**PUT PRIJENOSA SIGNALA**

- proces kojim se signal na površini stanice pretvara u specifičan odgovor stanice

- molekularna osnova prijenosa signala iznimno slična između evolucijski udaljenih organizama

\* Lokalni prijenos signala

1. parakrini prijenos signala

- stanica izlučuje molekule (regulatore lokalnog regulatora) u izvanstaničnu tekućinu

1. prijenos putem sinapsi

- neuron izlučuje neurotransmitere u područje sinapsi

\* Prijenos signala na daljinu - hormonima

- endokrine stanice izlučuju hormone koji krvlju odlaze do udaljenih stanica u tijelu

- ciljne stanice prepoznaju hormone i odgovaraju kemijskim signalima

\* Komunikacija stanica neposrednim kontaktom

- putem plazmodezmija (biljne) ili pukotina (animalne stanice) ili interakcijom molekula na površini stanica

\* Stupnjevi prijenosa signala

- Earl W. Sutherland - Nobelova nagrada

- epinefrin (adrenalin) u uvjetim in vitro ne depolimeriziran glikogen u prisutnosti glikogen fosforilaze

-> epinefrin aktivira enzim samo u prisutnosti intaktnih stanica

-> epinefrin nije u neposrednoj interakciji s enzimom, već se proces sastoji od niza koraka u koje je uključena plazmatska membrana

- 3 stupnja prijenosa signala: prijem signala, prijenos (transdukcija) signala i stanični odgovor

1. prijem signala

- ciljna stanica detektira signal koji dolazi izvan nje

- kemijski signal je detektiran kad se signalna molekula veže za proteinski receptor na površini stanice

1. transdukcija

- vezanje signalne molekule uzrokuje promjenu proteinskog receptora, što potiče transdukciju

- "domino efekt" - molekula dovodi do promjene sljedeće molekule, koja dovodi do promjene sljedeće; zadnja molekula u nizu pokreće stanični odgovor

- receptori ciljne stanice prepoznaju signalnu molekulu (ligand)

- ligand se veže na specifično mjesto na receptoru i uzrokuje promjenu njegove konformacije

- ta promjena aktivira receptor koji djeluje na sljedeću molekulu...

1. stanični odgovor - aktivacija nekog enzima ili gena, rearanžiranje citoskeleta...

\* Tri vrste membranskih receptora

1. G-protein-vezujući receptori

- sekundarna struktura - pojedinačni polipeptid ima 7 transmembranskih α-heliksa

 - specifične petlje odgovaraju mjestima vezanja signalnih molekula i G-proteina

- proteinski receptor + G-protein + enzim u plazmatskoj membrani

 - kad nema izvanstaničnog signala, sva tri proteina su u neaktivnom obliku

 - za inaktivni G-protein vezana je molekula GDP-a

 - vezanje signalne molekule za receptor mijenja njegovu konformaciju

 - vezanje G-proteina za receptor aktivira G-protein, na njega se veže GTP umjesto GDP-a

 - G-protein se kreće duž plazmatske membrane do enzima, veže se na njega i aktivira ga

 - aktivirani enzim pokreće sljedeći korak u putu prijenosa signala

- G-protein radi i kao GTP-aza: katalizira hidrolizu GTP-a, nastaje GDP, G-protein se inaktivira, odvaja od enzima i postaje spreman za prihvat novog signala

1. tirozin-kinazni receptori

- dio na izvanstaničnoj strani membrane - mjesto vezanja signalne molekule, povezano transmembranskim heliksom s dijelom proteina na citoplazmatskoj strani membrane

- dio na citoplazmatskoj membrani - odgovoran za aktivnost receptora, sadrži nekoliko molekula tirozina

- napad signalne molekule (npr. hormon rasta) na vezujuće mjesto - dva polipeptida agregiraju tvoreći dimer

- tirozin-kinazni dio svakog polipeptida fosforiliria tirozine na drugom polipeptidu koristeći fosfatnu skupinu iz ATP-a - dimer istodobno radi i kao enzim i kao supstrat

- aktivirani receptor veže specifične unutarstanične proteine za fosforilirane tirozine i aktivira ih

- aktivirani proteini mogu pokrenuti nekoliko različitih puteva/st. odgovora odjednom

1. ion-kanalni receptori

- signalni receptori su transmembranski proteini koji se otvaraju, dopuštajući protok specifičnih iona kroz membranu kad se specifične signalne molekule vežu na izvanstaničnu stranu proteina

- propuštanje iona u stanicu - promjena koncentracije iona u stanici - stanični odgovor

