Biološki odsjek PMF-a Sveučilišta u Zagrebu

# PRAKTIKUM IZ GENETIKE - SKRIPTA

Urednica: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Autori: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

dr.sc. Ivan Biruš

dr. sc. Petra Cvjetko

dr. sc. Tomislav Horvat

dr. sc. Nenad Malenica

dr. sc. Jelena Mlinarec

mag. mol. biol. Vedrana Vičić

Zagreb, 2013.

# CITOLOŠKA OSNOVA NASLJEĐIVANJA

Svi živući organizmi mogu se podijeliti s obzirom na građu stanice na: ***prokariote*** (organizmi koji nemaju pravu jezgru) i ***eukariote*** (organizmi koji imaju pravu jezgru odijeljenu od citoplazme jezgrinom membranom). U prokariota genetički je materijal dvolančana kružna molekula DNA koju još nazivamo bakterijski „kromosom“ ili nukleoid. Bakterijske stanice često imaju i samostalne malene kružne dvolančane molekule DNA ili plazmide. U eukariota genetički materijal predstavljaju kromosomi u jezgri omeđenoj jezgrinom ovojnicom. Kromosomi su linearne dvolančane molekule DNA udružene s proteinima (histonskim i nehistonskim). Interfazna eukariotska jezgra građena je od nukleoproteina odnosno kromatina.

## Značajke mitoze i mejoze

Eukariotska stanica dijeli se mitozom ili mejozom. Mitozi i mejozi prethodi udvostručenje molekule DNA (replikacija DNA) koje se odvija tijekom S faze interfaze staničnog ciklusa. **Mitoza** je ekvacijska dioba kojom se uz pomoć diobenog vretena odvajaju sestrinske kromatide (udvostručena molekula DNA; svaku kromatidu čini jedna dvolančana molekula DNA) u novonastale stanice kćeri. Mitoza obuhvaća jednu *kariokinezu* (dioba jezgre) i jednu *citokinezu* (dioba citoplazme) po staničnom ciklusu. Mitozom nastaju dvije stanice kćeri koje imaju isti broj kromosoma i genetički su identične međusobno i u odnosu na majčinsku stanicu. Produkti mitoze mogu se dalje mitotski dijeliti. Mitozom se dijele tjelesne (somatske) stanice.

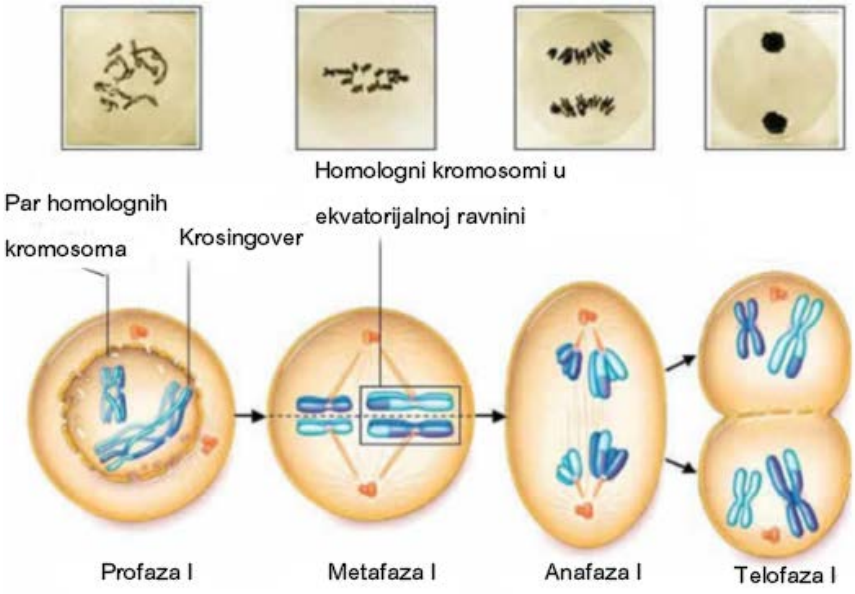
**Mejoza** je dioba kojom nastaju spolne stanice ili gamete životinja odnosno spore u biljaka. Mejozom se reducira broj kromosoma na polovičan čime se u zigoti, nakon oplodnje, osigurava isti broj kromosoma iz generacije u generaciju. Proces mejoze obuhvaća dvije diobe: ***redukcijsku diobu*** prilikom čega se razdvajaju homologni kromosomi iz bivalenata, i ***ekvacijsku diobu*** prilikom čega se razdvajaju sestrinske kromatide iz svakog od dva homologna kromosoma tako da svaka nova stanica kćerka, produkt mejoze, dobije po jedan kromosom. Mejoza se sastoji od 2 kariokineze i 2 citokineze. Između redukcijske diobe (mejoza I) i ekvacijske diobe (mejoza II) ne događa se replikacija molekule DNA.

Produkti mejoze ne mogu ponovo ući u mejozu ali se mogu dalje dijeliti mitotski. Mejoza se odvija u specijaliziranim stanicama germinative linije te započinje sa spolnom zrelošću višeg organizma (izuzetak su neke gljive i alge gdje se mejoza javlja još u zigoti).

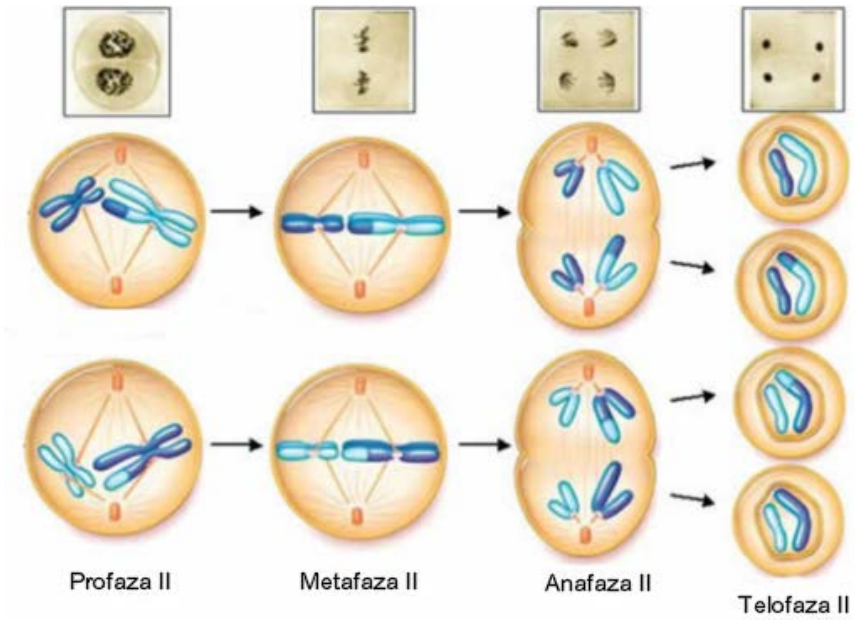
## Značenje mejoze

Značenje mejoze je u održavanju stalnog broja kromosoma vrste tako da gamete uvijek dobiju samo jedan kromosomski set (haploidni). Drugo njezino značenje je u nasumičnoj orijentaciji i odvajanju homolognih kromosoma u anafazi I mejoze čime se dobiva veliki broj različitih kromosomskih kombinacija u gametama. Na primjer, čovjek ima 23 para kromosoma. U svaku gametu može doći samo jedan kromosom svakoga para koji međutim može biti ili majčina ili očeva porijekla pa će prema tome nastati 223 = 8,388,608 različitih kombinacija gameta. Treće značenje mejoze je krosingovera (engl. crossing-over = prekriženje) u profazi I

mejoze. Krosingover je izmjena homolognih dijelova nesestrinskih kromatida homolognih kromosoma koji rezultira još većim brojem kombinacija alela. Proces stvaranja novih kombinacija alela bilo krosingoverom bilo nezavisnom segregacijom homolognih kromosoma u anafazi I mejoze nazivamo rekombinacijom. Ako znamo da čovjek ima oko 25.000 gena predstavljenih s dva alela onda mejozom potencijalno može nastati 225.000 različitih gameta.




Mejoza I – redukcijska dioba

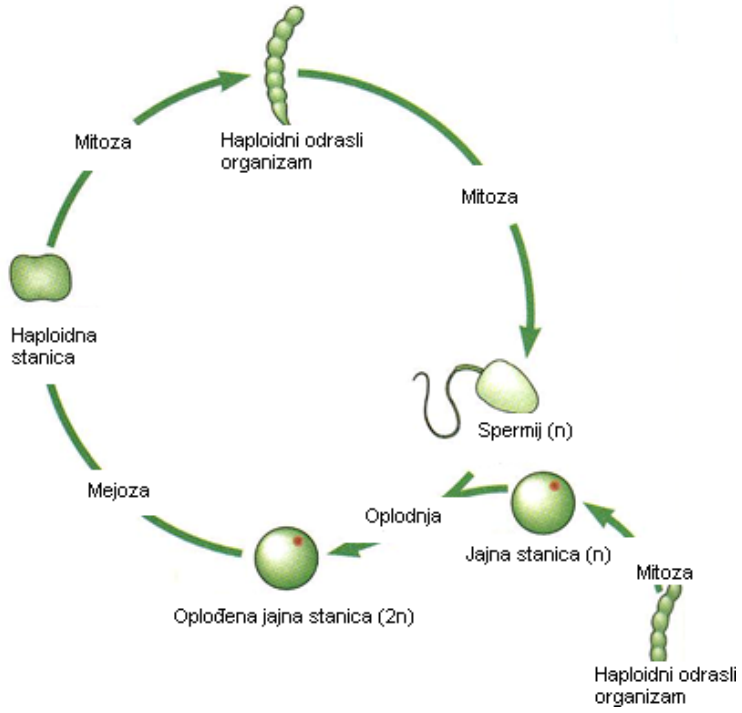



Mejoza II – ekvacijska dioba

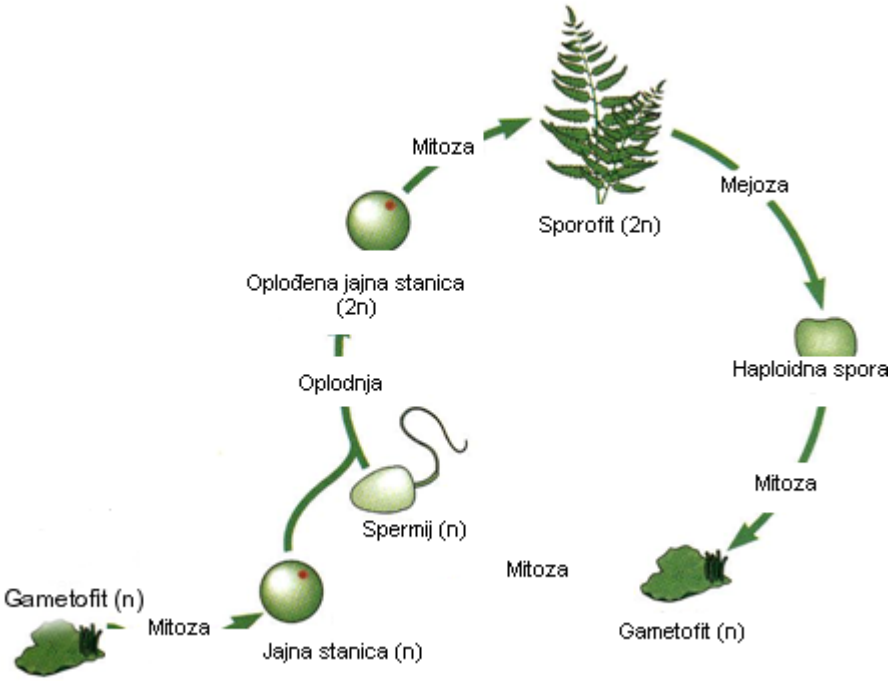
## ŽIVOTNI CIKLUSI

Životne cikluse prema trajanju diploidne (2n) i haploidne (n) faze dijelimo u:

**HAPLOIDNI ŽIVOTNI CIKLUS** – imaju ga praživotinje, gljive, jednostanične zelene alge i nitaste alge. To su haploidi organizmi. Diploidna je faza reducirana samo na jednu stanicu, zigotu koja nastaje oplodnjom tj. spajanjem gameta. Zigota se odmah nakon oplodnje dijeli mejotski dajući haploidne spore koje, kada prokliju, mitotskim diobama rastu u haploidni organizam.




**HAPLO-DIPLOIDNI ŽIVOTNI CIKLUS (IZMJENA GENERACIJA)** – imaju ga mahovine i paprati, te biljke cvjetnice. Taj životni ciklus predstavlja izmjenu haploidne i diploidne faze. Kod mahovina i paprati mejozom nastaju haploidne spore iz kojih se razvija haploidni gametofit. Gametofit nosi spolne organe (gametangije) u kojima se proizvode gamete mitozom. Proces nastajanja spolnih stanica ili gameta općenito se naziva gametogeneza. Fuzija gameta daje zigotu iz koje se mitotskim diobama razvije diploidni sporofit.




Kod **mahovina** (Bryophyta) odrasla jedinka je haploidni gametofit koji nosi spolne organe ili gametangije. U gametangijima se stvaraju gamete mitozom, koje onda oplodnjom daju zigotu. Iz zigote naraste mitotskim diobama diploidan sporofit koji nosi sporogon, a u njemu se stvaraju spore mejozom. Spore kliju u protonemu ili prokličnicu koja predstavlja samostalni muški odnosno ženski gametofit.

**Papratnjače** (Pterydophyta) imaju dominantni diploidni sporofit. Na poleđini listova višegodišnje paprati nalazimo soruse sa sporangijima u kojima se stvaraju spore mejozom. Spore kliju u samostalni haploidni gametofit, protalij, na kojemu se razviju muški odnosno ženski spolni organi (anteridiji odnosno arhegoniji). U anteridijima i arhegonijima stvaraju se gamete mitozom. Oplodnjom u vodi nastaje zigota iz koje se razvija sporofit.

U **cvjetnica** (Angiospermae) odrasla biljka je diploidni sporofit dok je gametofit reduciran na svega nekoliko stanica. Muški gametofit je to peludno zrno koje koji nastaje mejozom u muškom cvijetu (peludno zrno ima tri haploidne jezgre: 2 spermalne jezgre i 1 vegetativna jezgra). Ženski gametofit je embrionska vreća sa 8 jezgara koje nastaju trima kariokinezama unutar haploidne megaspore koja nastaje mejozom. Jajna jezgra i diploidna sekundarna jezgra odnosno osam jezgara (jajna jezgra i diploidna sekundarna jezgra su funkcionalne jezgre, dok ostalih pet jezgara propada). Proces nastajanja muških odnosno ženskih gameta naziva se mikrosporogeneza odnosno megasporogeneza. Kada pelud padne na njušku tučka i proklije u peludnu mješinicu uz pomoć vegetativne jezgre dolazi do dvostruke oplodnje gdje jedna spermalna jezgra oplodi jezgru jajne stanice te nastane embrij (2n), a druga spermalna jezgra oplodi sekundarnu jezgru embrionske vreće te nastane endosperm (3n).

**DIPLOIDNI ŽIVOTNI CIKLUS** – imaju sisavci uključujući i čovjeka, te neke alge i gljive

Ovi su organizmi diploidni, a samo su im gamete haploidne. Muške spolne stanice (spermiji) nastaju u muškim spolnim žlijezdama (testisima) spermatogenezom: u jednom ciklusu od jedne spermatogonije nastaju 4 zrela haploidna spermija. Oogenezom nastaju ženske spolne stanice (jajašca) u ženskim spolnim žlijezdama (jajnicima): u jednom ciklusom od jedne oogonije nastaje jedno zrelo jajašce i tri polocite.

## ZADACI:

1. Koja je razlika između: a) kromosoma i kromatida, b) sestrinskih i nesestrinskih kromatida, c) homolognih i nehomolognih kromosoma? Objasnite razlike s genetičkog stajališta.

2. Zamislimo tri para homolognih kromosoma s označenim centromerima: A/a, B/b, C/c. Svaki se kromosom odvaja od svog homolognog para. Koliko različitih gameta može stvoriti ova jedinka? (za lakše rješavanje ovog zadatka primijenite sistem dihotomskog grananja)

3. Koliko vrsta gameta stvaraju jedinke sljedećih genotipova:

   a) AABBCc,

   b) aaBbccDd,

   c) AaBbccDd,

   d) AABbCcddEeFf?

4. Diploidan broj kromosoma konja je 2n = 64, a magarca 2n = 62. Koliko kromosoma će imati hibrid (mula), nastao križanjem mužjaka magarca i ženke konja? Koliki je maksimalni broj bivalenata koji se teoretski mogu formirati u profazi I?

5. Somatske stanice neke cvjetnice imaju diploidan broj kromosoma 2n = 24. Koliko će navedenih struktura biti prisutno u naznačenim stadijima mitoze i mejoze?

   a) centromera u anafazi mitoze
   b) centromera u anafazi I
   c) kromatida u metafazi I
   d) kromatida u anafazi mitoze
   e) kromosoma u anafazi mitoze
   f) kromosoma u metafazi I
   g) kromosoma na kraju telofaze I
   h) kromosoma u telofazi II

6. Koliko će spermija nastati iz deset primarnih spermatocita (stanice koje nakon sazrijevanja ulaze u mejozu), a koliko jajnih stanica iz deset primarnih oocita (stanice koje nakon sazrijevanja ulaze u mejozu)?

