb2XCT/pdb>)

3AMY (<https://doi.org/10.2210/pdb3AMY/pdb>)

5TTS (<https://doi.org/10.2210/pdb5TTS/pdb>)

7BW1 (<https://doi.org/10.2210/pdb7BW1/pdb>)

Računarski programi

Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 24.1.0.23298, San Diego: Dassault Systèmes, 2024.

Online platforme

<https://app.diagrams.net/>

<https://www.canva.com/>

<https://microbenotes.com/agrobacterium-mediated-gene-transfer/>

<https://www.geeksforgeeks.org/experimental-proof-of-dna-replication/>

<https://www.cours-pharmacie.com/biologie-moleculaire/replication-de-ladn.html>

<https://www.mbi.nus.edu.sg/mbinfo/how-is-dna-replicated/>

INDEKS

A

ab initio 154, 162, 164, 165, 177
Absorbanca 48
Adenine Base Editing, ABE 199
Adenozin trifosfat, ATP 21, 24, 27, 109, 110
Agaroz 49-51, 53
Agrobacterium tumefaciens 199, 200
Alel 73, 101, 115-122, 124, 127, 128, 130
Alfa-heliks 162, 163
Algoritam 151, 153, 157, 158, 165, 168-171, 173-175, 180, 185, 188, 190, 191, 195, 196
Alkalna fosfataza 137, 142
Alkaloidi 214, 218, 222
AluI 55, 56
Aminokiselina 6, 28, 37, 68, 115, 135, 151, 155, 161-163, 165, 178, 193
Ampicilin 43, 58, 68, 69
Amplifikacija 85, 87, 89-91, 94-96, 98, 102-112, 123, 127, 201
Amplikon 88, 89, 94-96, 104, 105
amp^R 57, 58, 68
Anodna ploča 141
Antibiotik 43, 67, 68, 78, 82, 113, 225
Antigen 143
Antitijelo 80, 137, 143-145, 148, 155, 178
Antocijanin 213-215
Apigenin 181, 182, 224
Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. 205, 213
Artemisia annua L. 213
Artemisinin 213-215, 217, 218
Artemisininska kiselina 213
Arthrobacter luteus 56
Astaksantin 214, 215, 218
Astragalozyd 213
Astragalus mongholicus Bunge 213
ATPaza 24, 206
Atropa belladonna L. 214, 216
AURKC 122
AutoDock 156, 157, 170, 184
Autonomous replication sequence, ARS 84

B

Bacillus amyloliquefaciens H 56
Bacillus subtilis 12, 20-22, 25, 29, 30, 32, 36, 69, 224
Backward inner primer, BIP 107, 108
Bacterial Artificial Chromosome, BAC 61, 83, 84
Baikalein 214
Bakteriofag 32, 50, 55, 70, 71, 73-78, 81-84, 110, 112

BamHI 56, 65-67, 81
Basic Local Alignment Search Tool, BLAST 164
Berberin 214
Beta-laktamaza, *bla* 67
Beta-ploča 162, 163
Bidirekciona replikacija 12, 20, 23, 64, 73
bio operon 72
biobricks 201
Biohemijska genetika 2
Bioinformatika 7
Biolistika 200
Biomolekula 4, 147, 151, 153-156, 173, 177, 185
Bionanotehnologija 222, 223
Bioreaktor 198, 208, 209
Bioremedijacija 225, 226
Biosenzori 220, 226
Biotehnologija 7, 31, 112, 197, 198, 218, 222
Blocking 144, 145
Borrelia burgdorferi 63
Botanika 197
 β -galaktozidaza 58, 68, 80, 81
 β -globin 86, 115-117
 β -karoten 213-215
 β -klamp 21

C

Capsicum frutescens L. 214
cat 84
Catharanthus roseus (L.) G.Don. 214, 221, 222
CBE-Based Precise DNA Deletion 199
cDNK 61, 62, 71, 91-93, 96, 103, 105
Centella asiatica (L.) Urban 213
Centralna dogma 3, 113
Centromere 58, 84
Cezijum-hloridni gradijent 9, 10
Chromophore-Assisted Light Inactivation, CALI 204
Chrysanthemum × morifolium 214
Cianidin-3-O-rutinozyd 213
Citogenetika 2
Citohrom P450 212
ColE1 62, 64
Computer-Aided Drug Design, CADD 149-152
Coomassie Brilliant Blue 50
Coptis japonica (Thunb.) Makino 214
Copy Number Variant, CNV 124, 130
cos regija 72, 77-79, 82
CRISPR/Cas 8, 9, 14, 35, 38, 39, 198, 199, 212, 215, 216
Crossingover 127, 128, 130
Entalpija 176, 189, 196