\* Transdukcija signala

- odvija se u više koraka

 - amplifikacija aktivnih molekula na kraju puta - mali broj signalnih molekula daje jak stanični odgovor

 - bolja koordinacija i regulacija različitih aktivnosti stanice

- glavni pokretač prijenosa signala - fosforilacijska kaskada

 - vezanje signalne molekule za receptor - aktivacija molekula odašiljača - aktivacija kinaza prijenosom fosfatne skupine

 - zadnja kinaza u nizu aktivira protein odgovoran za konačni odgovor stanice

- kinaze i proteini inaktiviraju se defosforilacijom, što je proces kataliziran fosfatazom

- fosfataza se akumulira u stanici kad nema izvanstaničnog signala

\* Sekundarni glasnici

- ioni ili male neproteinske molekule topive u vodi, brzo se šire po stanici difuzijom

1. cAMP - ciklički adenozin monofosfat

- nastaje iz ATP-a pomoću enzima adeninilil ciklaze, koja se nalazi u plazmatskoj membrani

- cAMP odašilje signal do metaboličke mašinerije u citoplazmi, inaktivira se pomoću fosfodiesteraze i prelazi u AMP

- komponenta mnogih G-protein signalnih puteva:

 - signalna molekula (primarni glasnik) aktivira G-protein-vezujući receptor

 - receptor aktivira specifičan G-protein

 - G-protein aktivira adenilil ciklazu - pretvorba ATP-a u cAMP

 - novonastali cAMP aktivira sljedeći protein u nizu

1. ioni kalcija i inozitol trifosfat (IP3)

- Ca2+ češći sek. glasnik nego cAMP; u G-protein-vezujućim i tirozin-kinaznim putevima

- Ca2+ aktivno se prenosi iz citosola pomoću ionskih crpki

- koncentracija Ca2+ niža je u citosolu nego u izvanstaničnoj tekućini

- Ca2+ i IP3 u putu prijenosa signala:

 - vezanje signalne molekule za G-protein-vezujuće ili tirozin-kinazne receptore

 - aktivacija fosfolipaze koja cijepa membranski fosfatidilinozitol u DAG (diacilglicerol) i IP3

 - IP3 difundira kroz citosol, veže se za otvor kalcijeva kanala u membrani ER-a

 - kalcijev kanal se otvara, Ca2+ izlazi iz ER-a

 - Ca2+ aktivira sljedeći protein u putu prijenosa signala, najčešće putem proteina kalmodulina

\* Stanični odgovor

- amplifikacija signala - svaka molekula na putu djeluje na mnogo molekula supstrata (sljedećih molekula u kaskadi)

- neki signalni putevi uključuju ili isključuju specifičan gen - transkripcijski faktori kontroliraju koji će gen biti prepisan u mRNA

- npr. faktor rasta aktivira receptor i pokreće fosforilacijsku kaskadu, a posljednja kinaza u nizu ulazi u jezgru i aktivira specifičan transkripcijski faktor

**JEZGRA**

- sadrži DNA, određuje fenotip (Hammerlingov eksperiment)

- 5 - 10μm, zauzima oko 10% staničnog volumena

- od citoplazme odvojena jezgrinom ovojnicom koja se nastavlja na membranu ER-a

- u njoj se odvija replikacija, stanična dioba, transkripcija te RNA-procesiranje i "splicing"

- paradoks C-vrijednosti - genomi blisko srodnih organizama mogu varirati u količini DNA (C-vrijednost) i do nekoliko tisuća puta iako sadrže približno istu količinu gena

 - razlika u veličini genoma rezultat akumulacije ponavljajuće ("junk") DNA

\* Jezgrina ovojnica

- unutarnja membrana sadrži specifične proteine za vezanje kromatina i jezgrine lamine

- vanjska membrana povezana s membranom rER-a, funkcionalno slična ER-u

- jezgrine pore - kanali kroz koje prolaze male polarne molekule, ioni i makromolekule

- međumembranski prostor - 50 - 100nm

- jezgrina ovojnica osigurava različit sadržaj enzima u jezgri i citoplazmi te sprečava slobodan prolaz molekule između jezgre i citoplazme

- jezgrini lokalizacijski signali (NLSs) - odgovorni za usmjeravanje proteina u jezgru i selektivni transport velikih jezgrinih proteina (potpomognut i signalnim molekulama)

- NLSs prepoznaju jezgrini receptori importini i eksportini, kodirani porodicom srodnih gena

- ulazak jezgrinog proteina odvija se u dva koraka:

 - vezanje NLSs-a za proteinski kompleks jezgrinih pora (bez utroška energije)