7. Koliko se kromosoma nalazi u normalnoj:

   a) sekundarnoj spermatociti čovjeka,

   b) spermatogonij,

   c) primarnoj oociti,

   d) polociti?

8. Koliko funkcionalnih spermija odnosno jajnih stanica stvara:

   a) mikrosporocita,

   b) primarna oocita,

   c) ootida,

   d) polarno tijelo?

9. Diploidan broj kromosoma kukuruza (Zea mays) je 2n = 20. Koliko se kromosoma može očekivati u:

   a) produktu mejoze (mikrospora ili megaspora)

   b) megaspori nakon prve kariokineze

   c) polarnoj jezgri

   d) spermalnoj jezgri

   e) mikrosporociti

   f) stanici lista

   g) zreloj embrionskoj vreći (nakon propadanja nefunkcionalnih jezgara)

   i) jajnoj jezgri

   j) stanici endosperma

   k) embriju?

10. Kakav će biti genotip triploidnog endosperma nakon samooprašivanja dihibridnog kukuruza Ako poznajete genotip endosperma da li možete odrediti genotip embrija?

11. Kada biljka kromosomskog tipa Aa opraši biljku kromosomskog tipa Aa koji se kromosomski tipovi mogu očekivati u embriju i endospermu nakon dvostruke oplodnje?

## GENI I KROMOSOMI

Geni su dijelovi molekule DNA koji nose uputu za sintezu proteina i molekula RNA potrebnih stanici, odnosno organizmu. Svaki gen se nalazi na točno određenom mjestu na kromosomu koji se zove ***genski lokus***. Gen koji određuje neko svojstvo (npr. oblik ušne resice) nalazi se na paru homolognih kromosoma u istom genskom lokusu.

Kod diploidnih organizama u somatskim stanicama postoje stoga dvije kopije istoga gena koje nazivamo ***alelima***. Jedinku koja nosi iste alele jednoga gena na paru homolognih kromosoma nazivamo ***homozigot***, a jedinku koja nosi različite alele jednoga gena nazivamo ***heterozigot***.

Ako su u nekoj jedinki svi genski lokusi homozigotni tada tu jedinku nazivamo ***čista linija*** (dobiva se samooplodnjom ili križanjem vrlo srodnih jedinki kroz veliki broj generacija). ***Hibridi*** su heterozigoti za sva promatrana svojstva, a nastaju križanjem genetički različitih roditelja. ***Monohibrid*** je heterozigot za jedan genski lokus tj.jedan par alela (jedno svojstvo). Dihibrid je heterozigot za dva para alela (dva promatrana svojstva), trihibrid je heterozigot za tri para alela (tri promatrana svojstva) itd.

Svi geni na jednom kromosomu čine jednu ***grupu vezanih gena***; kažemo da su geni vezani jer se nalaze na istoj molekuli DNA, odnosno kromosomu. Kod diobe kromosoma prilikom mitoze i mejoze, kromosom nosi sa sobom sve genske lokuse, koji se nalaze na njemu, u novu stanicu pa se, prema tome, ti geni nasljeđuju zajedno (osim u slučaju kada dolazi do krosingovera izmedu određenih genskih lokusa). Geni koji se nalaze na različitim kromosomima nasljeđuju se neovisno jedan od drugoga.

Aleli istoga gena mogu biti u različitim odnosima unutar genotipa o čemu ovisi fenotip:

- ***Potpuna dominacija***: Dominantni alel uvijek je vidljiv odnosno izražen u fenotipu. homozigotnog (AA) i heterozigotnog (Aa) genotipa. Alel koji se izražava u fenotipu jedino u homozigotnom genotipu (aa) nazivamo recesivni.
- ***Kodominantni aleli***: Oba alela u heterozigotnom genotipu su izražena u fenotipu. Primjer – MN i AB krvne grupe u čovjeka: genotip MN i IAIB, bolest srpasta anemija: genotip HbAHbS, boja dlake u stoke i dr.
- ***Nepotpuna dominacija***: Heterozigot predstavlja fenotipski intermedijer između dva homozigotna tipa (potomak je fenotipski intermedijer svojih roditelja). Primjer – ružičasta boja cvijeta zijevalice. Genotip DBDS označava nepotpuno-dominantni odnos.
- ***Letalni aleli*** – geni čija je fenotipska ekspresija letalnost prenatalnoj ili postnatalnoj fazi razvoja:

***Recesivna letalnost*** – izražena samo u homozigotom genotipu.

***Dominantna letalnost*** – gen koji ubija i u homozigotnom i heterozigotnom genotipu. Jedinke s dominantnim letalnim genom umiru prije nego što mogu dati potomke pa je dominantni letalni gen uklonjen iz populacije u istoj generaciji u kojoj se i pojavio.

Objašnjenje pojmova važnih u genetici:

**Genetika** – znanost o nasljeđivanju, nasljeđuju se jedinice nasljeđivanja ili geni.

**Gen** - slijed nukleotida u molekuli DNA koji nosi uputu za sintezu proteina i molekule RNA.

**Genom** – cijeli set gena virusa i prokariota, odnosno haploidni set gena eukariotskog organizma (cijeli set gena u gameti).

**Genotip** – genetička konstitucija neke jedinke (skup svih alela neke jedinke).

**Fenotip** – mjerljivo svojstvo (morfološka ili pak biokemijska osobina) nastalo kao rezultat međudjelovanja genotipa i okoliša (npr. morfološka osobina - boja kose, biokemijska osobina – krvna grupa u ljudi).

**Kromosom** - molekula DNA pakirana uz pomoć proteina u citološki vidljivu jezgrinu jedinicu. Metafazni kromosom predstavlja maksimalno kondenzirani transportni oblik jezgrine jedinice.

**Kariotip** - skup svih kromosoma u jednoj stanici. Kariotip je karakterističan za svaku vrstu organizma.

**Homologni kromosomi** – par kromosoma različitog porijekla (majčin i očev) koji su morfološki jednaki, nose gene za ista svojstva, a u genetičkom smislu se mogu razlikovati u setu alela na istom genskom lokusu.

**Genski lokus** – mjesto na kromosomu u kojem se nalazi gen za određeno svojstvo. U diploidnih eukariotskih organizama genski lokus čine dvije alternativne forme (aleli) od koje se svaka nalazi na jednom od dva homologna kromosoma.

**Homozigotni genski lokus** sadrži dva ista alela, dok heterozigotni genski lokus čine dva različita alela istoga gena.

**Homozigot** – organizam koji ima iste alele u određenom genskom lokusu na dva homologna kromosoma. Stvara samo jednu vrstu gameta (primjer: genotip AA stvara gamete tipa A).

**Heterozigot** – organizam koji ima dva različita alela u određenom genskom lokusu, po jedan alel na svakom od dva homologna kromosoma. Stvara dvije vrste gameta s

jednakom učestalošću (primjer: genotip Aa stvara 50% gameta s alelom A, a 50% gameta s alelom a)

**Čista linija** – jedinka homozigotna za sva promatrana svojstva.

**Hibrid** – jedinka heterozigotna za sva promatrana svojstva, nastala križanjem genetički različitih roditelja.

## ZADACI:

1. Nacrtajte par homolognih kromosoma i označite sestrinske kromatide. Odaberite dva različita genska lokusa te označite alele u slučaju da je jedinka homozigot za jedan lokus, a heterozigot za drugi lokus!

2. Neka vrsta ima diploidni broj kromosoma 2n=6 od kojih je jedan par kromosoma telocentričan, drugi je par subtelocentričan i treći je par metacentričan. A, B i C lokusi nalaze se na odvojenim kromosomima i sva tri lokusa predstavljena su s dominantnim i recesivnim alelima na homolognim kromosomima. Nacrtajte shematski jedan od mogućih ishoda mejoze označavajući lokuse na kromosomima (dovoljno je prikazati metafazu I, anafazu I i telofazu II).

   a) Koliko različitih gameta može nastati mejozom u ove vrste ako isključimo događaj krosingovera?

   b) Kakvu ćemo varijabilnost dobiti u genotipu gameta ako se između lokusa A i centromera istog kromosoma dogodi krosingover?

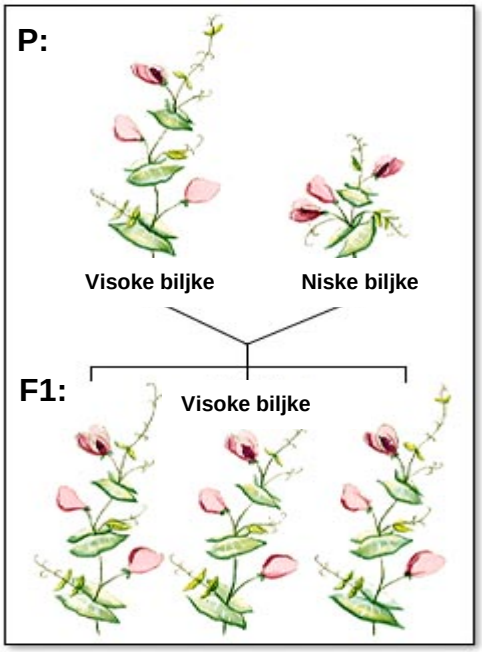
3. Neki hipotetski organizam ima 2n= 4 kromosoma. Poznato je 50 gena u njegovu genomu od kojih je svaki predstavljen s dva alela. Ako je jedinka ove vrste heterozigot za sve poznate genske lokuse koliko različitih gameta je moguće dobiti procesom mejoze:

   a) ako se svi geni ponašaju nezavisno

   b) ako su svi geni potpuno vezani?

# 1. MONOHIBRIDNO KRIŽANJE I ZAKON SEGREGACIJE

Gregor Mendel je od 1856. do 1860. godine pratio nasljeđivanje 7 **monogenskih*** svojstava vrtnoga graška. U svojim je istraživanjima kao polazni biljni materijal koristio čiste linije (homozigotni genotip) za ta svojstva. Kada je križao čiste linije (parentalna ili roditeljska generacija, P generacija: npr. grašak visoke stabljike s graškom niske stabljike), u prvoj filijalnoj ili sinovljevoj ($F_1$) generaciji dobivao je sve visoke biljke (fenotip) što se opisuje *Zakonom uniformnosti* (slika 1.1.). U drugoj filijalnoj ili sinovljevoj ($F_2$) generaciji (potomci dobiveni samooplodnjom biljaka F1 generacije), dobio je potomke od kojih je većina imala visoke stabljike, no neki su imali niske stabljike. Mendel je prebrojavanjem potomaka utvrdio da je visokih biljaka bilo tri puta više od niskih. Na sličan je način pratio nasljeđivanje ostalih 6 svojstava.




**Slika 1.1:** Križanje graška: parentalna (P) i filijalna ($F_1$) generacija.

U svim slučajevima utvrdio je da se u $F_1$ generaciji izražava samo jedan od dva alternativna fenotipa, dok su u $F_2$ generaciji zastupljena oba fenotipa u omjeru 3:1 što čini fenotipski omjer $F_2$ generacije **monohibridnog križanja****.

Zaključio je slijedeće:

**(a)** u svakoj se somatskoj stanici biljke graška nalaze dva nasljedna faktora za jedno svojstvo, od kojih se samo jedan prenosi u sljedeću generaciju (spolna stanica ili gameta prenosi samo jedan od dva alela nekog gena),

**(b)** u $F_1$ generaciji jedan nasljedni faktor (alel) je dominantan (vidljiv, izražen u fenotipu), a drugi je „skriven“ (recesivan alel),

**(c)** dva nasljedna faktora (alela) razdvajaju se jedan od drugoga tijekom gametogeneze (razdvajanje alela odvija se u anafazi I ili anafazi II mejoze), a zatim se slobodno kombiniraju s nasljednim faktorom (alelom) druge jedinke.

---

* Monogensko svojstvo: svojstvo kontrolirano jednim genom ili jednim parom alela (za razliku od poligenskog svojstva kontroliranog s 2 ili više gena/parova alela).

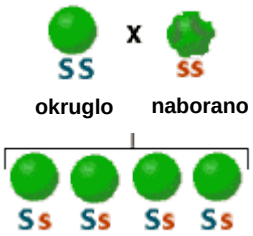
** Monohibridno križanje: križanje dva heterozigota za jedan par alela (jedno svojstvo ).

**Mendelov prvi zakon nasljeđivanja** ili **zakon segregacije:** par alela za neko svojstvo razdvaja se ili **segregira** tijekom stvaranja gameta* tako da svaka gameta dobije po jedan alel. Fizička osnova segregacije alela je razdvajanje homolognih kromosoma u anafazi I ili sestrinskih kromatida u anafazi II mejoze. Ako se alel za visoku stabljiku nalazi na jednom kromosomu, a alel za nisku stabljiku na njegovom homolognom paru, jasno je da se ti aleli ne mogu naći zajedno u istoj gameti.

**Test-križanje („*test-cross*“)**

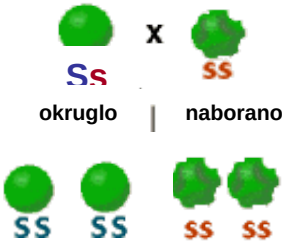
Dva različita fenotipa – okrugla i naborana sjemenka graška - određena su s 3 različita genotipa (SS, Ss, ss). Dominantni fenotip (okrugla sjemenka) određen je s dva različita genotipa (SS i Ss). Da bi u nekoj populaciji graška otkrili genotip graška dominantnog fenotipa moramo napraviti križanje tih biljaka s recesivnim homozigotom (ss). Križanje biljke nepoznatog genotipa s recesivnim homozigotom naziva se ***test-križanje***. Iz fenotipskog omjera $F_1$ generacije test-križanja možemo zaključiti o genotipu roditelja: ako je roditelj bio homozigot u $F_1$ generaciji dobit ćemo sve fenotipski iste biljke (okrugla sjemenka), a ako je roditelj bio heterozigot križanje će dati dvije fenotipski različite klase potomaka (okrugla sjemenka : naborana sjemenka) u omjeru 1:1.

a) jedinka dominantnog fenotipa je homozigot




*100% potomaka dominantnog fenotipa*

b) jedinka dominantnog fenotipa je heterozigot



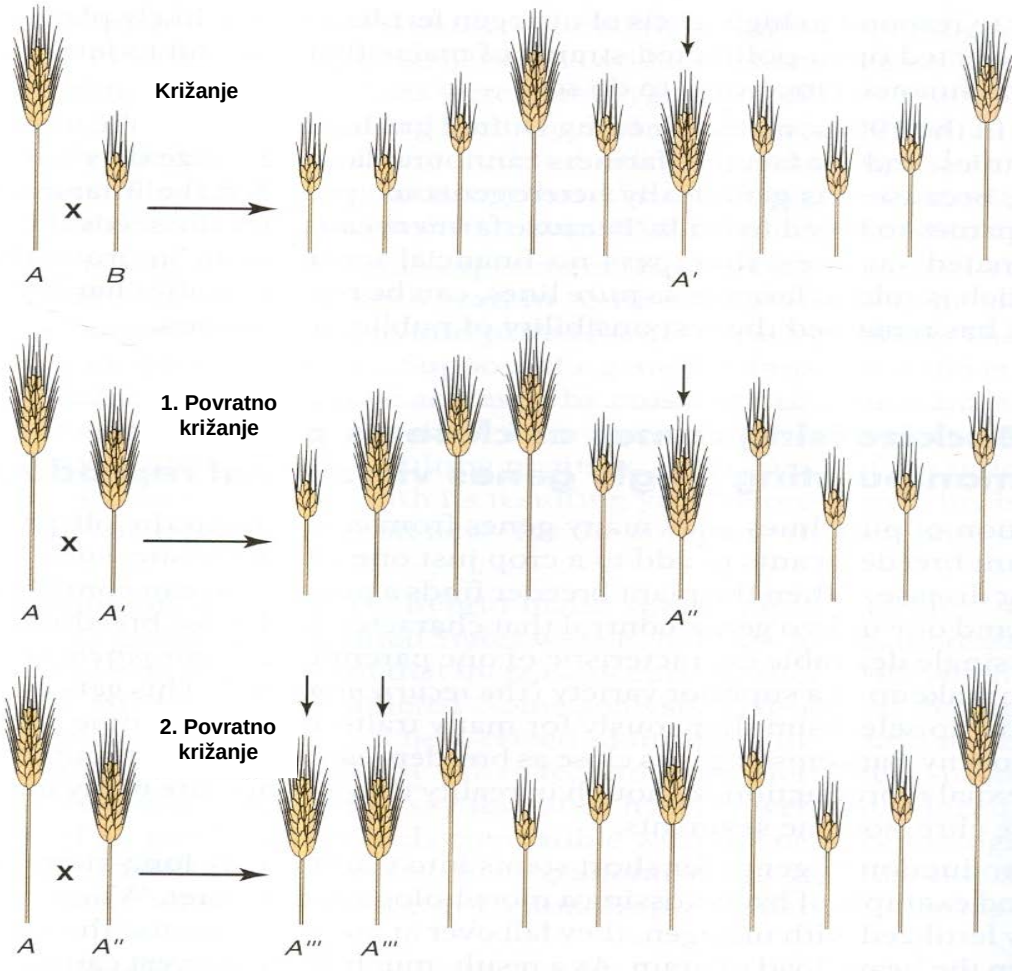

*50% potomaka dominantnog fenotipa i 50% potomaka recesivnog fenotipa (omjer 1:1)*

---

*Gametogeneza – proces nastajanja gameta koji uključuje mejozu

## Povratno križanje („*backcross*“)

Povratno križanje je križanje hibrida* (jedinke $F_1$ generacije) s jednim od roditelja ili s jedinkom roditeljskog genotipa. Ova vrsta križanja primjenjuje se u tradicionalnom oplemenjivanju biljaka (slika 1.2.) i domaćih životinja, kao i kod stvaranja transgeničnih/transgenih biljaka ili *knockout** miševa.