Cryogenic electron microscopy, cryo-EM 30-32, 154, 159

C_t vrijednost 95, 98

Cytosine Base Editing, CBE 199

D

Damarenediol-II 213

Delecija 69, 78, 114, 117, 121-123, 132, 137, 199, 212

Delfinidin 213, 214

Denaturacija 14, 38, 47, 87, 89, 96, 103-105, 107, 109, 110, 112, 137, 142

Dezoksinkinleozid kinaza 30

Dezoksiribonukleaza 45

Dezoksiribonukleinska kiselina, DNK 3-87, 89-100, 103-118, 120-129, 131, 133, 135, 137-143, 146, 154, 160, 185, 193-195, 197, 199-201, 204, 205, 224

Dezoksiribonukleotid 17, 18, 29, 31, 92

Difrakcija 4, 161, 221

Dihidrovercetin 213

Diosgenin 213

Diterpeni 213

Diterpenoidi 215

DNA proba 136

DNA Stain D 50

DnaA protein 14-16, 32-35

DnaB protein 14, 15, 20, 21, 23, 32, 36

DnaC protein 14, 15, 20, 21, 23, 33

DNK biblioteka 59

DNK polimeraza 16-20, 24, 25, 27, 29, 30, 38, 87, 90, 91, 104, 107, 109-112

DNK profiliranje 128, 129

DNT sintetaza 31

dNTP 18, 26, 87, 111

DOCK 157, 169

Docking 146, 150, 151, 153-158, 167-171, 173, 178-180, 183-186, 188, 190-196

Docking-Based Virtual Screening, DBVS 150

DrugBank 155

Dual Base Editing, DBE 199

Durin 213

E

EcoRI 55-57, 79, 80

Egzonukleazna aktivnost 18, 91, 96, 100, 109

Ekstrakcija 44-47, 140, 143, 209, 222, 223

Ekstrakt 44, 45, 140, 220-226

Elektroforeza 29, 30, 49-54, 81, 104, 127, 129, 139, 140, 142-144

Elektronska mikroskopija 8, 17, 30, 32, 159, 162, 221

Elektroporacija 70, 71, 200

ELISA 104

Elongacija 11, 13, 15-20, 26, 27, 36, 108, 111

Entropija 172, 173, 175, 176, 188, 189

Epigenetika 7

Epigenetske modifikacije 28

Epigenetski faktori 8, 113

Epitop 145

Escherichia coli 9-11, 13, 14, 18, 20-22, 25, 29, 32-37, 42, 44, 45, 56, 61, 62, 65, 67, 68, 70, 74, 83, 84, 109, 110, 209, 212, 224

Ethylene Diamine Tetra Acetate, EDTA 45

Etidium bromid 48, 49, 53, 54, 93, 142

Etopozid aglikon 213

Eukarioti 3, 6, 8, 13, 38, 41, 201

ex vivo 220

F

F3 stega 23-25

FAM 120-122

Farmakologija 146, 148, 178, 186, 198, 201, 208, 222

Fenolske komponente 213

Flavin-adenin-dinukleotid, FAD 204

Flavin-monomonukleotid, FMN 204

Flavonoidi 214, 222, 224

Flavonoli 214

FlexX 156, 157, 169

Fluorescencija 32, 48, 49, 94-96, 98-100, 121, 123, 135

Fluorescent In Situ Hybridization, FISH 135

Formalna genetika 2

Forward inner primer, FIP 107, 108

Fosfodieterska veza 4, 5, 17-19, 55

Frakcioniranje 30, 44

Free Energy Perturbation, FEP 188, 189

G

gal operon 72

Gama-aminobuterna kiselina 213, 215

Gen 1, 2, 5-7, 10, 14, 19, 20, 24, 36, 38-44, 54, 57-60, 62-69, 71, 73-78, 80-87, 91, 92, 94, 98, 109, 113, 115-117, 120, 122-124, 130, 131, 135, 137-140, 142, 143, 184, 198, 199, 201, 202, 204, 208, 210-212, 215-217