 - prolazak proteina kroz jezgrinu poru u jezgru (potrebna energija)

1. importini

- α-podjedinica importina veže se za NLS regiju bogatu bazičnim aminokiselinama, a β-podjedinica veže se za filament jezgrinih pora, dovodeći protein do kompleksa jezgrinih pora

- prolazak proteina kroz poru uz pomoć proteina Ran

 - Ran je aktivan kad je na njega vezan GTP; enzim koji potiče vezanje GTP-a za Ran nalazi se na unutarnjoj membrani jezgrine ovojnice

- β-podjedinica se odvaja, veže za Ran/GTP kompleks i izlazi iz jezgre, a GTP hidrolizira u GDP (pod utjecajem enzima Ran GAP)

1. eksportini

- funkcioniraju slično β-podjedinici importina - vežu se za Ran/GTP kompleks koji osigurava formiranje stabilnog kompleksa eksportin/protein

- izlazak kompleksa u citoplazmu, hidroliza GTP-a, razdvajanje komponenti pomoću Ran GAP

Prijenos molekula RNA

- RNA se prenosi vezana u ribonukleoproteinskom kompleksu (snRNP = proteini + mala molekula RNA)

- vezanje snRNA i proteina - izlazak iz jezgre - vezanje za proteinski kompleks, formiranje snRNP-a - prijenos u jezgru

- pre-mRNA i mRNA asociraju s najmanje 20 proteina formirajući heterogene jezgrine ribonukleoproteine (hnRNP); najmanje 2 proteina u kompleksu nose lokalizacijske eksport signale

\* Jezgrina lamina

- mrežasta struktura građena od proteina lamina (intermedijarna vlakna!)

- na unutarnjoj membrani jezgrine ovojnice, debljine 8 - 10nm

- osigurava čvrstoću i oblik jezgrine ovojnice

- vezana za pore i integralne proteine u unutarnjoj membrani, povezuje kromatin s integralnim proteinima unutarnje membrane

-> uključena u organizaciju kromosoma u interfaznoj jezgri te fragmentaciju i formiranje jezgrine ovojnice

\* Kromatin -> kromosomi

- 4 razine kondenzacije kromosoma tijekom staničnog ciklusa

1. formiranje nukleosoma

- namatanje DNA oko proteinske jezgre, histona

- histoni - mali proteini s velikim udjelom pozitivno nabijenih aminokiselina lizina i arginina, koje asociraju s negativno nabijenom molekulom DNA

- 4 vrste histona: H2A, H2B, H3 i H4

- nukleosom - oktamerna struktura (dimeri sva 4 tipa histona)

- linker DNA - 10 - 100 nukleotida između nukleosoma

- histon H1 - vezan za nukleosom -> kromatosom

1. kromatinske niti

- DNA (nukleosomi) spontano formiraju solenoidnu strukturu (oblik opruge) promjera 30nm u sustavima različitih ionskih jakosti

- H1 odgovoran za zbližavanje nukleosoma

1. stvaranje omčama sličnih struktura

- savijanje kromatinskih niti u omče, vezanje krajeva omči za proteine smještene u osi kromosoma

- svaka omča sadrži 20 000 - 100 000 nukleotida

- pakiranje ovisi o ionima kalcija i bakra

1. metafazni kromosom

- pojedina područja omčastih struktura dodatno se savijaju i namataju - metafazni kromosom = konačna kondenzacija kromosoma

- vidljiv svjetlosnim mikroskopom; nema transkripcije

- važna uloga proteina kondenzina

- različita područja u genomu imaju različitu strukturu kromatina

- dekondenzirani kromatin -> eksprimirani geni

- tip kromatinskog stanja (kondenzacije) može se nasljeđivati - epigenetičko nasljeđivanje

- gusto pakirani (kondenzirani) dijelovi kromosoma - heterokromatinska područja

 - konstitutivni i fakultativni kromatin; nekativni geni

- rahlije pakirani (dekondenzirani) dijelovi kromosoma - eukromatinska područja; aktivni geni

- konstitutivni heterokromatin nalazi se na točno određenim mjestima na kromosomu: centromer, precentromerno područje te telomere i subtelomerno područje

- heterokromatin se sastoji od uzastopno ponavljajućih sekvenci u orijentaciji glava-rep - satelitna DNA

- svaki kromosom zauzima točno određeno područje unutar jezgre (vezani na jezgrinu ovojnicu)