**Slika 1.2.** Prikaz križanja kultivirane biljke velikog klasa i visoke stabljike (*A*) s divljim (nekultiviranim) srodnikom malog klasa niske stabljike (*B*), s ciljem dobivanja biljke velikog klasa i niske stabljike (A') u $F_2$ generaciji. Konačni cilj je u nekoliko ciklusa povratnog križanja dobiti jedinku *A'''* koja je genetički gotovo istovjetna roditelju genotipa *A* osim u svojstvu za dužinu stabljike.

Iako je Mendel utvrdio zakone nasljeđivanja na primjeru svojstava određenih jednim genom, osobine u biljaka, životinja te u čovjeka mogu biti, i najčešće jesu, određene s više gena. Takva se svojstva nazivaju ***poligenska svojstva***. Neka poligenska svojstva u čovjeka su: boja očiju, boja kose, visina, težina, inteligencija. Također, razvoj kompleksnih bolesti poput srčanih bolesti, dijabetesa i raka, uvjetovan je mutacijama u više gena. U čovjeka je poznato puno monogenskih nasljednih bolesti čije je nasljeđivanje lako pratiti (jer su uvjetovane promjenom u samo jednom genu) analizom rodoslovlja. Mogućnost otkrivanja genetičkih bolesti vrlo je važna u planiranju obitelji.

*Hibrid – jedinka heterozigotna za sve parove alela; jedinka nastala križanjem genetički različitih roditelja.
*****Knockout* miš: miš-mutant kod kojeg je ciljano inaktiviran samo jedan gen.

## PRIMJERI DOMINANTNO-RECESIVNOG NASLJEĐIVANJA MONOGENSKIH OSOBINA KOD ČOVJEKA

| DOMINANTNO | RECESIVNO |
|---|---|
| Ušni režanj slobodan | Ušni režanj srašten |
| Uho s Darwinovom kvrgom | Uho bez Darwinove kvrge |
| Uho bez snopa dlačica | Snop dlačica na obodu uha |
| Ušni režanj s rupicom | Ušni režanj bez rupice |
| Ivica kose na sredini čela izvijena | Ravna ivica kose na čelu |
| Deformirani nokti („Nail patella“ sindrom) | Normalni nokti i patela |
| Bijeli pramen u kosi kod muškaraca | Bijeli pramen u kosi kod žena |
| Ćelavost kod muškaraca | Prorijeđenost kose kod žena |
| Tamna kosa | Crvena kosa |
| Rupica na bradi (kost) | Bez rupice na bradi |
| Kratki prsti (brahidaktilija) | Normalna dužina prstiju |
| Više prstiju (polidaktilija) | Normalan broj prstiju |
| Nemogućnost savijanja palaca (distalna hiperekstenzibilnost) | Distalna hiperekstenzibilnost palca (savijanje i do 45%) |
| Posljednji članak malog prsta savijen ka domalom | Mali prst ravan |
| Dlačice na srednjem članku prstiju | Odsustvo dlačica na srednjem članku svih prstiju |
| Sposobnost uzdužnog savijanja jezika | Nesposobnost uzdužnog savijanja jezika |
| Normalna usta | Zečja usna |
| Sposobnost poprečnog savijanja jezika | Nesposobnost poprečnog savijanja jezika |
| Lijevi palac preko desnog | Desni palac preko lijevoga (pri sklopljenim šakama) |
| Kažiprst kraći od četvrtog prsta kod muškaraca | Kažiprst kraći od četvrtog prsta kod žena |
| Dvije tetive u korijenu šake | Tri tetive u korijenu šake |
| Maljavost | Odsustvo maljavosti |
| Pjegavost (izražena) | Odsustvo pjegavosti |
| Osjećanje gorkog okusa feniltiokarbamida (PTC) | Nesposobnost osjećaja gorčine PTC-a |
| Osjećanje okusa brucina | Nesposobnost osjećaj brucina |

| | |
|---|---|
| **Katarakt očiju** | **Zdrave oči** |
| **Normalan vid** | **Kratkovidnost** |
| **Normalno razlikovanje boja** | **Sljepoća za boje** |
| **Normalna pigmentacija** | **Albinizam** |
| **Normalan metabolizam** | **Alkaptonurija (Tyr), fenilketonurija(Phe)** |
| **Normalno zgrušavanje krvi** | **Hemofilija** |

**O osnovnim pojmovima vjerojatnosti:**

OSNOVNA PRAVILA:

I. Ako je potpuno sigurno da će se nešto dogoditi, vjerojatnost je 1.

II. Vjerojatnost da će se između N događaja, koji su jednako vjerojatni i međusobno nezavisni, dogoditi jedan određeni, jest 1/N.

III. Ukupna vjerojatnost da će se dogoditi dva ili više nezavisnih događaja, je umnožak vjerojatnosti svakog od tih događaja (tzv. **„i“** pravilo). Npr. vjerojatnost dobivanja dvije uzastopne četvorke bacanjem kocke je 1/6 x 1/6 = 1/36.

IV. Ukupna vjerojatnost da će se dogoditi dva ili više međusobno isključivih događaja, je zbroj vjerojatnosti svakog pojedinačnog događaja (tzv. **„ili“** pravilo). Npr. vjerojatnost dobivanja četvorke ili šestice jednim bacanjem kocke je 1/6 + 1/6 = 2/6.

## Praktičan rad

**Pribor:**

- sterilizirane sjemenke $F_2$ generacije vrste *Arabidopsis thaliana* (uročnjak) u plastičnim epruveticama (tubama)
- kvadratne petrijevke s neselektivnom podlogom: PN(-S)
- kvadratne petrijevke s herbicidom komercijalnog naziva BASTA (glufozinat-amonijeva sol ili fosfinotricin: inhibitor glutamin sintetaze)
- sterilne čačkalice
- mikropipete
- sterilni žuti nastavci za mikropipete
- parafilm

## Opis praktičnog zadatka:

Nasađivat će se $F_2$ generacija (sjemenke) monohibridnog križanja (divlji tip x mutant) biljke uročnjak (*Arabidopsis thaliana*; Slika 1.3.) na umjetnu hranjivu podlogu.

**Slika 1.3.** Uročnjak prikazan u fazama od klijanja (lijevo gore) do cvatnje (sredina). Uvećano su prikazani cvijet, cvat i sjemenke (desno).

Rad je organiziran u četiri skupine po četiri studenta. Svaka skupina dobiva sljedeći pribor: a) petrijevku sa neselektivnom hranjivom podlogom, b) petrijevku s dodatkom herbicida BASTA, c) sterilne čačkalice, d) mikropipetu, e) žute nastavke za mikropipetu, f) parafilm, g) dvije tube s otprilike stotinjak $F_2$ sjemenki, prethodno steriliziranih, h) tube sa steriliziranim sjemenkama roditeljskog genotipa. Dvoje studenata iz svake skupine nasađuju sjemenke na podlogu bez herbicida, a ostali na podlogu s herbicidom. U oba slučaja potrebno je na podloge nasaditi i oko desetak sjemenki obje roditeljske linije radi upoznavanja fenotipova čija se segregacija prati (divlji tip: **Col** i mutante: ***wol1*** ili ***mop2***).

Na podlogama bez herbicida pratit će se segregacija morfološkog fenotipa mutante ***wol1*** (vaš zadatak je da uočite razliku između fenotipa divljeg tipa i mutanta).

Na podlogama s herbicidom pratit će se segregacija rezistencije na herbicid mutante ***mop2***. Gen za rezistenciju na herbicid BASTA (BAR– fosfinotricin acetiltransferaza) nalazi se na T-DNA ugrađenoj u genom mutanta ***mop2*** posredstvom bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

Nasađivanje se izvodi pomoću mikropipete i žutih nastavaka ili sterilnim čačkalicama, u komori sa sterilnim protokom zraka (**laminar**) ili na radnim mjestima pored upaljenog plamenika. Nakon nasađivanja, petrijevke treba zatvoriti ljepljivom trakom (**parafilm**) i inkubirati u komori za biljke (**fitotron**) u sljedećim uvjetima: 22°C, 16 sati svjetla, 8 sati tame. Sljedeći tjedan, svaka skupina će razvrstati proklijale biljčice u fenotipske skupine i dobivene omjere statistički analizirati $\chi^2$- testom (hi-kvadrat).

## ZADACI:

1. Crna boja zamoraca je dominantno svojstvo, a bijela recesivno. Crni homozigotni zamorac križan je s bijelim. Koliki dio crnih zamoraca iz $F_2$ generacije će biti heterozigotan?

2. Parilo se dvoje crnih zamoraca istog genotipa. Dobiveno je 29 crnih i 9 bijelih potomaka. Kakav je genotip njihovih roditelja?

3. Heterozigotni crni zamorac križan je s homozigotnim bijelim. Navedite fenotipske i genotipske omjere koje očekujete od povratnog križanja crnih potomaka s: a) crnim roditeljem; b) bijelim roditeljem

4. Crna vuna/runo ovaca je određena recesivnim alelom *b*, bijela vuna/runo dominantnim alelom *B*. Bijeli heterozigotni ovan križan je s bijelom heterozigotnom ovcom. Iz tog križanja dobiven je bijeli ovan koji je povratno križan sa ženskim roditeljem. Koja je vjerojatnost da potomstvo tog križanja ima crnu vunu/runo?

5. Križan je grašak zelenog (recesivno) zrna s graškom žutog (dominantno) zrna. Od potomstva je 36 biljaka imalo zeleno zrno, a 31 žuto zrno. Prikažite ovo križanje.

6. U čovjeka albinizam uzrokuje recesivni alel *a*, dok je normalna pigmentacija pod kontrolom dominantnog alela *A*. Roditelji normalne pigmentacije imaju albino dijete. Koja je vjerojatnost da će:

   a) sljedeće dijete biti albino?
   b) slijedeća dva djeteta biti albino?
   c) sljedeće troje djece imati normalnu pigmentaciju?
   d) drugo dijete biti albino, a treće normalne pigmentacije?
   e) od sljedeće dvoje djece jedno biti albino, a drugo normalne pigmentacije?

7. Pretpostavimo da je kod ljudi plava boja očiju recesivno svojstvo. Žena smeđih očiju i muškarac plavih očiju imaju plavooko dijete. Koja je vjerojatnost da će slijedeće troje djece imati plave oči?

8. Pretpostavimo da je kod ljudi plava boja očiju recesivno svojstvo. Žena smeđih očiju i muškarac plavih očiju imaju plavooko dijete. Koja je vjerojatnost da će slijedeće troje djece biti plavooke kćeri?

9. Pretpostavimo da je kovrčava kosa kod ljudi recesivno svojstvo, a ravna kosa dominantno. Koja je vjerojatnost da će dvoje roditelja ravne kose imati kćer kovrčave kose?

10. Cistična fibroza je bolest uzrokovana recesivnom autosomalnom mutacijom. Ako su oba (zdrava) roditelja nosioci mutiranog alela i imaju troje zdrave djece, koja je vjerojatnost da će njihovo četvrto dijete imati cističnu fibrozu.

11. Mladi bračni par je posjetio specijalista za nasljedne bolesti („*genetic counselor*“) zbog toga što svaki od njih ima brata ili sestru koji su oboljeli od cistične fibroze dok niti jedan supružnik niti njihovi roditelji nemaju ovu bolest (cistična fibroza je recesivna bolest).

    a) Koja je vjerojatnost da je žena nositelj bolesti?
    b) Koje je vjerojatnost da njihovo dijete oboli od cistične fibroze?
    c) Koja je vjerojatnost da će njihovo dijete biti nositelj mutacije koja uzrokuje cističnu fibrozu?

12. „Tay-Sacs“ je recesivna letalna bolest živčanog sustava u ljudi. Javlja se u ranoj životnoj dobi. Bolest je rijetka u ljudskoj populaciji općenito, no česta u Židova iz središnje Europe. Žena, čiji je ujak obolio od te bolesti, pokušava odrediti vjerojatnost da ona i njen muž imaju bolesno dijete. Njezin otac ne pripada visoko-rizičnoj skupini ljudi, a muževa sestra je umrla od te bolesti.

    a) Nacrtajte porodično stablo te napišite genotipove gdje je moguće.
    b) Odredite vjerojatnost da bračni par ima bolesno dijete.

13. Plod rajčice može biti crvene ili žute boje. Križane su biljke slijedećih fenotipova

| Roditelji: | Potomstvo: |
|---|---|
| crvena x crvena | 61 crvena |
| crvena x crvena | 47 crvena, 16 žutih |
| crvena x žuta | 58 crvenih |
| žuta x žuta | 64 žute |
| crvena x žuta | 33 crvene, 36 žutih |

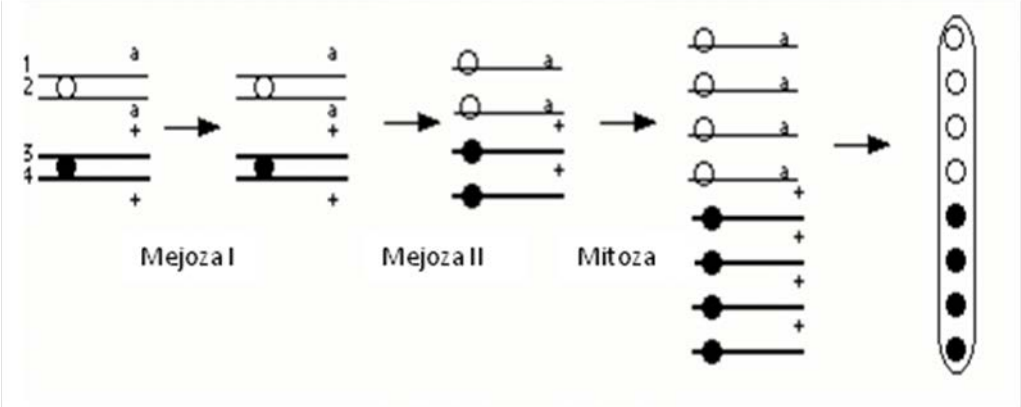
    a) Koji je fenotip dominantan?
    b) Koji su genotipovi roditelja i potomaka navedenih križanja?

14. Križanjem dviju zijevalica dobiveno je slijedeće potomstvo: 83 s ružičastim cvijetom, 35 sa crvenim cvijetom i 36 s bijelim cvijetom.

    a) Koji su genotipovi i fenotipovi roditeljskih biljaka?
    b) Koji se genotipovi/fenotipovi očekuju u potomstvu slijedećih križanja (navedite omjer):

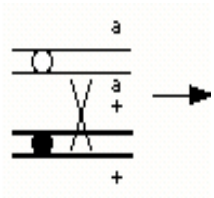
- crveno x crveno
- crveno x bijelo
- ružičasto x bijelo

15. Križanjem dvaju sojeva krušne plijesni (*Neurospora crassa*) od kojih jedan stvara crne spore (+), a drugi žutosmeđe (a) spore, dobiven je slijedeći raspored spora u askusima:



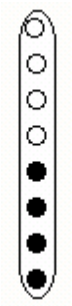

a) Objasnite sliku.

b) Kakav raspored spora očekujete u askusima u slijedećem primjeru? Dovršite sliku.

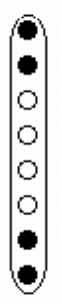



c) U kojoj je fazi mejoze došlo do segregacije alela u slijedećim askusima?