Genetička informacija 3-8, 10, 13, 26, 198

Genetički materijal 3, 4, 8, 13, 18, 19, 23, 27, 28, 39, 69, 197

Genetičko inženjerstvo 63, 69, 199, 211

Genetika 1, 2, 3, 39, 129, 197

Genetika biljaka 2

Genetika čovjeka 2

Genetika eukariota 2

Genetika mikroorganizama 2, 3

Genetika prokariota 2, 3

Genetika razvika 2

Genetika životinja 2

Genetska varijacija 8, 113, 116, 118, 119, 121, 131
 Genom 7, 8, 11, 13, 19, 21, 31, 37, 38, 55, 59, 61, 71-74, 76-78, 80, 82, 83, 85, 86, 91, 106, 112-116, 118, 119, 121, 123-125, 127, 129-131, 137, 140, 162, 198-200, 211, 212, 214, 215, 217
 Genomska biblioteka 59, 61
 Genomski ekvivalent 61
 Genotipizacija 109, 119, 120, 122, 125
 Genska biblioteka 71
 Genska ekspresija 7, 36, 64, 66, 74-76, 91, 92, 94, 113, 115, 142, 143, 198, 201, 202, 204, 205, 207, 211, 212, 214-218
 Geraniol 213
 Ginsenozid 213
 Giraza 20, 193, 194
 Glide 156, 157, 168
Glycine max (L.) Merr. 213, 222
 GOLD 156, 157, 184

H

Haemophilus influenzae Rd 56
Hb^A 117
Hb^S 117
Heat-Schock Protein, HSP 204
 Helikaza 18-21, 23, 27, 103
 Hemluminiscencija 136, 137, 138, 142, 144
 Hereditet 1-3
 Heterozigot 114, 116, 122, 126, 128
 Hibridizacija 51, 71, 90, 98, 100, 103, 105, 107, 109, 111, 121, 123, 125, 131, 133-140, 142
 Hidrofobna interakcija 163, 172, 178, 179, 181, 188, 196
High Performance Computing, HPC 154
High-Throughput Screening, HTS 148, 149, 186, 192
HindIII 50, 55, 56, 79
 Hiosciamin 214, 216
 Hloroplast 217, 218
 Holoenzim 23, 24, 29, 38
 Holoenzim 23, 24, 29, 38
Homology-Directed Repair, HDR 199
 Homozigot 114, 116, 117, 122, 126
 Hrisin 214
 Hromatografija 29, 30, 46, 47, 48
 Hromosom 2, 11-13, 15, 20, 25, 33, 41, 42, 53, 57, 63, 64, 74, 76, 83, 84, 116, 118, 125-127, 130, 133, 138, 211
Hybrid capture method 136
Hyossciamus sp. 214

I

ICM 158
 Imunoglobulin 50
 Imunostimulatori 209

Imunosupresanti 209
 in silico 147, 149, 167, 183
 in situ 134, 135
 in vitro 13, 33-36, 40, 62, 78, 79, 81-83, 103, 106, 147, 148, 186
 in vivo 76, 147, 148, 186, 220
 Indels 121, 123
 Informaciona RNK 6, 7, 61, 92-94, 115
 Inicijacija 11, 13-17, 20, 27, 32-36, 38, 63, 64, 73, 205
 Inkrementalna konstrukcija 157, 169
 Insercija 57, 58, 63, 66-69, 79, 80, 82, 114, 121-123, 132, 199, 217
 Insert 41, 42, 60, 61, 71, 79-81, 83, 132
 Interkalacija 48, 184, 195
 Ishodište replikacije 11-14, 20, 36, 43, 44, 59, 64, 65, 82-84
 Isopropil tiogalaktozid, IPTG 68
 Izoflavon 213, 215
 Izoprenoidi 213, 217
 Izopropil- β -d-tiogalaktopiranozid, IPTG 58, 60, 68
 Izotermalna amplifikacija 102-104, 107, 112

J

Janus kinaza 3 183, 184
 Jednonukleotidni polimorfizam 101, 116, 117, 119, 122, 124

K

Kancerogeneza 28
 Katarantin 213
 Katodna ploča 141
 Klonirajuće mjesto 65, 66, 68, 69, 79, 82
 Kloniranje 40-44, 54, 55, 57-62, 64-67, 69, 71, 78, 80, 82, 83, 85, 91, 92
Knockdown 211
Knockout 211, 212
 Kohezivni krajevi 55, 72, 73, 76, 77, 79
 Kolorimetrija 144
 Kompetencija 69, 70
 Konformacijski ansambl 169
 Konjugacija 63, 70, 137
 Konjugativni plazmid 63
 Kovalentna veza 17, 56, 58, 79, 149, 178-180, 183, 184
 Kozmid 82, 83
KpnI 67
 Ksantaksantin 214
 Kumarin 213
 Kvantna mehanika, QM 177, 188, 189, 191