 - aktivni geni - periferno uz kanale jezgrinog matriksa koji odvajaju kromosome

 - organizacija/raspored kromosoma u jezgri ovisi o položaju heterokromatina na kromosomu - heterokromatin se veže uz jezgrinu ovojnice

-> geni se premještaju u različita područja kad se njihov ekspresijski status treba mijenjati

-> organizacija kromosoma je tkivno, vrsno i kromosomski specifična

1. "rabl" konfiguracija - centromere i telomere na suprotnim polovima
2. radijalni položaj - prema veličini kromosoma (veliki periferno) ili gustoći gena (kromosomi veće gustoće gena u središtu, oni manje gustoće periferno)
3. relativni položaj - preferiraju određeno mjesto u jezgri s relativnom međusobnom udaljenošću - mitotska rozeta

\* Jezgrica

- ekscentrično postavljena, odvojena od ostatka nukleoplazme

- veličine 1 - 5μm, vidljiva el. mikroskopom kao gusta, zrnata, nitasta tvar

- uloga: sinteza ribosomske RNA, procesiranje rRNA i formiranje ribosomskih podjedinica

- središnji (nitasti) dio - rRNA i enzimi okruženi slojem guste nukleolarne komponente - prepisivanje rDNA u rRNA

- vanjski (zrnati) dio - preribosomske čestice (početni stadij pakiranja rRNA)

- sekundarno suženje kromosoma = NOR (nukleolarni organizator) = mjesto gdje se nalaze geni za rRNA

- u NOR-u, kromatin se dekondenzira stvarajući petlje gole DNA koja predstavlja kalup za sintezu (transkripciju) rRNA

- transkripcija uzastopno ponavljanih rRNA gena u molekulu rRNA odvija se pomoću velikog broja molekula RNA polimeraze I

 - sinteza više od 1000 rRNA u 1h na jednom genu ("christmas tree"!)

 -prepisivanje 18S-5.8S-28S rRNA kao jedne molekule katalizirano RNA polimerazom I

 - sinteza 5S rRNA izvan jezgrice (katalizira RNA polimeraza III), ulazi u jezgru (preribosomska čestica)

 - sinteza ribosomskih proteina - u citoplazmi, katalizira RNA polimeraza II; iz citoplazme ulaze u jezgru i zajedno s rRNA formiraju preribosomske čestice

- broj jezgrica je vrsno specifičan

**STANIČNI CIKLUS**

- Meselson i Stahl 1958. eksperimentalno dokazali da se DNA u *E. coli* udvostručuje na semikonzervativan način - svaka nova molekula ima jedan novi i jedan stari lanac

\* Razmnožavanje bakterija - binarno cijepanje

- kromosom u obliku kružne molekule DNA, udvostručuje se za 20-ak minuta

- stanična membrana omogućuje pravilno razdvajanje kromosoma u dvije nove stanice

- prije replikacije kromosom se veže za mezosom (uvrnuće membrane)

- proces replikacije počinje na točno određenom mjestu na kromosomu (tzv. mjesto inicijacije) i nastavlja se u istom smjeru duž oba lanca roditeljskog kromosoma

 - novonastali kromosomi ostaju vezani za membranu

 - inicijator replikacije - protein DnaA

- nakon završetka replikacije mjesta vezanja se razdvajaju uslijed rasta stanice; stanice se razdvajaju stvaranjem membrane

- plazmidi - kružne molekule DNA nejednako raspoređene u nove stanice kćeri

\* Dioba eukariotske stanice

- 4 usklađena procesa: rast stanice, reduplikacija DNA, razdvajanje dupliciranih kromosoma, dioba stanice

- stanični ciklus = slijed događaja između dviju dioba stanica

- stanica udvostruči citoplazmu, zajedno s organelima i DNA

- M faza = mitoza (jezgra s udvostručenim kromosomima se podijeli) + citokineza

\* Interfaza

- vrijeme između dviju mitotskih faza; 90% staničnog ciklusa

- obuhvaća:

 - biokemijsku aktivnost (rast i metabolički procesi)

 - G1 fazu (first gap) - prije replikacije DNA

 - S fazu - replikacija DNA

 - G2 fazu - nakon replikacije, priprema za mitozu

- kromosomi nisu vidljivi, pakirani su u kromatinske niti; centrioli s vanjske strane jezgre

\* Profaza

- kondenziranje kromatinskih niti, na kraju profaze na svakom udvostručenom kromosomu dvije sestrinske kromatide

- formiranje diobenog vretena - razdvajanje centriola i kretanje prema polovima, mikrotubuli diobenog vretena vežu se za kinetohore (centromer) na sestrinskim kromatidama