**A**

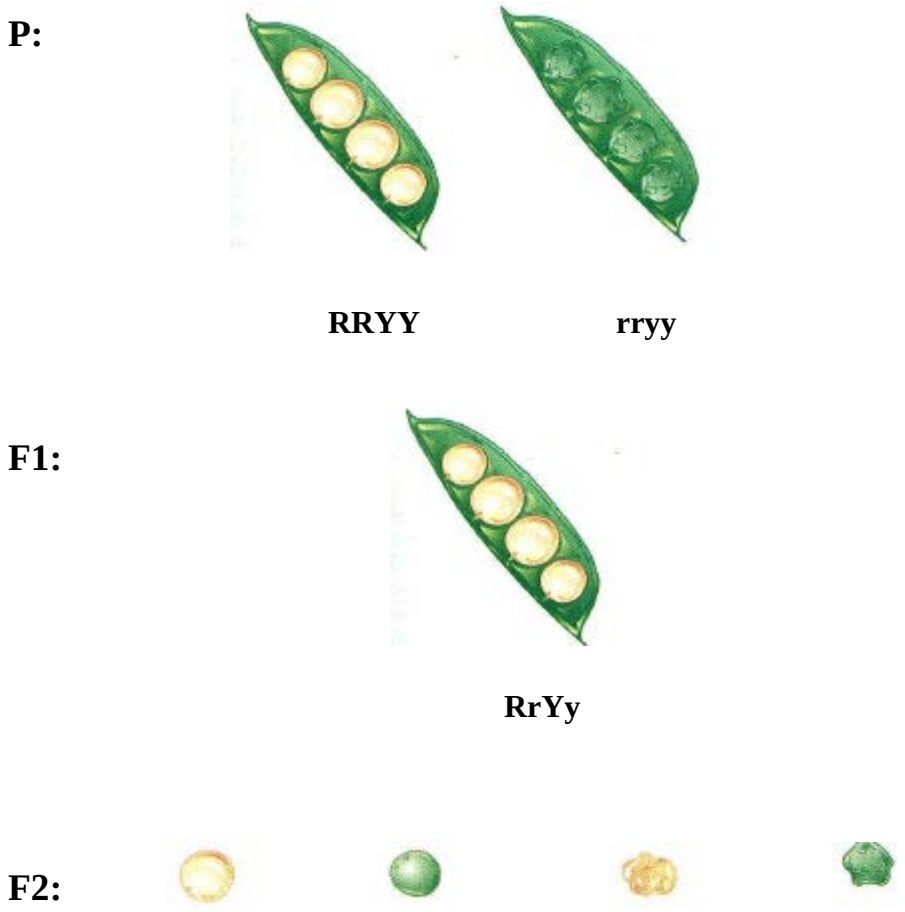


**B**



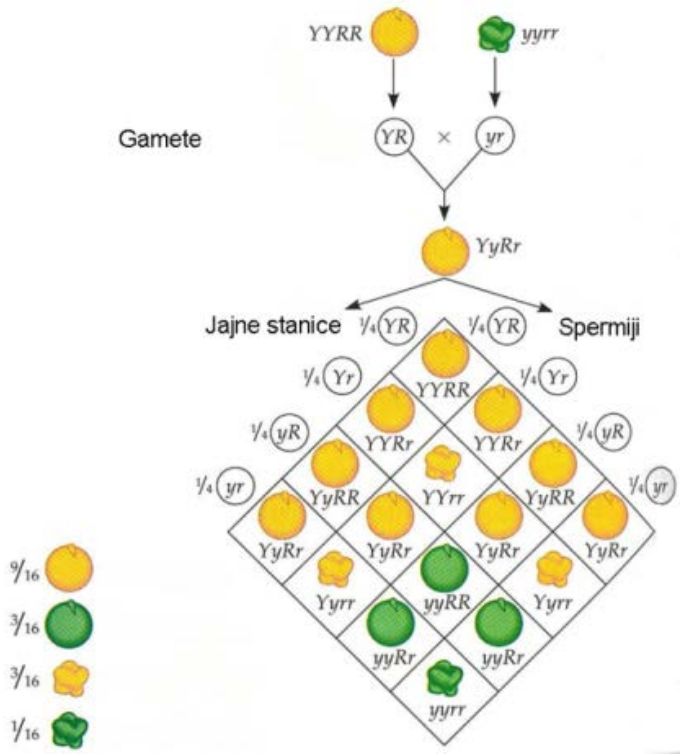
## 2. DIHIBRIDNO KRIŽANJE I ZAKON NEZAVISNE SEGREGACIJE

Mendel je promatrao i nasljeđivanje dvaju svojstava istovremeno (npr. boja i oblik zrna graška). Križao je homozigotne biljke za ova svojstva i u $F_1$ generaciji dobio sve biljke okruglog i žutog zrna što mu je pokazalo da je žuto zrno dominantno nad zelenim i okruglo nad naboranim. Kada je međusobno križao heterozigote (jedinke $F_1$ generacije), u $F_2$ generaciji dobio je sve moguće kombinacije ovih dviju osobina: 315 biljaka bilo je okruglog i žutog zrna, 108 biljaka bilo je okruglog i zelenog zrna, 101 biljka bila je naboranog i žutog zrna i 32 biljke bile su naboranog i zelenog zrna (slika 2.1.). Dobiveni fenotipski omjer 9:3:3:1 očekuje se ako se geni, koji određuju dva svojstva, nasljeđuju jedan neovisno o drugome (nalaze se na dva različita kromosoma):
Roditelji proizvode samo jedan tip gameta pa su svi potomci $F_1$ generacije heterozigoti za oba




**Slika 2.1.** Dihibridnim križanjem ($F_1$) nastaju **č**etiri fenotipske klase potomaka u $F_2$ generaciji.

svojstva (***dihibridi***). Ako se ovakve biljke, potomci $F_1$ generacije, dalje međusobno križaju svaki od njih dat će četiri tipa gameta s istom učestalošću.
Svaka od 4 različite gamete muškog roditelja može se spojiti s bilo kojom od 4 vrste gameta ženskog roditelja, što daje 16 različitih kombinacija prikazanih Punnett-ovim kvadratom (omjeri fenotipova i genotipova izraženi su šesnaestinama jer postoji 16 kombinacija) (slika 2.2.).




**Slika 2.2.** Genotipovi i fenotipovi $F_2$ generacije nastale dihibridnim križanjem ($F_1$).

Ako grupiramo potomke $F_2$ generacije prema fenotipu vidjet ćemo da:

9/16 potomaka ima okruglo i žuto zrno
3/16 potomaka ima okruglo i zeleno zrno
3/16 potomaka ima naborano i žuto zrno
1/16 potomaka ima naborano i zeleno zrno

Rezultati Mendelovih istraživanja kasnije su formulirani u Mendelov 2. zakon odnosno ***zakon nezavisne segregacije***: kada se dva ili više parova alela nasljeđuju zajedno, oni segregiraju nezavisno jedan od drugog kao rezultat ponašanja kromosoma za vrijeme mejoze (nasumična orijentacija bivalenata u metafazi I).

Danas znamo da je fizička osnova 2. Mendelovog zakona nasumična orijentacija kromosomskih parova (bivalenata) u metafazi I te razdvajanje homolognih kromosoma iz bivalenata u anafazi I mejoze čime se aleli jednoga gena nezavisno segregiraju od alela drugoga gena. Ako se alel za visoku stabljiku nalazi na jednom kromosomu, a alel za nisku stabljiku na njegovom homolognom kromosomu, jasno je da se ti aleli ne mogu naći zajedno u istoj gameti. Nadalje, zbog nasumične orijentacije bivalenata u metafazi I mejoze moguće su četiri kombinacije alela u gametama ($2^2$) ako pratimo nasljeđivanje dvaju svojstava npr. boju i oblik zrna graška. Analogno tome, u čovjeka, koji u somatskim stanicama ima 46 kromosoma, zbog nasumične orijentacije bivalenata moguće je dobiti $2^{23}$ kombinacija u gametama.

**<u>Broj različitih genotipova, fenotipova i gameta za *n*-hibridno križanje:</u>**

**$4^n$- broj mogućih ishoda (broj polja u Punnett-ovom kvadratu)**

**$3^n$- broj mogućih genotipova**

**$2^n$- broj mogućih fenotipova ili broj različitih gameta obzirom na promatrana svojstva**

**$1/(2^n)^2$- broj recesivnih homozigota u $F_2$**

**n- broj <u>heterozigotnih</u> lokusa**

Pravilni genotipski i fenotipski omjeri monohibridnih, dihibridnih, trihibridnih itd. križanja vrijede samo ako se aleli promatranih genskih lokusa nasljeđuju nezavisno te ako je svako promatrano svojstvo određeno samo jednim genom. U eukariotskim organizmima, odnosi među genima često nisu potpuno nezavisni što rezultira modifikacijom klasičnih Mendelovih omjera. Modifikacije su posljedica nekoliko genetičkih fenomena: odnosa multiplih alela (više od dva alela istog gena na razini populacije), genskih interakcija, vezanih gena (bilo na autosomima ili spolnim kromosomima), i/ili citoplazmatskog nasljeđivanja.
U tablici 1 navedeni su neki klasični i modificirani omjeri nasljeđivanja svojstava.

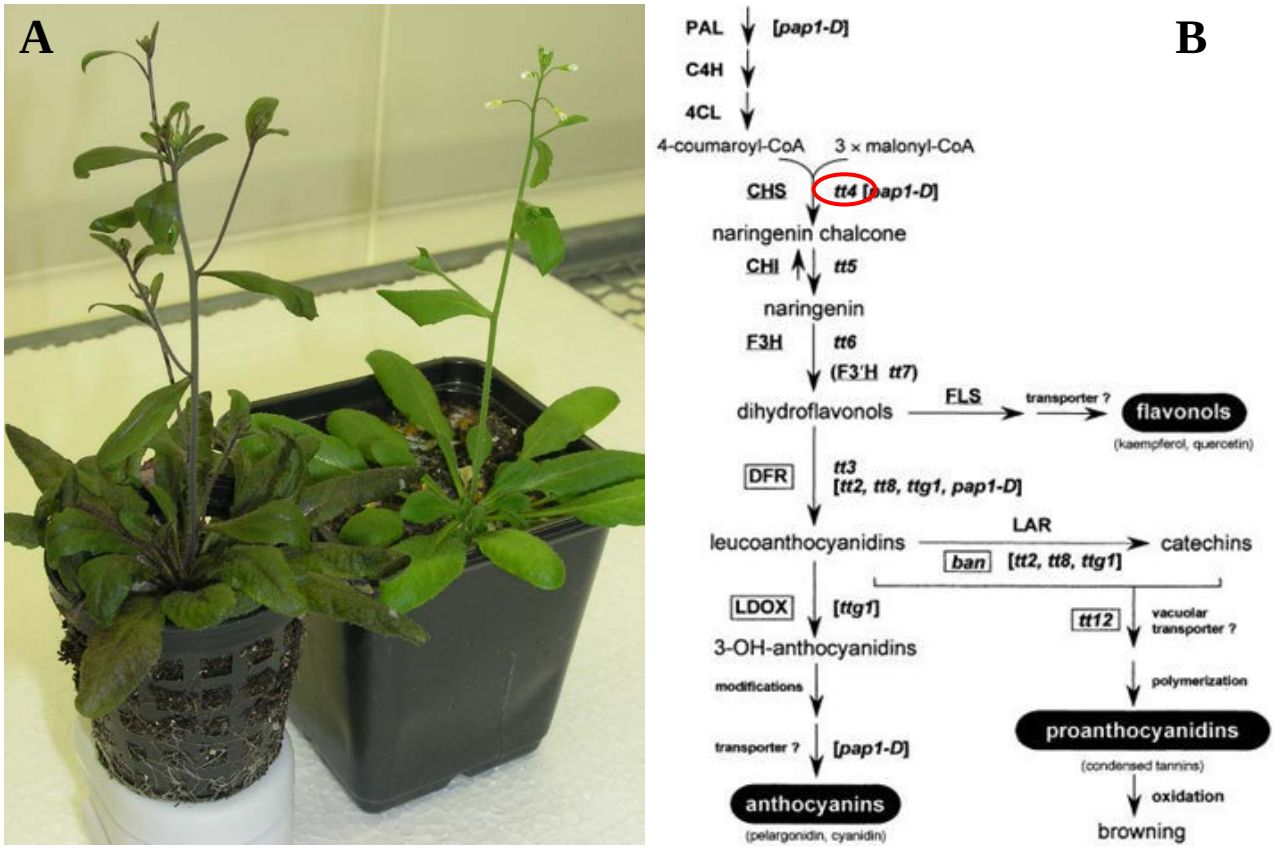
**Tablica 2.1.** Fenotipski (i/ili genotipski) omjeri različitih vrsta križanja

| **Omjer:** | **Interpretacija:** |
|---|---|
| 1:1 | Monohibridno test križanje. |
| 1:1:1:1 | Dihibridno test križanje. |
| 1:2:1 | Genotipski ili fenotipski omjer monohibrida u slučaju nepotpune dominacije ili kodominacije alela |
| 1:2 | Monohibridni genotipski ili fenotipski omjer u slučaju letalnih alela (recesivnog ili dominantnog) |
| 3:1 | Monohibridni fenotipski omjer. |
| 9:3:3:1 | Dihibridni fenotipski omjer. |
| 12:3:1 | Dominantna epistaza. |
| 9:3:4 | Recesivna epistaza. |
| 15:1 | Barem jedan dominantni alel dovoljan je za stvaranje fenotipa. |
| 9:7 | Oba dominantna alela potrebna su za stvaranje fenotipa. |
| 9:6:1 | Svi jednostruki recesivni homozigoti daju intermedijarni fenotip. |

## <u>Praktičan rad</u>

U ovoj vježbi nasađivat će se potomci $F_2$ i $F_3$ generacije dihibridnog križanja uročnjaka na hranjivu podlogu u kvadratnoj petrijevki. Pratit ćete segregaciju crveno obojenih biljaka. Obje roditeljske biljke (parentalna generacija) su fenotipski zelene. Jedna roditeljska linija (*RD2*) ima inaktiviran gen za sintezu pigmenta antocijanina (*TT4*) smješten na samom početku antocijaninskog biosintetskog puta (slika 2.3.B). Ista linija ima transgen (*35S::MYB*) koji konstitutivno (trajno) eksprimira transkripcijski faktor *MYB* važan za aktivaciju nekoliko gena u spomenutom biosintetskom putu antocijana. Drugi roditelj je divlji tip biljke *A. thaliana* ekotipa *Col* s kojim smo se susreli u prošloj vježbi.

Studenti rade u četiri skupine. Svaka skupina sastoji se od dvije podskupine. Prva podskupina nasađuje potomke $F_2$ generacije navedenog križanja, a druga podskupina potomke $F_3$ generacije. Potrebno je zasaditi oko stotinjak sjemenki na svaku podlogu (4 reda po 20-25 sjemenki). Sjemenke će se nasađivati pomoću mikropipete sa žutim nastavkom ili sterilnim čačkalicama. Nakon nasađivanja, petrijevke se zatvaraju parafilmom i inkubiraju u komori za biljke u sljedećim uvjetima: 22°C, 16 sati svjetla, 8 sati tame. Za tjedan dana svaka skupina će svrstati proklijale biljčice u fenotipske klase (crvene : zelene) i dobivene omjere statistički analizirati hi-kvadrat testom.




**Slika 2.3.** (A) Jedinka u cvatu vrste *Arabidopsis thaliana* koja hiperakumulira (nakuplja) antocijanine (crvenkasto-smeđa biljka lijevo). Divlji tip u istoj razvojnoj fazi (intenzivno zelene boje, desno). (B) Biosintetski put antocijanina. Crveno je zaokružen gen *TT4* koji kodira za prvi enzim u sintezi antocijanina CHS.

### Analiza genetičkih omjera hi-kvadrat ($X^2$) testom

Da bismo procijenili točnost neke hipoteze (tzv. nul-hipoteze ili $H_0$) potreban nam je test koji može analizirati veličinu odstupanja (devijacije) opaženih rezultata od očekivanih vrijednosti, odnosno koji može razlikovati da li su izmjerena odstupanja statistički značajna ili su posljedica slučajnosti. U slučaju dihibridnog križanja u našem eksperimentu $H_0$ glasi: nema statistički značajne razlike između očekivanih i eksperimentalnih omjera tj. opaženo odstupanje je posljedica slučajnosti.

$X^2$ test (hi-kvadrat) izražava vjerojatnost koja pokazuje koliko je odstupanje (devijacija) od očekivanih vrijednosti rezultat slučajnosti, a ne nekog određenog faktora ili fenomena tj. da li možemo prihvatiti ili odbaciti našu $H_0$ hipotezu.

Vrijednost $X^2$ testa izračunava se prema jednadžbi:

$$\chi^2 = \Sigma (E- T)^2 / T$$

**E**= eksperimentalna vrijednost

**T**= teoretska vrijednost

**(E-T)** = odstupanje ili devijacija

$X^2$ test mora uzeti u obzir i broj varijabli koje ispitujemo (tzv. stupnjevi slobode).

Broj stupnjeva slobode df (*„degree of freedom“*) jednak je broju razreda (klasa) umanjenom za jedan. Razred označava broj fenotipskih ili genotipskih klasa nekog križanja (broj varijabli). Na primjer, u dihibridnom križanju postoji 9 genotipskih klasa, stoga je broj stupnjeva slobode 9-1=8. Po istom principu, za fenotipski omjer dihibridnog križanja broj stupnjeva slobode je: 4-1=3.

U biologiji se kao granična vjerojatnost da je neko odstupanje posljedica slučajnosti uzima 0,05 tj. 5% (P=0,05). Ukoliko je vjerojatnost da je odstupanje posljedica slučajnosti veća od 0,05 (P>0,05) prihvaćamo $H_0$ hipotezu. Ukoliko je P≤ 0,05, devijacija između očekivanih i opaženih vrijednosti je statistički značajna (posljedica je nekog drugog faktora, a ne slučajnosti) pa moramo odbaciti $H_0$ hipotezu. Kod $X^2$ testa računamo $X^2$ vrijednost za neki eksperiment te je uspoređujemo s graničnom $X^2$ vrijednosti. Granična $X^2$ vrijednost iščitava se iz tablice na temelju stupnjeva slobode kod vjerojatnosti 0,05 (Tablica 2). Ako je dobivena $X^2$ vrijednost manja ili jednaka graničnoj vrijednosti, $H_0$ se prihvaća, a ako je veća, $H_0$ se odbacuje.