L

lacI 67, 68

Lactuca sativa L. 214
lacZ 58, 68, 69
Lambda attachment site, attλ 74
 Lambda bakteriofag 50, 71-79, 81
 Ligacija 42, 58, 70, 72, 79, 81, 82
 Ligand 142, 146, 150, 151, 153-158, 160, 165, 167-173, 175, 176, 178-181, 183, 184, 186-188, 190, 191, 193, 195, 196
Ligand-Based Drug Design, LBDD 150
 Ligaza 16, 17, 20, 29, 30, 43, 56, 57, 62, 76
 Limonen 213, 214
Linear Interaction Energy, LIE 188
 Linkeri 62
 Lipofilnost 181, 186, 187
 Litički ciklus 74-76
 Lizogenija 74-76, 78, 80
 Lokus 8, 21, 22, 25, 61, 110, 115, 118-121, 124, 125, 130
Long-range PCR 89, 91
Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP 102, 104, 107, 108, 109
Lycium barbarum L. 214
Lycium ruthenicum Murray 214
Lycopersicon esculentum Mill. 199, 213

M

Machine Learning, ML 173, 198
 Male interferirajuće RNK 6, 7
 Marker 50-52, 66, 67, 69, 78, 82, 112, 115, 120, 124, 125, 127, 128
 Mejoza 130
Mentha × piperita 214
Methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA 107
 Metilacija 8, 29, 31, 33, 35, 36, 113
 Mikrobiologija 8, 9, 14, 19, 30, 31, 34-36, 38, 39, 134, 137
 Mikrobiom 198, 202, 203
 Mikročip 122, 123, 130, 131, 144
 Mikrografija 12, 14, 15
 mikroRNK, miRNK 6, 7
 Mikrosatelit 123-129
 Minisatelit 123, 124, 128, 129
Minor Groove Binder, MGB 120, 121
moa operon 72
 Model kotrljajućeg prstena 64, 73, 76, 77, 102, 112
Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area, MM-GBSA 173
Molecular Mechanics Poisson-Boltzman Surface Area, MM-PBSA 173
 Molekularna biologija 2-4, 7, 9, 11, 89, 113, 144, 154, 198
 Molekularna genetika 2, 7, 40

Molekularna mikrobiologija 8, 9, 14, 19, 30, 31, 34-36, 38, 39
 Molekularne makaze 55
 Molekularni svjetionici 98, 100
 Molekularni svjetionici 98, 100
 Monte Carlo metod 157, 158, 169-171
 Multienzimski kompleks 26, 27, 29-31
 Mutacije 8, 9, 19, 27, 28, 41, 74, 76, 109, 115-119, 122, 124, 130, 131, 154, 202, 215
 Mutagen 49, 50

N

NADPH 221
 Najlonska membrana 139-141
 Nanočestice 200, 217-226
 Nanomaterijali 220, 223-225
 Nanotehnologija 218, 222, 223
National Center for Biotechnology Information, NCBI 118, 155
 Nekonjugativni plazmid 63
 N-formildemekolcin 213
Nicotiana benthamiana Domin 205, 213, 215
Nicotiana tabacum L. 213, 215, 217
 Northern blot 140, 142, 143
Not I 84
Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA 102-106, 109
 Nuklearna magnetska rezonanca, NMR 36, 153-155, 159, 162, 171
 Nukleosom 38
 Nukleotid 4, 5, 16-19, 27-29, 48, 55, 56, 72, 83, 85, 91, 96, 117, 118, 121, 122, 124, 129
 Nukleotidna ekscizijska reparacija 8
 Nukleozid-difosfokinaza 30

O

Okazaki fragment 16, 17, 23-25
 Oligonukleotid 62, 68, 85, 96, 98, 122, 131, 135, 201
 Optogenetika 198, 203-207
oriC 13, 33-36
oriS 84
oriV 36-38
Oryza sp. 214

P

PAC 83
 Pačulol 213
 Palindrom 55
Panax ginseng C.A.Mey. 213
 Pedigre 127, 128
Pelargonium sidoides DC. 213
 Peptid 69, 135, 148, 155, 163, 185, 195
 Peptidoglikan 39