- fragmentiranje jezgrine ovojnice, nestajanje jezgrica, disociranje jezgrinih pora, depolimerizacija jezgrine lamine

\* Metafaza

- par centriola nalazi se na polovima

- kromosomi, tj. centromeri svih kromosoma nalaze se u metafaznoj ploči (sredina između dvaju polova)

- sestrinske kromatide povezane s kinetohornim nitima okrenute prema suprotnim polovima

\* Anafaza

- razdvajanje sestrinskih kromatida u području centromera

- kinetohorne niti se skraćuju - pomicanje kromosoma prema suprotnim polovima

- svi kromosomi na polovima = kraj anafaze

\* Telofaza

- polarne niti diobenog vretena se izdužuju, rastežući stanicu (diobena brazda!)

- na polovima se formiraju dvije jezgre kćeri - formira se jezgrina ovojnica iz dijelova roditeljske ovojnice i ER-a

- pojavljuju se jezgrice, kromosomi despiraliziraju u kromatinske niti

- citokineza - dioba citoplazme

\* Razgradnja jezgrine ovojnice

- fragmentiranje jezgrine ovojnice u vezikule uz koje se vežu lamini tipa B

- disociranje jezgrinih pora

- depolimerizacija jezgrine lamine

 - razgradnja filamenata do pojedinačnih dimera lamina fosforilacijom

 - fosforilacija lamina katalizirana kinazom Cdc2 (regulator mitoze)

- ponovno formiranje jezgrine ovojnice:

 - vezanje vezikula na površinu kromosoma

 - stapanje vezikula, formiranje ovojnice oko kromosoma

 - formiranje kompleksa jezgrinih pora i lamine

 - dekondenzacija kromosoma

\* Diobeno vreteno

- gljive i dijatomeje - MTOC u jezgrinoj ovojnici, biljke - mikrotubuli organizirani oko jezgrine ovojnice, nema centriola

- centrioli se dijele zajedno s matriksom centrosoma tijekom stanične diobe - na polove odlazi po jedan stari i jedan novi centriol

- razdvajanje centrosoma u profazi - stvaranje zrakastih mikrotubula (nemaju ih biljke)

- razdvajanje polova - klizanje polarnih mikrotubula u području gdje su međusobno u kontaktu (motorički proteini usmjereni prema **+** kraju)

- kinetohorni mikrotubuli - vežu se za kinetohor - skraćivanjem mikrotubula kromosomi se razdvajaju i odlaze prema polovima (mot. proteini prema **-** kraju)

- kinetohor - mjesto vezanja diobenog vretena (kinetohorne niti) za kromosom

 - nastaje tijekom rane profaze

 - višeproteinski kompleks - trilaminarna pločasta struktura

 - broj mikrotubula koji se vežu za kinetohor - vrsno specifičan (kvasci: 1, ljudi: 20 - 40)

- proces spajanja mikrotubula i kinetohora:

 - kromosom se približava polu diobenog vretena preko kinetohore jedne sestrinske kromatide

 - kinetohora druge kromatide pokušava se povezati s mikrotubulima drugog pola

- osiguravanje pravilne povezanosti kinetohora putem posebnog mehanizma koji detektira i ispravlja nepravilno sparivanje

 - mehanizam uključuje kinazu Aurora B, koja se nalazi između sestrinskih kinetohora i detektira pritisak na centromeri

**KONTROLA STANIČNOG CIKLUSA**

- istraživanja u kulturi stanica i tkiva - u određenim uvjetima, na hranidbenim podlogama i uz prisutnost hormona stanica se može potaknuti na diobu

- kontrolne točke - regulacija napredovanja staničnog ciklusa

1. kontrolna točka - prijelaz iz G1 u S fazu
2. kontrolna točka - prijelaz iz G2 u M fazu

-> otkrivaju oštećenu/nerepliciranu DNA i popravljaju ju/dovršavaju njenu replikaciju

- kontrolna točka u S fazi - provjera integriteta DNA (utvrđivanje oštećenja, popravak)

- kontrolna točka u G2 fazi - nereplicirana mjesta su signal za zaustavljanje ciklusa, signal za ulazak u mitozu se ne daje dok nije završena replikacija DNA

1. kontrolna točka - pravilna segregacija kromosoma u mitozi

- ako se za diobeno vreteno ne vežu svi kromosomi, mitoza se zaustavlja u metafazi

-> zaustavljanje ciklusa na ovim kontrolnim točkama regulirano je proteinskim kinazama ATM i ATR