## Eksperimentalni model prikaza rezultata dihibridnog križanja

Uzmite po dvije kovanice od 1 kune i dvije kovanice od 50 lipa. Kune predstavljaju par alela za boju sjemenke, a lipe predstavljaju par alela za oblik sjemenke – znači pratimo dihibridno križanje. Glava kovanice označava dominantno svojstvo, a pismo recesivno svojstvo.
Kovanice dobro protresite, bacite na klupu i unesite kombinacije glava-pismo koje ste dobili nakon bacanja u slijedeću tabelu. Izvedite ukupno 100 bacanja koja predstavljaju genotipove 100 potomaka dihibridnog križanja.

| Razred | 1 kuna | 50 lipa | Genotip | Očekivano (T) | Dobiveno (E) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | GP | GP | BbLl | 25,00 | |
| 2 | GG | GP | BBLl | 12,50 | |
| 3 | PP | GP | bbLl | 12,50 | |
| 4 | GP | GG | BbLL | 12,50 | |
| 2 | GP | PP | Bbll | 12,50 | |
| 6 | GG | PP | BBll | 6,25 | |
| 7 | PP | GG | bbLL | 6,25 | |
| 8 | GG | GG | BBLL | 6,25 | |
| 9 | PP | PP | bbll | 6,25 | |

Genotipski omjer dihibridnog križanja: $3^n=3^2=9$ klasa (1:2:1:2:4:2:1:2:1)

Izračunajte vrijednost hi-kvadrat testa, potražite je u tablici i komentirajte rezultat!

**Tablica 2.2.** Granične vrijednosti hi-kvadrata ($X^2$). Zaokružena je granična vrijednost $X^2$ za jedan stupanj slobode i vjerojatnost p= 5% (0,05).

| Broj stupnjeva slobode (df) | Vjerojatnost (p) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.95 | 0.90 | 0.80 | 0.70 | 0.50 | 0.30 | 0.20 | 0.10 | 0.05 | 0.01 | 0.001 |
| 1 | 0.004 | 0.02 | 0.06 | 0.15 | 0.46 | 1.07 | 1.64 | 2.71 | 3.84 | 6.64 | 10.83 |
| 2 | 0.10 | 0.21 | 0.45 | 0.71 | 1.39 | 2.41 | 3.22 | 4.60 | 5.99 | 9.21 | 13.82 |
| 3 | 0.35 | 0.58 | 1.01 | 1.42 | 2.37 | 3.66 | 4.64 | 6.25 | 7.82 | 11.34 | 16.27 |
| 4 | 0.71 | 1.06 | 1.65 | 2.20 | 3.36 | 4.88 | 5.99 | 7.78 | 9.49 | 13.28 | 18.47 |
| 5 | 1.14 | 1.61 | 2.34 | 3.00 | 4.35 | 6.06 | 7.29 | 9.24 | 11.07 | 15.09 | 20.52 |
| 6 | 1.63 | 2.20 | 3.07 | 3.83 | 5.35 | 7.23 | 8.56 | 10.64 | 12.59 | 16.81 | 22.46 |
| 7 | 2.17 | 2.83 | 3.82 | 4.67 | 6.35 | 8.38 | 9.80 | 12.02 | 14.07 | 18.48 | 24.32 |
| 8 | 2.73 | 3.49 | 4.59 | 5.53 | 7.34 | 9.52 | 11.03 | 13.36 | 15.51 | 20.09 | 26.12 |
| 9 | 3.32 | 4.17 | 5.38 | 6.39 | 8.34 | 10.66 | 12.24 | 14.68 | 16.92 | 21.67 | 27.88 |
| 10 | 3.94 | 4.86 | 6.18 | 7.27 | 9.34 | 11.78 | 13.44 | 15.99 | 18.31 | 23.21 | 29.59 |

**<u>Dodaci:</u>**

***Monohibridno križanje (1 gen)***

| | **A** | **a** |
|---|---|---|
| **A** | **AA** | **Aa** |
| **a** | **Aa** | **aa** |

**FENOTIPSKI OMJER:**

| | |
|---|---|
| **3** | **1** |

**n=1**
**Fenotipske klase $(2^n)=2^1=2$**
**Genotipske klase $(3^n)=3^1=3$**
**Udio recesivnih homozigota $1/(2^n)^2=1/(2^1)^2=1$**

***Dihibridno križanje (2 gena)***

| | **AB** | **Ab** | **aB** | **ab** |
|---|---|---|---|---|
| **AB** | **AABB** | **AABb** | **AaBB** | **AaBb** |
| **Ab** | **AABb** | **AAbb** | **AaBb** | **Aabb** |
| **aB** | **AaBB** | **AaBb** | **aaBB** | **aaBb** |
| **ab** | **AaBb** | **Aabb** | **aaBb** | **aabb** |

**FENOTIPSKI OMJER:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **9** | **3** | **3** | **1** |

**n=2**
**Fenotipske klase $(2^n)=2^2=4$**
**Genotipske klase $(3^n)=3^2=9$**
**Udio dvostrukih recesivnih homozigota $1/(2^n)^2=1/(2^2)^2=1/16$**

***Trihibridno križanje (3 gena)***

| | ABD | ABd | AbD | Abd | aBD | aBd | abD | abd |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ABD | AABBDD | AABBDd | AABbDD | AABbDd | AaBBDD | AaBBDd | AaBbDD | AaBbDd |
| ABd | AABBDd | AABBdd | AABbDd | AABbdd | AaBBDd | AaBBdd | AaBbDd | AaBbdd |
| AbD | AABbDD | AABbDd | AAbbDD | AAbbDd | AaBbDD | AaBbDd | AabbDD | AabbDd |
| Abd | AABbDd | AABbdd | AAbbDd | AAbbdd | AaBbDd | AaBbdd | AabbDd | Aabbdd |
| aBD | AaBBDD | AaBBDd | AaBbDD | AaBbDd | aaBBDD | aaBBDd | aaBbDD | aaBbDd |
| aBd | AaBBDd | AaBBdd | AaBbDd | AaBbdd | aaBBDd | aaBBdd | aaBbDd | aaBbdd |
| abD | AaBbDD | AaBbDd | AabbDD | AabbDd | aaBbDD | aaBbDd | aabbDD | aabbDd |
| abd | AaBbDd | AaBbdd | AabbDd | Aabbdd | aaBbDd | aaBbdd | aabbDd | aabbdd |

**FENOTIPSKI OMJER:**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 27 | 9 | 9 | 9 | 3 | 3 | 3 | 1 |

**n=3**
**Fenotipske klase $(2^n)=2^3=8$**
**Genotipske klase $(3^n)=3^3=27$**
**Udio trostrukih recesivnih homozigota $1/(2^n)^2=1/(2^3)^2=1/64$**

## ZADACI:

1. Ispišite sve moguće genotipove koje može imati jedinka dominantnog fenotipa kod koje pratite nasljeđivanje dvaju svojstava i prikažite odgovarajuća test-križanja! Koje genotipske omjere očekujete u potomstvu?

2. Visoki rast rajčice određen je dominantnim alelom D, dok je patuljasti rast određen recesivnim alelom d. Dlakavost stabljike određuju dominantni alel H, dok je glatka stabljika određena njegovim recesivnim alelom h. S biljkom fenotipa visoka-dlakava izvršeno je križanje.
   Dobiveno je sljedeće potomstvo:

   118 visokih-dlakavih
   121 patuljastih-glatkih
   112 visokih- glatkih
   109 patuljastih-dlakavih

   a) Prikažite križanje!
   b) Koji je fenotipski omjer visokih i patuljastih biljaka, te dlakavih i glatkih?
   c) Da li se ovi lokusi nasljeđuju nezavisno jedan od drugog?

3. Jedno dihibridno križanje dalo je 217 potpuno recesivnih potomaka. Koliko je bilo ukupno potomaka?

4. Dihibridnim križanjem dobiveno je 3720 potomaka. Koliko (teoretski) očekujemo potomaka dominantnih za oba svojstva?

5. Križan je dihibridni visoki grašak žutog zrna s niskim graškom zelenog zrna. Od 2096 potomaka, koliko ih je bilo dominantno samo za jedno svojstvo.

6. Mendel je uočio da je kod graška žuta boja zrna dominantna nad zelenom i glatko okruglo sjeme nad naboranim.
   a) kakav se fenotipski omjer očekuje u $F_2$ generaciji prilikom križanja homozigotnih žutih biljaka okruglog zrna i biljaka zelenog naboranog zrna?
   b) Kakav je omjer zelenih i žutih zrna, te glatkih i naboranih zrna u $F_2$ generaciji?

7. Kakvi se fenotipski i genotipski omjeri očekuju križanjem homozigotnog zamorca crne (A), kratke (B) i priljubljene (C) dlake sa zamorcem bijele (a), duge (b) i kovrčave (c) dlake u potomstvu $F_1$ i $F_2$ generacije?

8. Kod graška žuta boja zrna dominantna je nad zelenom i glatko okruglo sjeme nad naboranim. Križali ste biljku žutog glatkog sjemena s biljkom zelenog naboranog zrna i dobili 13 biljaka žutog glatkog sjemena i 14 biljaka žutog naboranog sjemena. Kakvog su genotipa roditelji?

9. Izračunajte vjerojatnost da križanjem jedinki genotipa AABbCcDd x aaBBccDd dobijete jedinku čiji je genotip AaBbccDd?

10. Izračunajte vjerojatnost da križanjem jedinki fenotipa AaBBCcDdEE x AABBccDdee dobijete jedinku genotipa AABBccDdEe.

11. Dihibridni kukuruz je samooplodan. Prikažite moguće genotipove endosperma i embrija.

12. Novčić je bačen 10 puta: 6 puta je pala glava, a 4 puta pismo. Da li je ovaj rezultat u skladu s očekivanim omjerom 50:50?

13. Ako je novčić bačen 100 puta sa istim relativnim brojem devijacije kao u prethodnom zadatku, da li je hipoteza još uvijek prihvatljiva?

14. U $F_2$ generaciji monohibridnog križanja za visinu stabljike dobiveno je 1064 biljaka graška, 787 visokih i 277 patuljastih. Da li dobiveni omjer predstavlja omjer monohibridnog križanja 3:1?

15. Kod graška žuta boja zrna (A) dominantna je nad zelenom (a) i glatko okruglo sjeme (B) nad naboranim (b). Križali ste biljku žutog glatkog sjemena s biljkom zelenog naboranog zrna i dobili 25 biljaka žutog glatkog sjemena i 35 biljaka zelenog glatkog sjemena. Koja je hipoteza pokusa (hipoteza = očekivani fenotipski omjeri $F_1$ generacije)? Da li se hipoteza prihvaća?

16. Križanjem jedinki genotipa *AaBbCcDd* i *AabbCcDD*, koliki će biti udio potomaka koji u fenotipu izražavaju (eksprimiraju) sva četiri dominantna svojstva?

17. Ako je hipotetski autosomalni dominantni gen N neophodan za sintezu pigmenta potrebnog za normalan vid, a autosomalni dominantni gen S odgovoran za sljepoću, zbog narušavanja neuronskih sinapsi u oku, koji je udio slijepog potomstva nakon križanja jedinki genotipa Nnss x nnSs.

18. Pretpostavimo da je gen za ćelavost (B) dominantan u odnosu na svoj alel za rast kose (b) te da je gen za kovrčavu kosu (cy) recesivan u odnosu na svoj alel za ravnu kosu (Cy). Ova dva lokusa nisu vezana, a B je epistatičan u odnosu na Cy. a) Kakvo potomstvo obzirom na rast i oblik kose očekujete u križanju Bb Cycy x bb cycy?

19. Pretpostavimo da su 3 lokusa S, G i H smješteni na različitim kromosomima, pri čemu su aleli S, G i H dominantni u odnosu na alele s, g i h. Koliko različitih a) fenotipova, a koliko b) genotipova potomaka može proizaći iz križanja jedinki genotipa SsGgHH i SSGgHh?

20. Križane su dvije genetički različite sorte kukuruza s klipovima nepigmentiranog zrna: AAbb x aaBB. Svi potomci tog križanja imali su klipove ljubičastog zrna. Koji će biti fenotipski omjer $F_2$ generacije obzirom na boju zrna?

## 3. MULTIPLI ALELI - ALELNI OBLICI GENA

Do sada smo proučavali nasljeđivanje svojstava određenih parom alela koji su mogli biti u dominantno-recesivnom odnosno kodominantnom odnosu ili su pak mogli biti u odnosu nepotpune dominacije. Znači, određeni gen se u nekoj populaciji može javljati samo sa dva alelna oblika. Kako gen čini slijed od nekoliko stotina pa i do nekoliko tisuća nukleotida molekule DNA moguće je da se pri replikaciji DNA (S faza) dogode pogreške što će rezultirati manjim izmjenama u genu (spontane mutacije). Takve promjene u slijedu nukleotida tvore nove alelne oblike određenog gena. Iako je u diploidnoj jedinci gen uvijek predstavljen samo s dva alela, u populaciji jedne vrste moguće je puno različitih alela istoga gena. To su ***multipli aleli***. Svaki od ovih alela nastao kao produkt različitih mutacija jednog gena daje različitu fenotipsku ekspresiju. Odnos između tih alela može biti različit.

**Primjeri multiplih alela:**

### 1. Boja krzna kunića

Boja krzna kunića određena je sa četiri različita alela u populaciji čija ekspresija daje četiri različita fenotipa:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Fenotip: | Agouti | Činčila | Himalajski | Albino |
| Alel: | C | $c^č$ | $c^h$ | c |

**hijerarhija dominantnosti: $C > c^č > c^h > c$**

1. Ispišite sve moguće genotipove za 4 poznata fenotipa kunića.

| **Fenotip** | **Genotip** |
|---|---|
| Agouti | |
| Činčila | |
| Himalajski | |
| Albino | |

| **Broj alela u seriji** | **Broj genotipova** |
|---|---|
| 2 | 3 |
| 3 | 6 |
| 4 | 10 |
| **n** | **n/2 x (n + 1)** |

2. U kavezu za kuniće nalazila se ženka himalajskog fenotipa s albino i činčila mužjakom. Ženka je imala 8 potomaka: 2 himalajska, 4 činčila i 2 albino. Koji je kunić otac i kakvi su genotipovi ženke, mužjaka i potomstva?

3. U populaciji kunića, nalaze se tri različita fenotipa s obzirom na boju krzna: činčila (c), himalajski (h) i albino (a). Kako bi rastumačili nasljeđivanje boje krzna, križamo jedinke kunića međusobno i bilježimo rezultate u sljedećoj tablici:

| Broj križanja | roditeljski fenotip | omjer fenotipova potomstva |
|---|---|---|
| 1 | h x h | ¾ h : ¼ a |
| 2 | h x a | ½ h : ½ a |
| 3 | c x c | ¾ c : ¼ h |
| 4 | c x h | svi c |
| 5 | c x c | ¾ c : ¼ a |
| 6 | h x a | svi h |
| 7 | c x a | ½ c : ½ a |
| 8 | a x a | svi a |
| 9 | c x h | ½ c : ½ h |
| 10 | c x h | ½ c : ¼ h : ¼ a |

Što možete zaključiti o nasljeđivanju boje krzna u ovoj populaciji?

Odredite genotip roditelja u svakom od 10 križanja.
Kakvo biste potomstvo očekivali i u kojem omjeru ako križate činčila roditelje iz križanja broj 9 i 10?

## 2. Boja krzna u miševa

U miševa je boja kože i krzna određena genom A koji je u populaciji zastupljen serijom multiplih alela. Hijerarhija dominacije slična je hijerarhiji dominacije alela za boju krzna kod kunića.

| **Fenotip** | **Alel** |
|---|---|
| Žuti | $A^Y$ |
| Agouti sa svijetlim trbuhom | $A^1$ |
| Agouti | $A^+$ |
| Crno-smeđi | $a^1$ |
| Crni | a |

**hijerarhija dominantnosti: $A^y > A^I > A^+ > a^l > a$**

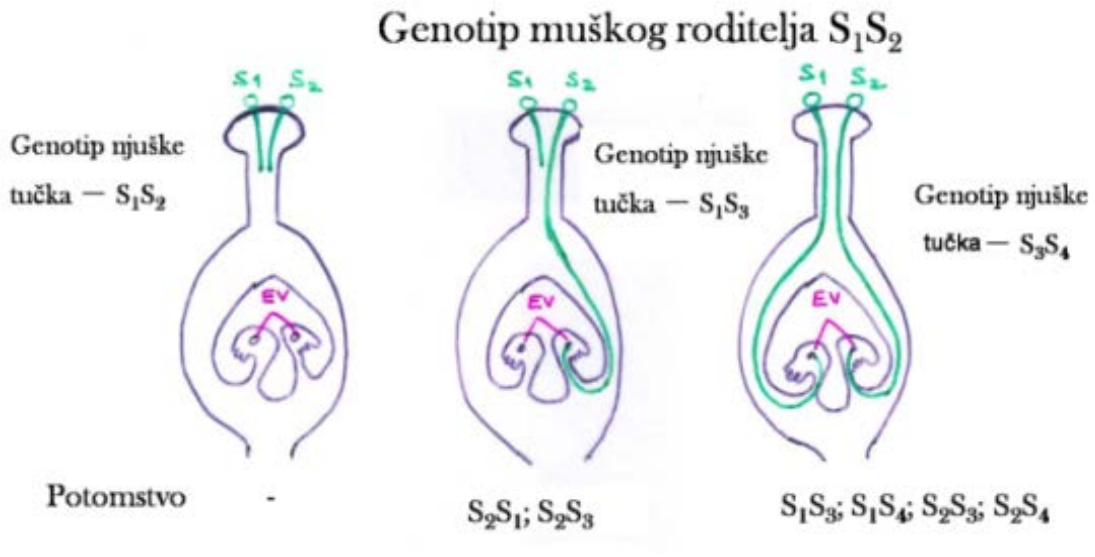
U ovoj seriji multiplih alela, alel $A^Y$ je letalan u homozigotnom stanju no u heterozigota daje žutu boju krzna.