Petunidin 214
Physcomitrella patens (Hedw.) Bruch & Schimp. 213, 215
 Piceatanol 213
 Piruvat dehidrogenaza 36
Plant Natural Products, PNP 209, 210, 216
Plant Usable Light-Switch Elements, PULSE 205, 207
 Plastidi 200, 212, 217, 218
 Plazmid 14, 15, 32, 33, 36-38, 41-45, 47, 52, 55, 57, 58, 62-71, 76-80, 82-84, 98, 112, 139, 199, 201
 PNA proba 135, 136
 Poliakrilamidna gel elektrofrezna, PAGE 142-144
 Polimerizacija 18, 88, 89
 Polimorfizam 101, 114-119, 121, 122, 124, 131-133
 Polinukleotidni lanac 4-6, 19
 Polisaharid 49
Polymerase Chain Reaction, PCR 27, 50, 85-104, 106, 107, 121-123, 125-129, 132, 142
 Populacijska genetika 2, 129
 Post-transkripcijska modifikacija 6
 Post-translacijska modifikacija 145, 193, 212
 Prajmer 16-18, 20, 26, 85-87, 89, 90, 92, 94-96, 100, 103-112, 120, 125-127, 129
 Precipitacija 46, 48
 Prekursor 26-31, 77, 210, 215, 219, 223
 Prigušivač 96-98, 100, 120, 121
 Primaza 16, 17, 19, 20
 Primazom 20
 Profag 74, 75
 Prokarioti 3, 12-14, 16, 18, 20, 25, 29, 30, 38, 39, 201
 Promotor 60, 103, 105, 198, 200, 201, 204, 205
Proofreading 91
Protein Data Bank, PDB 155, 159, 160, 162-165, 182-184, 194
 Protein-protein interakcija, PPI 146, 154, 167, 178, 185, 204
 Protopanaksadiol 213
 Protopanaksatriol 213
 Provitamin A 208, 214
 PRPP sintetaza 28
*Pst*I 67
 Pterostilben 213
 PubChem 156, 190
 pUC18 67, 68
 Pufer 46, 50, 139-141, 143, 193
Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE 51, 53, 54
 Purifikacija 44, 47, 48, 53, 54, 82

Q

Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR 150
 Quorum-sensing 69

R

R faktori 43
Reactive Oxygen Species, ROS 204, 224
Real-time PCR 27, 93-95, 97-101
 Receptor 130, 146, 151, 153, 154, 157, 165, 167-169, 175, 179, 190-192, 196, 207
 Recirkularizirani vektor 58, 60
Recombinase Polymerase Amplification, RPA 102, 104, 110-112
 Reduktaza 29, 30, 160
 Rekombinacija 7, 8, 9, 25, 83, 84, 121, 130, 215, 217
 Rekombinantni vektor 58, 59, 61, 71
 Rekombinazni protein, RP 110, 111
Relative Binding Free Energy, RBFE 186, 188
 Renaturacija 47
 Rendgenska kristalografija 8, 153, 154, 159-162, 171, 192
 Reparacija DNK 8
 Reparacijski enzimi 75
repE 84
Replication Terminator Protein, RTP 22
 Replikacija 4, 5, 7-23, 25-27, 31-39, 41, 42, 44, 59, 63-65, 73, 74, 76, 77, 82-85, 103, 106, 121, 124, 216
 Replikacijska viljuška 11, 12, 18, 20-23, 26, 27, 64
 Replikacijski kompleks 17, 32, 34
 Replikon 12, 13, 31, 37, 39
 Replisom 27
 Reporter 96-98, 100, 121
 Resin 48
Resolving gel 144
Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP 125, 131, 132
 Restriksijski enzimi 15, 42, 43, 52, 55-57, 59, 61, 62, 65, 79, 81, 104, 109, 138, 141, 201
 Restriksijsko mjesto 55, 56
 Resveratrol 213, 218
 Reverzna transkriptaza 61, 62, 92, 93, 103, 105, 199
 Rezistencija 43, 62, 67, 68, 78, 82, 83, 116, 210, 224
 Ribonukleaza 20, 45
 Ribonukleaza 20, 45
 Ribonukleinska kiselina, RNK 3, 5-7, 16, 17, 19, 20, 26, 28, 44-46, 48, 50, 52, 61, 71, 92-94, 103-106, 109, 110, 112, 115, 134, 135, 137, 140, 142, 143, 195
 Ribonukleotid 6, 17, 29
 Ribonukleotid reduktaza 29
 Ribonukleozid-difosfat reduktaza 30
 Ribosom 6
 Ribosomalna RNK 6, 103, 137
 RK2 plazmid 32, 36, 37
 RNK polimeraza 6, 16, 103, 105
 rNTP 26
Rolling Circle Amplification, RCA 102, 104, 112
Rosa × hybrida 213