 - vezanje kompleksa senzorskih proteina za oštećenu/nerepliciranu DNA

 - aktiviranje proteinskih kinaza ATM i ATR

 - ATM i ATR fosforiliraju proteinske kinaze Chk2 i Chk1, koje zaustavljaju ciklus

- protein p53 - transkripcijski faktor, u sisavaca uključen u zaustavljanje st. ciklusa u G1 fazi

 - povišena ekspresija dovodi do aktivacije ciljnih gena koji zaustavljaju st. ciklus

 - stabilizira se fosforilacijom (fosforiliran ATM-om i Chk2)

 - tumorske stanice - mutirani p53

\* Molekularni mehanizam ograničavanja na jednu replikaciju DNA u staničnom ciklusu

- porodica proteina MCM

 - vezanje za mjesto inicijacije replikacije (ORC) u G1 fazi započinje replikaciju

 - MCM se zatim odvaja i ponovno veže tek u sljedećem staničnom ciklusu

\* Regulatori napredovanja kroz stanični ciklus

- MPF (Maturation Promoting Factor), proteinske kinaze i ciklini

 - regulacija MPF-a - fosforilacijom i defosforilacijom

- MPF - citoplazmatski faktor otkriven u oocita žabe, gdje potiče mejozu oocita

- u somatskim stanicama pokreće mitozu; glavni regulator prijelaza iz G2 u M fazu

- kinaze - enzimi koji fosforiliraju (aktiviraju) druge proteine; uglavnom inaktivne

- ciklini A i B - proteini koji periodičkom akumulacijom/degradacijom aktiviraju ulazak stanice u M fazu

- ciklin-ovisne kinaze aktiviraju se kada se vežu za ciklin

 - količina ciklina u stanici raste sve dok se na njega više ne veže kinaza

 - vezanjem ciklina za kinazu dolazi do razgradnje ciklina

- MPF = Cdc2 (ciklin-ovisna kinaza) + ciklin B

 - ciklin B - regulatorna podjedinica potrebna za katalitičko djelovanje Cdc2

 - fosforilacija Thr161 aktivira Cdc2

 - defosforilacija Tyr15 i Tyr14 potiče prelazak iz G2 u M fazu

- MPF započinje mitozu fosforilacijom različitih proteina koji započinju procese formiranja diobenog vretena, kondenzacije kromosoma...

- MPF se inaktivira razgradnjom ciklina (razgrađuje se ubikvitin posredovanom proteolizom)

- S-kinaza - započinje proces replikacije DNA kad se veže na S-ciklin (vezanje kinaze i ciklina dovodi do razgradnje S-ciklina i inaktivacije S-kinaze)

- M-kinaza pokreće mitozu vezanjem za M-ciklin

- u kancerogenim stanicama kontrola stanične diobe ne funkcionira

 - nefunkcionalni ciklini - mogu se vezati za kinaze i onda kada regulator rasta nije prisutan - nekontrolirana dioba stanica - tumor

- RAS geni - porodica onkogena

- p53 i Rb - tumor supresor geni, kodiraju proteine koji se vežu za kompleks ciklin/ciklin-ovisna kinaza i sprečavaju aktivnost kinaze

**KARIOTIP, MEJOZA I ENDOREDUPLIKACIJA**

- kariotip - skup svih kromosoma u stanici

- mejoza - dvije diobe, mejoza I (redukcijska) i mejoza II (ekvacijska; mitoza)

\* Tijek mejoze

- interfaza – udvostručavanje kromosoma, formiranje sestrinskih kromatida spojenih u području centromera, udvostručavanje centriola

- profaza I:

 - leptoten - kondenzacija kromosoma, vezanje kromosoma za jezgrinu ovojnicu

 - zigoten - sparivanje homolognih kromosoma, stvaranje sinapsi

 - pahiten - precizno sparivanje kromosoma cijelom dužinom, kondenzacija i skraćivanje, lom kromosoma (hijazme), izmjena dijelova nesestrinskih kromatida (crossing over)

 - diploten/dijakineza - odvajanje kromosoma od jezgrine ovojnice, fragmentiranje jezgrine ovojnice, kromosomi u parovima (bivalenti), vidljive hijazme, pomicanje kromosoma prema metafaznoj ploči pomoću diobenog vretena

- metafaza I - bivalenti u metafaznoj ploči, kinetohorne niti vezane za kinetohor, centromeri svakog kromosoma u bivalentu okrenuti su prema polovima

- anafaza I - kinetohorne niti pomiču homologne kromosome prema suprotnim polovima, sestrinske kromatide spojene u području centromera

- telofaza I - dekondenzacija kromosoma, na svakom polu haploidan broj, citokineza