? 4. Križali ste agouti miša sa žutim i u potomstvu dobili 4 žuta, 2 crno-smeđa i 1 agouti miša. Prikažite križanje!

## 3. Autosterilnost (inkompatibilnost) kod biljaka

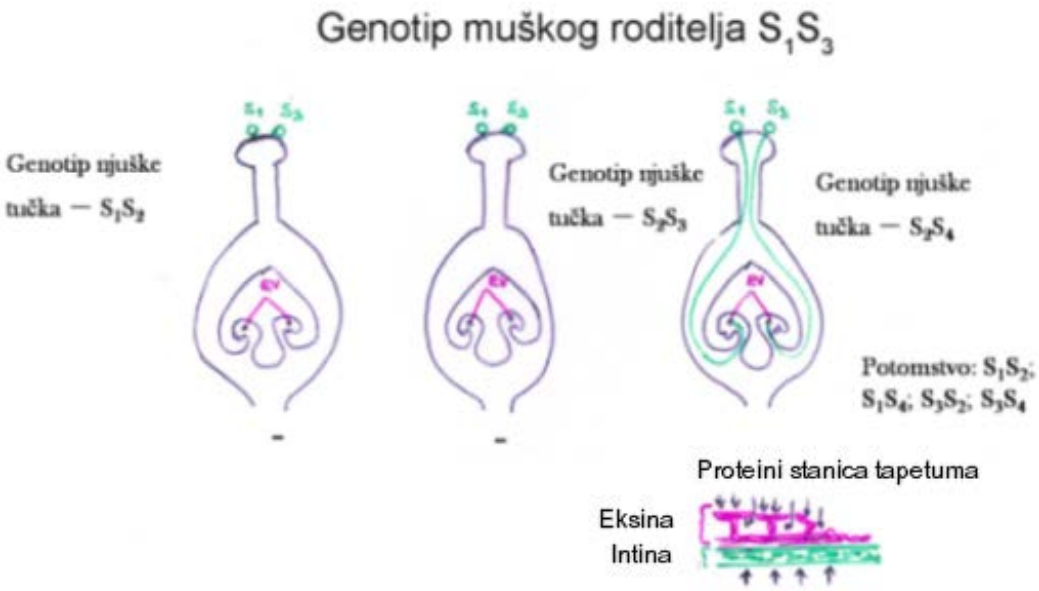
Problem samooplodnje u prirodi riješen je genetičkom kontrolom tj. uvođenjem multiplih alela u populaciju. U prirodi se favorizira raznolikost a ne istovrsnost i radi toga priroda pokušava spriječiti samooplodnju. Postoji više načina sprečavanja samoplodnje, no sustav koji nas zanima je pod kontrolom gena S koji se u populaciji javlja u mnogo alelnih formi. Odnos između alela gena S je kodominantan. Postoje dva genetičko-biokemijska mehanizma kontrole samooplodnje ovisna o alelnom obliku gena S:

**a) Gametofitska autosterilnost** (*Poaceae*) – kontrolirana je haploidnim genotipom peludnog zrna (gametofit). Ako stigma tučka ženske biljke sadrži alel koji se nalazi u genotipu peludnog zrna neće doći do klijanja peludne mješinice (slika 3.1.). U slučaju kada se genotip stigme (oba alela) razlikuje od alela prisutnog u peludnom zrnu doći će do klijanja peludne mješinice.




**Slika 3.1.** Gametofitska inkompatibilnost.

**b) Sporofitska autosterilnost** (*Cruciferae*, *Compositae*) – kontrolirana je diploidnim genotipom muškog roditelja (sporofit), a ne haploidnim genotipom peludnog zrna (slika 3.2.). Muški gametofit zatvoren je unutar zida od dva sloja (unutrašnjeg pektoceluloznog sloja i vanjskog sporopoleninskog sloja). Faktori prepoznavanja (inhibirajući faktori) nalaze se na vanjskoj ovojnici peludnog zrna eksini i ekspresija su genotipa diploidnog tkiva tapetuma antere muškog roditelja. Na površini stigme se pak nalaze jednostanične papile s peptoceluloznim zidom i kutikulom. Kada je pelud kompatibilan sa stigmom, enzimi koje luči peludna mješinica otopit će kutikulu na površini stigme. Ako je pelud inkompatibilan sa stigmom tada će se u njihovoj dodirnoj zoni nakupljati kaloza te će rast muškog gametofita biti zakočen.




**Slika 3.2.** Sporofitska inkompatibilnost.

? 5. Kod djeteline postoji čitav niz samoinkompatibilnih alela, tako da haploidan pelud ne može klijati i oploditi sjemeni zametak koji nosi isti alel. U tablici je navedena serija samoinkompatibilnih alela: $S^1$, $S^2$,$S^3$ i $S^4$. Koji se genotipski omjeri embrija i endosperma očekuju prilikom sljedećih križanja (gametofitska inkopatibilnost)?

| | Majka | Otac |
|---|---|---|
| 1) | $S^1S^1$ | $S^1S^2$ |
| 2) | $S^1S^2$ | $S^1S^2$ |
| 3) | $S^1S^3$ | $S^2S^4$ |
| 4) | $S^2S^3$ | $S^3S^4$ |

## 3. Bijela V – šara lista djeteline (*Trifolium repens*)

Bijela V - šara lista djeteline određena je genom V prisutnim u populaciji u puno alelnih formi. Neki od alela su u dominantno-recesivnom odnosu dok su neki aleli u kodominantnom odnosu. Odsutnost šare je recesivno svojstvo. Različite lisne šare pokazuju kodominantni odnos.

## 4. Geni sustava tkivne snošljivosti

Daleko najpolimorfniji sustav multiplih alela u ljudi čine aleli glavnog sustava tkivne snošljivosti (engl. major histocompatibility complex, MHC). Geni ovog sustava kodiraju membranske proteine čija je zadaća prezentacija vlastitih i stranih proteinskih fragmenata stanicama imunološkog sustava. Najpoznatiji iz ove porodice gena su geni HLA sustava (engl. human leukocyte antigen) čiji su proteinski produkti glavni uzročnici odbacivanja tkiva nakon transplantacije. Šest je glavnih gena HLA sustava: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR. Svaki od ovih gena zastupljen je u populaciji s nekoliko stotina alela.

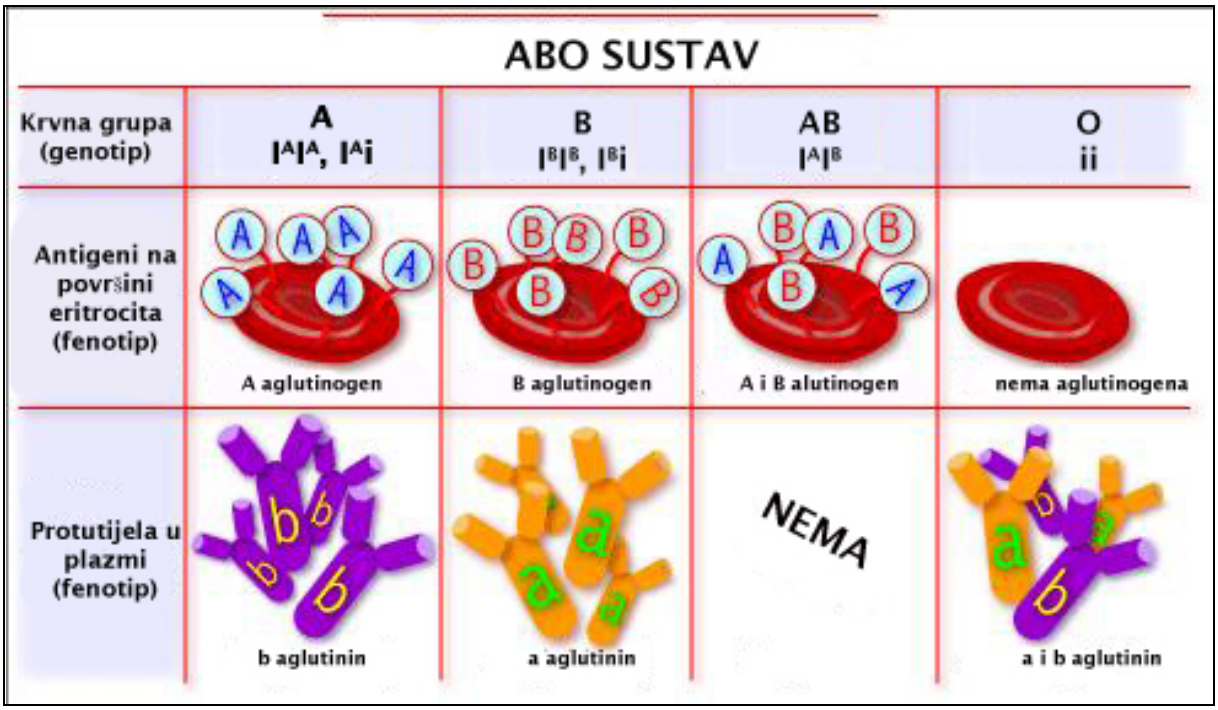
**Tablica 3.** Broj poznatih alela gena sustava HLA (http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html)

| Gen | HLA-A | HLA-B | HLA-C | HLA-DP | HLA-DQ | HLA-DR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Broj alela u populaciji | 1381 | 1927 | 960 | 170 | 162 | 927 |

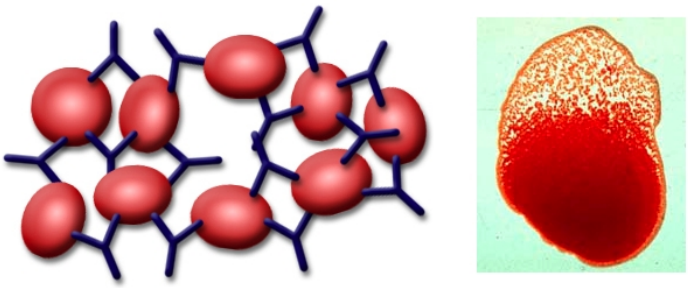
## 5. Krvne grupe kod čovjeka

U ljudi je poznato oko 20 sustava krvnih grupa, a mnoge od njih se nasljeđuju na osnovu serije multiplih alela. Tako se krvni sustav ABO kod čovjeka bazira na ekspresiji tri različita alela gena *I* koji se nalazi na dužem kraku kromosoma 9. Aleli $I^A$ i $I^B$ i su dominantni

nad alelom *i* ali su međusobno kodominantni: ($I^A = I^B$) > *i*. Fenotip krvne grupe ovisi o prisutnosti odnosno odsutnosti specifičnog antigena na površini eritrocita. Osobe krvne grupe A imaju eritrocite na kojima se nalazi antigen ili aglutinogen tipa A, osobe krvne grupe B imaju eritrocite sa antigenom B, a osobe krvne grupe AB na eritrocitima oba tipa antigena, antigen A i antigen B (fenotipska posljedica kodominantnosti). Osobe krvne grupe O ne sadrže niti jedan tip antigena (A ili B) na eritrocitima. Prisutnost specifičnog antigena na eritrocitima osobe definira odgovarajući tip krvne grupe.

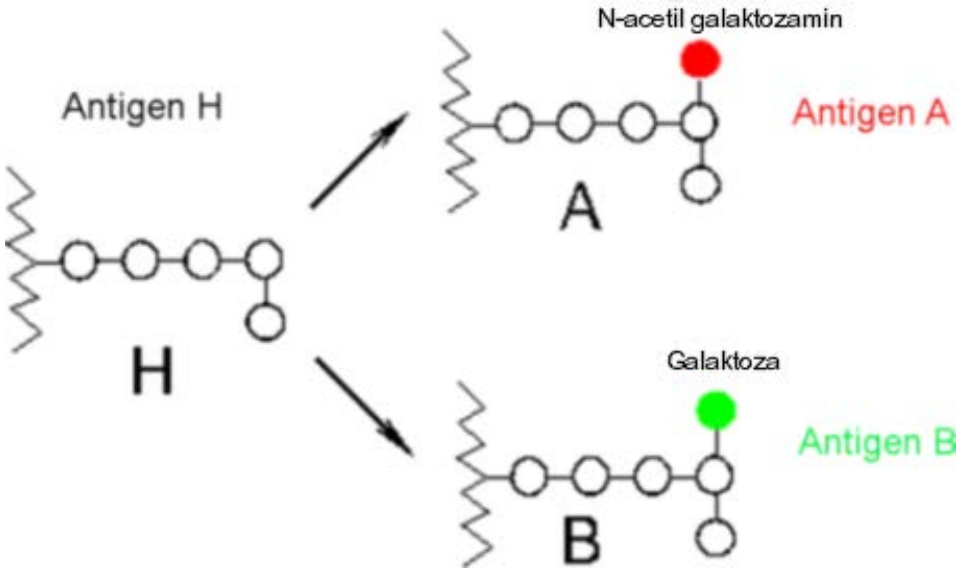



Prisutnost antigena (mukopolisaharidi) na eritrocitima izaziva proizvodnju protutijela (antitijela) u krvnom serumu. U serumu je prisutan onaj tip protutijela koji odgovara odsutnom antigenu. Dakle, u krvi čovjeka krvne grupe A (antigen A na eritrocitima) nalaze se protutijela B, dok se u krvi čovjeka krvne grupe B nalaze protutijela A. U krvi čovjeka krvne grupe AB ne nalazimo protutijela niti jednog tipa, dok se u krvnom serumu čovjeka krvne grupe O nalaze oba tipa protutijela (A i B). Određivanje krvnih grupa bazira se na imunološkoj reakciji antigen-protutijelo (antigen A reagira s protutijelom A) tj. reakciji sljepljivanja (aglutinacije) eritrocita (slika 3.3.). Poznavanje sustava ABO neophodno je za uspješnu transfuziju krvi. Svaka transfuzija biti će inkompatibilna ako se krv davatelja (eritrociti) zgrušava u dodiru s krvlju primatelja (krvni serum). Budući da tip A ima u svom serumu protutijela B onda će milijuni eritrocita davatelja krvne grupe B biti zgrušani u kontaktu sa serumom tipa A što će začepiti sitne krvne žilice, te uzrokovati zastoj u cirkulaciji, dovesti do teškog oboljenja pa i smrti. Samo ***tip O*** može dati krv svim ostalim krvnim grupama (***univerzalni davatelj***) jer ne sadrži antigen na membrani eritrocita koji bi bio napadnut protutijelima iz seruma primaoca, dok je ***tip AB univerzalni primatelj*** jer nema protutijela u serumu koja bi odmah napala eritrocite davatelja drugačijeg tipa. U slučaju univerzalnog davatelja, serum krvne grupe O koji sadrži određenu količinu protutijela A i B bit će ubrzo razgrađen enzimima u krvi primaoca tako da će teže djelovanje reakcije antigen-protutijelo izostati.



**Slika 3.3.** Reakcija aglutinacije eritrocita

Antigeni A i B su kratke molekule ugljikohidrata sastavljene od 6 šećera. Prvim šećernim ostatkom usidrene su u lipidno-proteinsku staničnu membranu eritrocita, a preostali lanac šećera viri van s površine eritrocita. Molekule antigena A i antigena B razlikuju se međusobno samo u zadnjem šećernom ostatku; terminalna ***galaktoza u antigenu B*** zamijenjena je ***n-acetilgalaktozaminom u antigenu A***. Ova mala razlika u jednoj kemijskoj grupi predstavlja antigensku specifičnost svake molekule. Osnovni dio molekule sastavljen od pet šećera naziva se H-struktura ili H-antigen jer može djelovati s određenim protutijelom. H antigen je kontroliran različitim genom od gena *I* (slika 3.4.). To je gen *H* s dva alelna oblika (*H* i *h*). Na H antigen se nadovezuje šesti šećer koji određuje antigen A odnosno antigen B, a za kojega je odgovoran gen *I*. Ako se na antigen H ne veže šesti šećer tada ova struktura ostaje nepromijenjena i radi se o antigenu O. Dakle, antigene A i B specificira šesti šećer na strukturi H. Prema tome, osoba krvne grupe O proizvodi antigen H u nepromijenjenom obliku. Antigeni A, B i H nisu specifični za eritrocite već se nalaze i na membrani drugih staničnih tipova. Danas se zna da postoje i podgrupe ABO sustava zbog postojanja alela $I^{A1}$ i $I^{A2}$ koji su u dominantno-recesivnom odnosu ($I^{A1}$ dominantan nad $I^{A2}$). Ako uključimo još i ova dva alela dobit ćemo šest tipova krvnih grupa koje se razlikuju na osnovu reakcije antigen-protutijelo, a koje su određene sa 10 različitih genotipova.




**Slika 3.4.** Shematski prikaz građe antigena H, A i B.

Poznavanje krvnih grupa ABO sustava važno je osim u medicini (transfuziologija) i u nekim pravnim slučajevima (isključivanje očinstva, isključivanje ubojstva itd.). Na osnovu rezultata testa antigen - protutijelo očinstvo se može samo isključiti, ali ne i odrediti.