S

Saccharomyces cerevisiae 84, 209, 212
Sall 67
Salvia miltiorrhiza Bunge 214
Santalen 213
SARS-CoV-2 112, 189
Satelitna DNK 123
Sau3A 56, 81
Scutellaria bornmuelleri Hausskn. ex Bornm. 214
Sekundarni metaboliti 202, 208, 211-213, 215, 218, 222
Sekvenciranje sljedeće generacije 8, 38, 130, 210
Sekvestracija 26
Selekcija 42, 70, 81, 84, 134, 158
Semikonzervativna replikacija 7, 9-11, 37, 76
SeqA protein 34, 35
Sequene Tagged Site, STS 125
Seskviterpenoidi 213, 217
Silimarin 214
Silybum marianum (L.) Gaertn. 214
Single-Stranded DNA-Binding Protein, SSB 14, 20, 24, 110, 111
Sintetska biologija 197, 198, 200-202, 208-210, 212
Sklareol 213
Skvalen 213, 217
Smal 67
Sodium Dodecyl Sulphate, SDS 45, 143, 144
Solanum tuberosum L. 214
sopA 84
sopB 84
Southern blot 51, 125, 131, 133, 137-141
Spektroskopija 36, 155, 159, 162, 178
SphI 67
SstI 67
Stacking gel 144
Staphylococcus aureus 33, 56, 107, 109, 112, 193, 194, 224
Strand Displacement Amplification, SDA 102, 104, 109, 110
Streptococcus 29, 69, 224
Striktozin 213
Structure-Activity Relationship, SAR 148
Structure-Based Drug Design, SBDD 150, 160
SYBR Green 49, 94, 95
Synthetic microbial communities, SynComs 202, 203

T

Tabersonin 213
Taksadien 213, 215
Taksol 213
Tanšinin 214
Taq polimeraza 87, 89, 91, 96, 97, 120, 121
TaqMan 96-98, 100, 101, 119-122

Tautomer 191
Taxus sp. 213, 215
Tehnologija rekombinantne DNK 40, 59
Tekućinska hibridizacija 134, 136-138
Telomere 59, 84, 124
Terminacija 11, 20, 23, 25, 26, 27, 220
Terminusne regije, Ter 21
Thalictrum minus L. 214
Thermus aquaticus 87
Timidilat sintaza 30
Topoizomeraza 18
Transdukcija 70
Transfekcija 78, 79
Transformacija 41, 43, 58, 59, 67, 69, 70, 71, 78, 83, 199-201, 205, 212-214, 216-218, 224
Transgeni 40, 41, 137, 147, 200, 203, 214-217
Transkripcija 6, 7, 69, 73, 103, 106, 115, 204-206
Transkripcijski faktor 205, 215
Transkript 6, 115, 143
Transkriptom 211
Translacija 6, 7, 69, 202
Transporter 146, 155
Transportna RNK 6
Transpozicija 132, 133
Transpozon 133
TrfA protein 37, 38
Triterpeni 213
Triterpenoidi 213
Tupi krajevi 56
Turbidimetrija 107

U

Umjereni fagi 73, 74
UniProt 155, 162
URA3 84

V

van der Waals 163, 170, 172, 178-180, 188, 189, 191
Vanilin 214
Variable Number Tandem Repeat, VNTR 124, 125
Vektor 40-44, 55, 57-59, 61, 62, 64-69, 71, 75-85, 225
VIC 120-122
Vinblastin 214
Vinkristin 214
Virus 4, 55, 71, 73, 74, 77, 81, 106, 107, 109, 110, 112, 134, 155, 206, 216, 225
Vitamin E 214
Vitis vinifera L. 213
Vodeći lanac 16, 17
Vodikova veza 5, 6, 56, 139, 162, 163, 172, 178-181, 185, 187-189, 191, 192
Vogonin 214

W

Western blot 140, 143-145

X

*Xba*I 67

X-gal 42, 58, 60, 68

Y

Yeast Artificial Chromosome, YAC 83, 84

Z

Zaostajuci lanac 17

Zea mays L. 199, 214