- mejoza II - identično kao mitoza

- interkineza - interfaza između dviju dioba

- rezultat: 4 stanice s haploidnim brojem kromosoma

\* Crossing over

- sinapsis - sparivanje kromosoma - isti geni duž oba homologna kromosoma jedan uz drugi

 - stvaranje sinaptonemskog kompleksa

- rekombinaciju potiču dvolančani lomovi; endonukleaza Spo11 prepoznaje mjesta dvolančanih lomova i s proteinom Mre11 sudjeluje u popravku

- dvolančani lomovi se najčešće događaju na mjestima gdje je DNA rahlo pakirana (regulatorne regije - promotori) - "hot spots" rekombinacije

- jednolančana DNA napada homologni kromosom na temelju komplementarnog sparivanja baza

- funkcije mejotske rekombinacije:

 - o njoj ovisi sparivanje homolognih kromosoma

 - hijazme koje nastaju podupiru razdvajanje homolognih kromosoma

 - rekombinacija stvara nove kombinacije alela

- diploten – nakon razgradnje sinaptonemskog kompleksa crossing over je vidljiv na citološkoj razini kao hijazma

- trajanje mejoze različito je u muškim i ženskim gametama iste vrste

- profaza I uvijek je značajno duža od svih drugih faza zajedno

\* Endoreduplikacija (endomitoza)

- udvostručenje DNA nakon kojeg ne slijedi dioba jezgre niti citokineza

- rezultat:

 - endopoliploidija - povećan broj kromosoma (4n, 8n...)

 - politenija (divovski kromosomi) - isti broj kromosoma, ali veći broj DNA molekula

- "puffovi" - nabreknuća kromosoma, nastaju dekondenzacijom kromosoma na dijelu koji odgovara aktivnom genu

- Balbianijev prsten (puffovi u vrste *Chironomus*) – sinonim za najveće puffove

- kromomere - gusto pakirane kromatinske niti (tamne pruge)

- vrste puffova s obzirom na procese u kojima su pojedini geni aktivni:

 - puffovi karakteristični za pojedine razvojne stadije

 - tkivno specifični puffovi
 - konstitutivni puffovi – cijelo vrijeme aktivni u pojedinom tkivu

 - puffovi inducirani uvjetima okoliša – promjena temperature i sl.

- hormonom ekdisonom moguće je eksperimentalno inducirati pojavu nabreknuća

\* Lampbrush kromosomi

- karakteristika oocita vodozemaca

- omčaste strukture kromosoma - četkasti izgled

- omče prekrivene molekulama RNA i predstavljaju mjesta transkripcijski aktivnih gena = ispruženi dijelovi kromosoma (slično puffovima politenih kromosoma)

**STRUKTURA DNA**

- timin i adenin dolaze u keto i enolnoj formi (keto je češća)

- citozin i adenin dolaze u amino i imino formi (amino je češća)

- prije Chargaffa: tetranukleotidna hipoteza - sve 4 baze jednako zastupljene

- Chargaffovo pravilo: N(A) = N(T), N(C) = N(G)

 - broj purina jednak je broju pirimidina: N(T) + N(C) = N(A) + N(G)

**REPLIKACIJA DNA**

- u bakterija (kružna molekula) replikacija započinje na jednom mjestu i odvija se istovremeno u oba smjera - theta replikacija θ

- oriC - origin of replication

- DnaA - inicijator protein kod bakterija

- SSB (Single Stranded Binding) proteini - vežu se za razdvojene lance DNA i održavaju ih razdvojenima

- topoizomeraza - sprečava namatanje razdvojenih DNA lanaca

- helikaza - cijepa vodikove veze između dušičnih baza

- vodeći lanac sintetizira se u jednom komadu, a tromi u komadima - Okazakijevi fragmenti

- 5‘-3‘ egzonukleazna aktivnost polimeraze I - depolimerizira RNA početnice između Okazakijevih fragmenata i sintetizira DNA

- 3' - 5' egzonukleazna aktivnost DNA polimeraze I i polimeraze III - ispravlja krivo sparene baze (“proofreading”)

- telomere - zaštitne regije na krajevima kromosoma

- zaštita telomera - G tetraplex, proteini koji se vežu na 3' kraj, T-petlja na 3' kraju, telomerazne kape

- telomeraza - dodaje ponavljajuće sekvence DNA na kromosome i sprečava njihovo skraćivanje

- proteini TRF1 i TRF2 vežu se za telomerna ponavljanja, a drugi proteini (npr. WRN) se vežu za njih