Osoba krvne grupe AB u pravilu ne može imati roditelja krvne grupe O. Međutim utvrđeni su rijetki slučajevi osoba koje nose antigene A i B, ali koji se ne moraju detektirati imunološkom reakcijom antigen-protutijelo. Tako osoba genotipa $I^AI^B$ može zapravo biti krvne grupe O. Naime, proizvodnja A i B antigena ne ovisi samo o ABO lokusu (*I* lokus na kromosomu 9) već i o genskom lokusu *H* (na kromosomu 2). Dominantni alel *H* kontrolira proizvodnju antigena H koju sadrže i antigen A i antigen B. Većina ljudi u populaciji je genotipa *HH*. Utvrđeni su rijetki slučajevi osoba genotipa *hh*. Te osobe ne mogu proizvoditi strukturu H, pa ne samo da su negativni za antigen H već reakcijom antigen-protutijelo odaju kao da su krvna grupa O iako su u stvari genotipa $I^AI^B$. Ovaj slučaj nazvan je ***Bombaj fenomen***, jer je prvi puta opisan u ovom indijskom gradu. Iako je taj fenomen vrlo rijedak, dobar je primjer recesivne epistaze i ukazuje na predostrožnost prilikom donošenja savjeta za utvrđivanje očinstva.

Osim ABO sustava važno je poznavanje i MN sustava krvnih grupa. Kod MN krvnih grupa u serumu nema prirodnih protutijela. Protutijela se međutim mogu umjetno proizvesti ako se u eksperimentalne životinje (na pr. kunić, konj) ubrizga ljudska krv. Takav životinjski serum sa proizvedenim protutijelima može poslužiti za identifikaciju antigena na ljudskim eritrocitima. Aleli M i N su kodominantni pa su moguća tri genotipa (MM, MN, NN) i tri fenotipa (M, N, MN). Postoji još nekoliko sustava za određivanje krvnih grupa kao što su npr. Kell, Lutheran, Duffy, Lewis, Kidd i dr. Svi su ovi sustavi kontrolirani različitim genima koji uglavnom dolaze u multiplim formama. Svi ovi geni imaju specifične antigene koji se nalaze na površini istih eritrocita. Ako se svi geni koji određuju različite krvne grupe promatraju zajedno onda možemo opisati za svaku osobu detaljan genetički profil za fenotip krvne grupe.

**Praktičan rad – određivanje krvne grupe na temelju reakcije antigen-protutijelo**

POTREBAN MATERIJAL: predmetno stakalce, anti-A, anti-B, anti-AB i anti-D serumi, stakleni štapić, sterilna lanceta, alkohol, vata.

POSTUPAK: na predmetno stakalce kapnemo po 4 kapi krvi. Pored svake kapi krvi kapnemo jedan od 4 anti-seruma. Staklenim štapićem pomiješamo krv i anti-serum, te pričekamo 1-2 minute. Dok čekamo lagano naginjemo stakalce miješajući krv i anti-serum.

Pažljivo promotrite reakciju i objasnite dobivene rezultate!

## RHESUS KRVNE GRUPE

Ljudska populacija može biti pozitivna odnosno negativna za Rhesus faktor. Rhesus krvne grupe opisali su 1940. Landsteiner i Wiener kada su pokazali da antiserum dobiven ubrizgavanjem krvi majmuna *Macaca mullata* zecu, može aglutinirati eritrocite čovjeka. Naime, krv zeca proizvodi protutijela na antigen D koji se nalazi na membrani eritrocita rhesus majmuna. U ljudskoj populaciji 85% osoba je Rhesus-pozitivnih (genotip $Rh^+Rh^+$ ili $Rh^+Rh^-$) a 15% Rhesus-negativnih jedinki (genotip $Rh^-Rh^-$ ). Rhesus faktor je dakle određen s dva alela jednoga genskog lokusa (na kromosomu 1) koji su u dominantnom-recesivnom odnosu. Dvije osobe različitih spolova mogu biti inkompatibilne zbog različitog Rh faktora u krvi. Rh negativna majka će sa Rh pozitivnim ocem moći imati Rh pozitivno dijete. Ako je to prva trudnoća ova razlika neće biti kobna za dijete, međutim druga trudnoća može predstaviti

problem za plod. Naime, tijekom poroda prve trudnoće Rh pozitivni (koji sadrže D antigen) eritrociti djeteta zbog miješanja majčine i djetetove krvi ulazit će u krv majke i stimulirati proizvodnju protutijela u njenom krvnom serumu. Ova protutijela proizvedena tijekom prve trudnoće mogu naštetiti plodu u drugoj trudnoći izmjenom krvi majke i djeteta kroz placentu. Protutijela će koagulirati eritrocite fetusa što može dovesti do bolesti fetalne eritroblastoze. Ipak, samo 1 na 200 rođenih beba bude pogođena fetalnom eritroblastozom. To je zato što se kod svih trudnoća ne dogodi da krv bebe prođe kroz placentu i uđe u krv majke (to je jako rijetko), a i prva trudnoća nikada nije riskantna (osim u slučaju da je majka senzibilizirana od neke ranije transfuzije). Ženama se danas nakon prvog poroda ubrizgava anti-D serum koji uništi sve eritrocite djeteta koji su eventualno ušli u krv majke. Na taj način je sigurno da plod u drugoj trudnoći neće biti ugrožen.

? 6. Proizvodnja antigena D određena je dominantnim alelom $Rh^+$ a nedostatak istog antigena recesivnim alelom $Rh^-$. Napišite moguće potomstvo sljedećih križanja:

a) žene O $Rh^-$ (koja ima $Rh^+$ roditelja) i muškarca O $Rh^+$ (koji ima $Rh^-$ roditelja),
b) žene A $Rh^+$ i muškarca B $Rh^+$ (oba imaju jednog $Rh^-$ roditelja)?

## ZADACI:

1. U istoj bolnici rođene su 4 bebe. Igrom slučaja došlo je do zamjene njihovih identifikacijskih brojeva. Krvne grupe beba bile su: A, B, 0 i AB. Krvne grupe roditelja su:

bračni par Anić: otac A, majka B
bračni par Papić: otac B, majka 0
bračni par Babić: otac 0, majka 0
bračni par Nikolić: otac AB, majka 0.

Pronađi roditelje za svaku od 4 bebe.

2. Suprug tuži suprugu zbog nevjere. Njihovo prvo i drugo dijete imaju krvne grupe 0 i AB. Treće dijete za koje postoji sumnja da nije njegovo ima krvnu grupu B.

- Da li na temelju podataka možete donijeti bilo kakav zaključak o očinstvu?
- Učinjen je još jedan krvni test sa sustavom MN krvnih grupa. Test je pokazao da suprug ima krvnu grupu N, a treće dijete krvnu grupu M. Što možete zaključiti na temelju ovog testa?

4. Koji su mogući genotipovi sljedećih parova roditelja s obzirom na A, B i 0 alele krvnih grupa.

- Roditelj tipa A i 0 koji imaju dijete krvne grupe 0.
- Roditelji tipa AB i A koji imaju jedno dijete tipa A i jedno dijete tipa B.
- Roditelji tipa A i tipa B koji imaju osmero djece tipa AB.

5. Postoje dvije podgrupe krvne grupe A. Alel $A_1$ je dominantan alelu $A_2$ i 0. $A_2$ je također dominantan 0. Prikaži rezultate sljedećih križanja:

- $A_1$ osoba koja ima roditelja 0 x $A_2$ osoba koja ima roditelja 0,

- $A_2$ koji ima roditelja 0 x $A_1B$,
- $A_1B$ x $A_2B$,
- $A_1B$ x 0.

6. Žena ima krvnu grupu B. Muškarac 1 ima grupu 0, a muškarac 2 grupu $A_2$. Dijete je krvne grupe $A_1B$. Koji bi muškarac mogao biti otac?

7. Alel H potreban je za popuno formiranje antigena A i B. Prikaži krvne grupe koje se očekuju kod potomstva kod svakog od sljedećih križanja, kao i omjer u kojem se pojavljuju:

- $I^AI^B$ Hh x $I^AI^B$ Hh,
- iiHh x $I^A$i Hh,
- $I^A$i Hh x $I^B$i hh.

8. Žena je krvne grupe A MN. Njezino dijete je grupa 0 N. Muškarac I ima krvnu grupu A M, a muškarac II 0 N. Koji je od dvojice muškaraca je potencijalni otac?

## 3. VEZANI GENI

Kada se dva ili više gena nalaze na istom kromosomu nazivamo ih vezanim genima. Oni mogu biti zajedno na nekom od autosoma ili pak na spolnim kromosomima. Geni koji se nalaze na različitim kromosomima razdvajaju se neovisno jedan od drugoga, dok geni koji se nalaze na istom kromosomu kod stvaranja gameta nastoje ostati na istom kromosomu u istoj kombinaciji kao što su bili i u roditeljskom genotipu.

Dva lokusa smještena na različitim kromosomima segregiraju u mejozi (anafaza I ili anafaza II) neovisno jedan o drugom (II zakon Mendelovog nasljeđivanja). U tom slučaju test križanje dihibrida dat će fenotipski omjer u $F_1$ generaciji 1:1:1:1. Međutim, ako test križanjem u $F_1$ generaciji dobijemo velika odstupanja od ovog omjera zaključujemo da se geni za dva svojstva čije nasljeđivanje pratimo, nalaze na istom kromosomu, tj. da se radi o vezanim genima.

Označavanje vezanih gena:

Vezani geni se prikazuju da se aleli s jednog homolognog kromosoma horizontalnom ili kosom crtom odvoje crtom od alela s drugog homolognog kromosoma. Primjer genotipa:

AB/ab ili $\frac{AB}{ab}$ (dihibrid, geni a i b su vezani).

Vezanost gena može biti potpuna ili djelomična. ***Potpunu vezanost*** pokazuju geni između kojih ne dolazi do rekombinacije (krosingovera), odnosno ne postoji izmjena između dijelova kromatida majčinskog i očevog kromosoma u bivalentu. Kod potpune vezanosti gena nema rekombinantnih potomaka. Dihibridnim test-križanjem nastaju samo dvije klase potomaka koje po fenotipu i genotipu odgovaraju roditeljima. To su RODITELJSKI potomci. Mejoza bez krosingovera poznata je u mužjaka vinske mušice, ženke dudovog svilca, te nekih biljaka.

**Zadatak 1. Primjer potpune vezanosti**

Kod vinske mušice, geni za boju tijela i zakrivljenost krila nalaze se na istom kromosomu. Shematski prikaži križanje vinske mušice ženke čiste linije (divlji tip, $cu^+e^+/cu^+e^+$) i mužjaka recesivnog homozigota za oba svojstva (cue/cue).

A) Napiši genotip roditeljske i $F_1$ generacije, genotip gameta, nacrtaj alele na kromosomima. B) Od koliko fenotipskih klasa se sastoji $F_1$ generacija?

Vezani geni ipak ne ostaju uvijek zajedno na istom kromosomu nakon gametogeneze jer nesestrinske kromatide homolognih kromosoma mogu izmijeniti dijelove različitih duljina tijekom profaze I mejoze kroz proces mejotskog sparivanja homolognih kromosoma i krosingovera. Geni između kojih dolazi do rekombinacije putem krosingovera pokazuju ***djelomičnu vezanost***.

Da bi se utvrdila učestalost krosingovera između dva gena na istom kromosomu, provodi se test-križanje heterozigota za dva svojstva (dihibrid) s recesivnim homozigotom za ta dva svojstva:

**P:** AB/ab X ab/ab

**G:** AB, Ab, aB, ab X ab

**F1:** AB/ab, 40% | Ab/ab, 10% | aB/ab, 10% | ab/ab 40%

rekombinantni potomci

U $F_1$ generaciji javljaju se četiri fenotipske klase potomaka. Dvije klase su roditeljske i one su zastupljene uvijek u najvećem postotku (u ovom primjeru 80%), dok su preostale dvije klase rekombinantne, zastupljene u znatnom manjem postotku (u ovom primjeru 20%). Postotak rekombinantnih potomaka predstavlja *rekombinacijsku učestalost* ili *krosingover vrijednost*. Krosingover vrijednost odgovara udaljenosti gena na kromosomu. Što su dva gena udaljenija, to se između njih češće događa krosingover. Budući da geni zauzimaju točno određene lokuse na kromosomu, učestalost rekombinacije između dva genska lokusa je stalna i ona predstavlja mjeru relativne udaljenosti dva gena na kromosomu. Dakle, 1% rekombinacije odgovara jednoj jedinici karte na kromosomu.

**Odgovori na pitanje:**

A) Koliko su jedinica udaljeni lokusi a i b u gore navedenom križanju?

B) Po čemu zaključujete da se geni ne nalaze na različitim kromosomima?

**Zadatak 2: Primjer djelomične vezanosti**

Kod vinske mušice, geni za boju tijela i zakrivljenost krila nalaze se na istom kromosomu. Shematski prikaži križanje vinske mušice ženke heterozigotne za oba svojstva ($cu^+$ $e^+$/ cu e) i mužjaka recesivnog homozigota za oba svojstva (cu e/ cu e).

A) Napiši genotip roditeljske i $F_1$ generacije, genotip gameta, nacrtaj alele na kromosomima za pojedini genotip roditelja i $F_1$ generacije.

B) Odgovori na pitanja: Od koliko fenotipskih klasa se sastoji $F_1$ generacija? Ako je zastupljenost roditeljskih klasa 70%, koliko su udaljeni lokusi cu i e na kromosomu?

**Što se događa u mejozi (ponavljanje):**

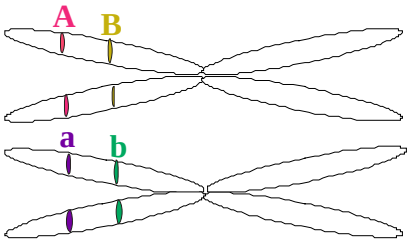
Prije ulaska u mejozu svaki kromosom je prošao kroz replikaciju (udvostručavanje DNA) tako da se sastoji od dviju sestrinskih kromatida. Krosingover se dešava između nesestrinskih kromatida i uključuje lom i ponovno spajanje samo dviju od četiri kromatide

(kromosomskih tetrada) u bilo kojem dijelu kromosoma. Kao rezultat ovakve mejoze nastat će četiri tipa gameta; samo dvije gamete imat će gene vezane na isti način kao što su bili i u roditeljskoj stanici (ove gamete nastale su od kromatida koje nisu sudjelovale u krosingoveru, roditeljski tipovi gameta) dok će druge dvije gamete imati rekombinirani vezani odnos među genima roditelja (ove gamete nastale su od kromatida koje su „pretrpjele“ krosingover; rekombinantni tipovi gameta).

Aleli dvostrukog heterozigota (dihibrida) u dva vezana lokusa mogu se pojaviti u dva različita položaja jedan naspram drugoga. Ako se dva dominantna alela nalaze na jednom kromosomu, a dva recesivna alela na drugom kromosomu tada vezani odnos nazivamo **CIS** položaj. Ako pak na istom kromosomu nalazimo dominantni alel jednog lokusa, a recesivni alel drugog lokusa tada ovaj odnos vezanosti nazivamo **TRANS** položaj. Roditeljske i rekombinantne gamete će u ova dva slučaja biti različite. Ako se radi o CIS položaju dihibrida, nakon test-križanja roditeljska klasa potomaka fenotipski odgovara fenotipu roditelja. Ako su aleli dihibrida u TRANS položaju, nakon test-križanja roditeljska klasa potomaka ne odgovara fenotipu roditelja, pa govorimo samo o roditeljskim gametama, a ne o roditeljskom fenotipu.

**Zadatak 3: Primjer vezanog odnosa**

Jedinka na slici je dihibridnog genotipa. O kojoj se vrste vezane konfiguracije radi?




**Odgovori na pitanja:**

**A) Koja je vrsta vezanosti na slici A), te na slici B) ?**

**B) Ispiši roditeljske gamete za položaj na slici A): _____ i _____**
**Ispiši rekombinantne gamete za položaj na slici A): _____ i _____**
**Ispiši roditeljske gamete za položaj na slici B): _____ i _____**
**Ispiši rekombinantne gamete za položaj na slici B): _____ i _____**

## Kromosomsko kartiranje

Svaki kromosom nekog organizma nosi veliki broj gena. Aleli koji se nalaze na istom kromosomu zajedno segregiraju u anafazi I. Ipak, u mejozi može doći do homologne rekombinacije, a krosingover između genskih lokusa može nam pokazati koliko su dva genska lokusa udaljena jedan od drugoga pa na taj način možemo kartirati cijeli kromosom. Kartirati znači odrediti položaj i međusobnu udaljenost gena na kromosomu. Jednu grupu vezanih gena čine svi genski lokusi koji se nalaze na istom kromosomu. Broj grupa vezanih gena jednak je broju kromosoma u haploidnom setu. Kromosom X predstavlja jednu grupu vezanih gena, dok kromosom Y predstavlja drugu grupu vezanih gena. Prema tome, ženka vinske mušice ima 4 grupe vezanih gena (2n = 8, XX), dok mužjak ima 5 grupa vezanih gena (2n = 8, XY).