 - mutacija u WRN genu - Wernerov sindrom (sindrom ranog starenja)

**TRANSKRIPCIJA DNA**

- prepisivanje DNA u RNA; sinteza molekule RNA

- dijelovi DNA koji se prepisuju nazivaju se geni

- RNA-polimeraza - enzim koji obavlja transkripciju

 - u bakterija - jedan tip RNA-polimeraze, nekoliko tisuća gena

- ispred svakog gena nalazi se redoslijed nukleotida, tzv. promotor

- RNA-polimeraza prepoznaje određene redoslijede nukleotida koji su zajednički svim promotorima

- promotor određuje koji će se lanac DNA prepisivati

- protein sigma dovodi RNA-polimerazu na promotor; prepoznaje start signal u DNA molekuli

- struktura ukosnice u RNA - završetak transkripcije neovisan o proteinu rho; niz uracila na 3' kraju

- završetak transkripcije ovisan o proteinu rho

 - bez UUUUU na 3' kraju

- u eukariota 3 tipa RNA-polimeraza:

 - RNA-polimeraza I – rRNA

 - RNA-polimeraza II – mRNA

 - RNA-polimeraza III – tRNA

- RNA-polimeraza II radi u interakciji s drugim proteinima -transkripcijski faktori

-TFIID – prepoznaje TATA box (podjedinice: TBP – protein koji prepoznaje TATA box i TAF proteini prepoznaju inicijator element i pomažu u regulaciji transkripcije)

-TFIID injicira vezanje ostalih transkripcijskih faktora - TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIH

- transkripcijski faktori + RNA polimeraza II = preinicijalni kompleks

TFIIH – djeluje kao kinaza i fosforilira RNA polimerazu, helikazna aktivnost

- nakon transkripcije - izrezivanje introna pomoću proteina splajsosoma

**TRANSLACIJA**

- mRNA - sadrži prijepis upute za redoslijed aminokiselina u proteinu

- rRNA – gradi ribosome, osigurava pravilno povezivanje mRNA i male podjedinice ribosoma, katalizira stvaranje peptidne veze

- tRNA – donosi aminokiseline na ribosom (antikodon)

- enzim aminoacil-tRNA sintetaza katalizira aktivaciju tRNA vezanjem odgovarajuće aminokiseline za tRNA

- aminoacil-tRNA-sintetaza ima 20 i specifične su za pojedine aminokiseline

- neke tRNA prepoznaju više od jednog kodona; prepoznavanje 3. baze u kodonu je neprecizno

- peptidil transferaza - katalizira stvaranje peptidne veze između susjednih aminokiselina

1. Politeni kromosomi nastaju **endoreduplikacijom**. Bojanjem se vide **svijetle** i **tamne pruge**.
2. MPF je proteinski kompleks kojeg čine **Cdc2** i **ciklin B**, a njegova aktivacija potiče **kondenzaciju kromosoma**, **formiranje diobenog vretena**, **fragmentiranje jezgrine ovojnice** i **depolimerizaciju jezgrine lamine**.
3. Što su asteri? **strukture zvjezdastog oblika, centrosomi na koje su vezani zrakasti mikrotubuli**
4. Navedite 5 enzima uključenih u replikaciju DNA u bakterije *E. coli* i jednom rečenicom opišite ulogu svakoga od njih.

**DNA giraza - razmotava DNA**

**primaza - sinteza RNA početnice**

**DNA ligaza - kovalentno povezuje Okazakijeve fragmente**

**DNA polimeraza I - uklanja RNA početnicu**

**DNA polimeraza III - produljenje DNA lanca**

1. Koje strukturne promjene doživljava hnRNA u procesu transformacije u mRNA?

**izrezivanje introna, dodavanje metilske kape na 5' kraju i poliadeninskog repa na 3' kraju**

1. Što je genom? **ukupni genetski materijal nekog organizma; geni i svi ostali nekodirajući nizovi nukleotida**
2. Koji rRNA idu u koju podjedinicu ribosoma kod eukariota i prokariota?

**prokarioti: velika - 5S, 23S => 50S, mala - 16S => 30S**

**eukarioti: velika - 5S, 28S, 5.8S => 60S, mala - 18S => 40S**

1. Kako se zovu sekvence koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza? **palindromske sekvence**
2. Što je proteom? **skup svih bjelančevina i proteomskih oblika koje organizam proizvodi tijekom života**
3. start kodon: AUG, stop kodoni: UAA, UAG, UGA
4. **4 komponente u PCR-u: termostabilna DNA polimeraza, PCR termoblok, ciljna DNA, primer**