Niska učestalost rekombinacije (mali broj rekombinantnih potomaka) ukazuje na malu udaljenost dvaju genskih lokusa na kromosomu. Učestalost rekombinacije je mjera udaljenosti između genskih lokusa; 1% rekombinantnih potomaka odnosi se na jednu jedinicu genske karte (ili 1 centimorgan u čast T.H. Morganu, prvom genetičaru koji je dobio Nobelovu nagradu). Ova mjera je relativna udaljenost genskih lokusa, a ne prava fizička udaljenost. Dihibridno križanje uzima u obzir dva genska lokusa; trihibridno križanje uzima u obzir tri genska lokusa; na ovaj način možemo odrediti relativan položaj lokusa u odnosu jedan na drugi, ali što je još važnije možemo analizirati učinak višestrukog krosingovera na udaljenost na genskoj karti. Učinak višestrukog krosingovera se ne može detektirati ako se promatraju samo dva lokusa. Naime, dvostruki krosingover između dva genska lokusa daje dojam kao da nije uopće došlo do krosingovera (isključuje rekombinante) i na taj način ćemo dobiti krivu informaciju o udaljenosti tih lokusa. Zbog toga je potrebno u križanja uključiti i treći genski lokus da bi mogli detektirati ovakve genetičke događaje.

U svrhu utvrđivanja vezanosti gena radimo test-križanje. Npr. ako želimo vidjeti da li su tri gena na istom kromosomu i u kojem su međusobnom poretku smješteni, te kolika je njihova udaljenost napravit ćemo ***test-križanje trihibrida*** (P: ABC/abc x abc/abc)

**<u>Primjer:</u>**

Test križanje ženke vinske mušice heterozigotne za crnu boju tijela (b), purpurnu boju očiju (pr) i zakrivljena krila (c): $\mathbf{b^+\ pr^+\ c^+ / b\ pr\ c}$ x $\mathbf{b\ pr\ c / b\ pr\ c}$

Mogući rezultati križanja:

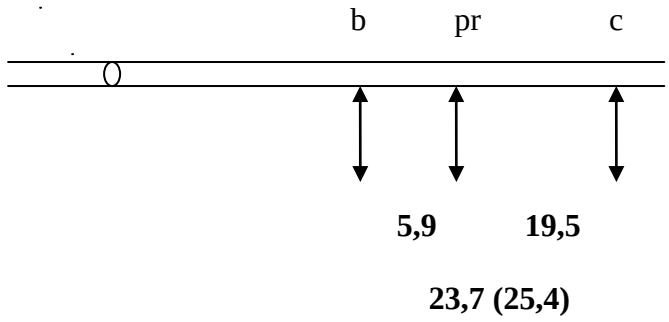
A. Ako se geni nalaze na zasebnim kromosomima oni će nezavisno segregirati i dobit ćemo osam vrsta gameta i osam različitih fenotipskih klasa iste učestalosti.

B. Ako su pak geni potpuno vezani (ne dolazi do krosingovera između njih jer se lokusi nalaze vrlo blizu jedan drugome) trihibrid će proizvoditi samo dvije vrste gameta i sa istom učestalošću, te ćemo tim križanjem dobiti dvije fenotipske klase potomaka (roditeljski fenotipovi).

C. Ako se geni nalaze na istom kromosomu i između njih dolazi do krosingovera imat ćemo osam različitih gameta (kao produkt krosingovera) i osam različitih fenotipova. Rezultati test križanja predočeni su u tablici.

| | fenotip | genotip | Broj potomaka | Gamete trihibridne ženke | Broj rekombinanti između b i pr | Broj rekombinanti između pr i c | Broj rekombinanti između b i c |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Divlji tip | $b^+pr^+c^+$/b pr c | 5 701 | $b^+pr^+c^+$ | | | |
| 2 | Crno tijelo, purpurne oči, zakrivljena krila | b pr c / b pr c | 5 617 | b pr c | | | |
| 3 | Purpurne oči, zakrivljena krila | $b^+$ pr c / b pr c | 388 | $b^+$pr c | 388 | | 388 |
| 4 | Crno tijelo | b $pr^+$ $c^+$ / b pr c | 367 | b $pr^+$ $c^+$ | 367 | | 367 |
| 5 | Zakrivljena krila | $b^+pr^+$c / b pr c | 1 412 | $b^+$ $pr^+$c | | 1 412 | 1 412 |
| 6 | Crno tijelo, purpurne oči, | b pr $c^+$ / b pr c | 1 383 | b pr $c^+$ | | 1 383 | 1 383 |
| 7 | Purpurne oči, | $b^+$ pr $c^+$ / b pr c | 60 | $b^+$pr $c^+$ | 60 | 60 | |
| 8 | Crno tijelo, zakrivljena krila | b $pr^+$ c / b pr c | 72 | b $pr^+$c | 72 | 72 | |
| | Ukupno | | 15 000 | | | 2 972 | 3 550 |
| | % | | | | **5,9** | **19,5** | **23,7** |

Položaj i udaljenost lokusa na kromosomu:



**Određivanje relativnog položaja i udaljenosti lokusa *b, pr* i *c* na kromosomu (objašnjenje tablice):**

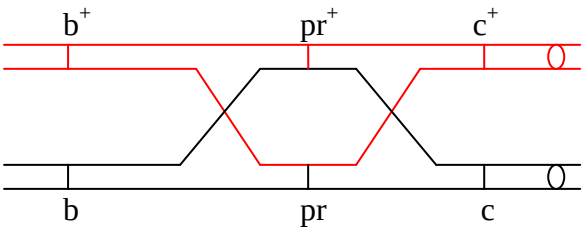
U tablici su grupirane recipročne klase potomaka. Recipročne klase nastaju kao rezultat jednog krosingovera, te se pojavljuju u približno istom broju u potomstvu. Dvije najzastupljenije klase uvijek predstavljaju roditeljske klase potomaka (1 i 2). Dvije najmanje zastupljene klase su posljedica dvostrukog krosingovera (7 i 8). Ostale 4 klase su rekombinante klase nastale kao posljedica jednog krosingovera između b i pr (3 i 4), odnosno pr i c genskog lokusa (5 i 6).

U posljednjem stupcu tablice prikazana je rekombinacija između gena b i c. Ubrojene su samo one rekombinantne klase koje daju novi poredak alela b i c (dominantni ili recesivni), ako ih usporedimo s roditeljskim poretkom. Ovaj posljednji stupac pokazuje nam što bi nam otkrilo križanje dihibrida za ova dva genska lokusa (b i c) s recesivnim homozigotom da nemamo treći genski lokus pr između njih.

Dakle, 5,9% rekombinantnih potomaka nastalo je krosingoverom između lokusa b i pr, 19,5% rekombinantnih potomaka krosingoverom između lokusa pr i c, te 23,7% rekombinantnih potomka krosingoverom između lokusa b i c. Ovi podaci nam daju mogućnost da napravimo provizornu ili hipotetsku gensku kartu za tri lokusa (vidi sliku gore).

**Dvostruki krosingover:**

Udaljenost između dva najudaljenija gena b i c možemo izračunati na dva načina: 1) da zbrojimo udaljenost gena b i pr i udaljenost gena pr i c i dobit ćemo udaljenost od 25,4 cM (5,9 cM + 19,5 cM) i 2) da udaljenost izračunamo zbrajajući rekombinantne potomke koje ćemo dobiti kao produkt c.o. između ova dva lokusa pa to iznosi 23,7 cM. Postavlja se pitanje što uzrokuje ovu razliku od 1,7 cM? Razlog je dvostruki krosingover: drugi krosingover poništava prvi krosingover, odnosno umjesto rekombinantnih genotipova dobit ćemo roditeljske. Što su dva lokusa dalje jedan od drugoga na kromosomu to je mogućnost da se dogodi krosingover veća. Iz ovog primjera se vidi da dvostruki krosingover ima tendenciju maskiranja rekombinanata pa vrlo udaljeni lokusi često izračunavanjem udaljenosti gena izgledaju bliže nego što zapravo jesu.




Prikaz dvostrukog krosingovera

**Zadatak:** Ispišite rekombinantne gamete nakon dvostrukog krosingovera: _____ i _____

**Odgovori na pitanja:**

A) Koja je vrijednost udaljenosti gena točnija: 23,7 cM ili 25,4 cM? B) Zbog čega?

Najpreciznije genske karte su one koje su napravljene uzimajući u obzir lokuse koji su vrlo blizu jedan drugoga. Drugim riječima zbrajanje kratkih udaljenosti puno je točnije nego direktno mjerenje dugih udaljenosti (dobro je imati druge genske lokuse između dva udaljena gena za točnu procjenu njihove udaljenosti). Ovaj primjer nam pokazuje i da za određena dva lokusa možemo dobiti uvijek barem dvije genske karte; mjerenu i pravu udaljenost gena. Mjerena udaljenost za dva gena je ona koju smo dobili izračunavanjem učestalosti rekombinanti dobivenih test-križanjem dihibrida. Pravu udaljenost između dva genska lokusa dobili smo zbrajajući kratke udaljenosti genskih lokusa koji se nalaze između dva određena gena čiju udaljenost želimo znati. Kratke udaljenosti su pak dobivene uz pomoć test križanja dihibrida za mnoge lokuse između dva udaljena. Ako izmjerene vrijednosti unesemo u graf zajedno s idealnim pravim vrijednostima udaljenosti između dva gena dobit ćemo krivulju koja se naziva funkcija kartiranja.

## ZADACI:

1. Zašto se dva svojstva čiji se lokusi nalaze na istom kromosomu ne nasljeđuju prema zakonitostima II. Mendelovog zakona nasljeđivanja?

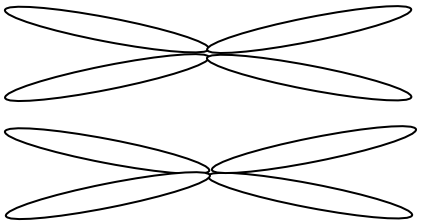
2. Lokusi A i B nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6 kariotipa konja. Koliko različitih gameta stvara dihibridna jedinka ako se radi o potpunoj vezanosti gena?

3. Lokusi A i B nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6 u konja. Koliko različitih gameta stvara dihibridna jedinka ako se radi o djelomičnoj vezanosti gena?

4. Na kromosomu III u vinske mušice, lokus e (od *ebony*, crna boja tijela) nalazi se na 67,5 jedinica genske karte, dok se lokus w (od *white*, bijele oči) nalazi na 72 jedinice genske karte. Koliko su udaljena ova dva lokusa izraženo u jedinicama genske udaljenosti?

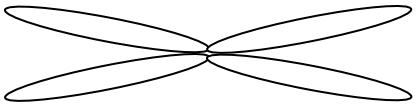
5. U ženke vinske mušice, genski lokusi e i h (od *hairless*, tijelo bez dlaka) nalaze se na kromosomu III, dok se lokus swg (od *small-wing*, kratka krila) nalazi na kromosomu I. A) Koliko različitih vrsta gameta stvara trihibrid? B) Ispiši genotipove gameta.

6. Lokusi A, B i C nalaze se na lijevom kraku metacentričnog kromosoma 3 redoslijedom kao što je napisano (lokus C nalazi se najbliže centromeru). A) Označi na nacrtanim homolognim kromosomima položaje alela trihibrida ABC/abc (cis položaj). B) Lokusi A i B su potpuno vezani, dok se između lokusa B i C događa krosingover u 6% kromosomskih tetrada. Koja je udaljenost između lokusa B i C? Koliko različitih vrsta gameta nastaje i koji su genotipovi nastalih gameta?



7. Kod vinske mušice, geni za boju tijela ($b^+$ = siva boja tijela; b = crna boja tijela) i dužinu krila ($vg^+$ = duga krila; vg = kratka krila) su vezani. Provedeno je test križanje dihibrida koje je dalo 17% rekombinantnih potomaka. A) Kolika je zastupljenost (u postotcima) pojedinih fenotipskih klasa nastalih nakon križanja? B) Kolika bi bila zastupljenost pojedinih fenotipskih klasa da se lokusi b i vg nalaze na različitim kromosomima?

8. Određena je udaljenost tri gena u vinske mušice. Ako su b i vg udaljeni 17 jedinica genske karte, b i cn 9 jedinica genske karte, a vg i cn 9,5 jedinica genske udaljenosti, koji je redoslijed alela na kromosomu. Označi lokuse na kromosomu.



9. Jedan zemljoposjednik iz Kloštar-Ivanića želi se početi baviti uzgojem krava. Za početak ima stado od 12 krava od kojih sve proizvode velike količine mlijeka (M, dominantno svojstvo nad malom produkcijom mlijeka m), te sve imaju visoku fertilnost (F, dominantno svojstvo nad niskom fertilnosti, f). Ipak, stočaru je poznato: 1) da su sve njegove krave heterozigoti za oba svojstva, 2) da su geni vezani i 3) da je udaljenost među genima 20 cM. U genotipu njegovih krava, jedan homologni kromosom nosi dominantne alele za oba svojstva, dok drugi kromosom nosi recesivne alele za oba svojstva. Dva stočara u susjedstvu vlasnici su svaki po jednog bika koji su također heterozigoti za oba navedena svojstva. Bik prvog susjeda ima alele razmještene na kromosomima kao i krave, dok bik drugog susjeda ima na svakom homolognom kromosomu dominantni alel jednog svojstva i recesivni alel drugog svojstva. A) Imajući na umu da zemljoposjednik iz Kloštar-Ivanića želi uzgojiti maksimalni broj krava koje imaju visoku produkciju mlijeka i visoku fertilnost, kojeg od ova dva bika bi trebao koristiti za rasplod? B) Koji je postotak potomstva križanja u odgovoru pod A) koji ima najpoželjniji fenotip: visoku produkciju mlijeka i visoku fertilnost. C) Koji postotak potomstva ima najpoželjniji genotip MMFF?

10. Mendel je studirao 7 pari kontrastnih karakteristika kod vrtnog graška (*Pisum sativum*). Zašto nikada nije otkrio princip vezanog nasljeđivanja?

11. Koliko vezanih grupa gena posjeduje: A) ženka skakavca 2n=22+XX, B) mužjak skakavca 2n=22+X, C) obični ječam 2n=14, D) žena 2n=44+XX, e) muškarac 2n=44+XY?

12. Eliptocitoza (rijetko i neškodljivo stanje kod kojeg su eritrociti elipsoidni umjesto uobičajenog diskoidalnog oblika) i sposobnost stvaranja antigena D su oba dominantna i vezana svojstva. Rh-pozitivan muškarac pokazivao je eliptocitozu kao i njegova Rh-negativna majka. Njegov otac je imao normalne eritrocite i bio je Rh-pozitivan. A) Upotrijebivši simbol E za eliptocitozu i D za produkciju antigena D,

prikažite genotip muškarca. B) Koju vrstu vezane konfiguracije predstavlja ovaj genotip?

13. Broj potomaka 4 fenotipske klase $F_1$ generacije dihibridnog test-križanja za svojstvo A i svojstvo B je slijedeći: 327:330:317:331. Koji je odnos gena A i B (da li su na različitim kromosomima ili su vezani)?

14. Napravljeno je test-križanje trihibrida za svojstva A, B i C (cis konfiguracija). Napišite genotipove potomaka koji su nastali kao rezultat dvostrukog krosingovera.

15. Koliko različitih gameta i u kojem omjeru stvara mužjak vinske mušice genotipa Ab/Ab, ako su geni vezani?

16. Kod kukuruza, obojeni aleuron (R) je dominantno svojstvo nad bezbojnim aleuronom (r). Žuta boja biljke (y) je recesivna u odnosu na zelenu boju (Y). Dvije biljke (A i B), heterozigoti, križane s dvostrukim recesivnim homozigotom ry/ry, dale su slijedeće potomstvo:

| Fenotip biljke | A | B |
|---|---|---|
| Obojeni aleuron, zelena biljka | 88 | 23 |
| Obojeni aleuron, žuta biljka | 12 | 170 |
| Bezbojni aleuron, zelena biljka | 8 | 190 |
| Bezbojni aleuron, žuta biljka | 92 | 17 |

Izračunajte učestalost rekombinacije između gena Y i R i objasnite vrstu vezane konfiguracije tih gena na kromosomima biljaka A i B.

17. Test križanje ženki vinske mušice heterozigotnih za tri recesivna svojstva: grimizne oči (st), zdepasta krila (dp) i crno tijelo (b) s mužjacima recesivnim za sva tri svojstva, dobiveno je slijedeće potomstvo (fenotipski):

| | |
|---|---|
| + + + | 210 |
| + + b | 104 |
| + dp + | 96 |
| + dp b | 232 |
| st + + | 224 |
| st + b | 98 |
| st dp + | 102 |
| st dp b | 240 |

a) Kakvi su odnosi među ovim genima?
b) Koja je genska udaljenost između vezanih gena?

18. Oko bubrežastog oblika vinske mušice pod kontrolom je recesivnog gena k koji se nalazi na III kromosomu. Narančasto oko je pod kontrolom recesivnog gena cd (cardinal) na istom kromosomu. Između ova dva lokusa smješten je lokus e odgovoran za crnu boju tijela. Homozigotne recesivne ženke za k i cd lokus križane su s homozogotnim crnim mužjacima (e). S trihibridnim ženkama $F_1$ generacije izvršeno je test križanje i dobiveno je slijedeće potomstvo (fenotipski):

| | |
|---|---|
| k cd + | 1761 |
| e + + | 1773 |
| k e + | 128 |
| cd + + | 138 |
| k + + | 97 |
| e cd + | 89 |
| k e cd | 6 |
| + + + | 8 |

Prikažite ovo križanje!
Koliki je ukupan broj potomaka?
Odredite udaljenosti između gena!

## 5. MEHANIZMI DETERMINACIJE SPOLA

Spol nekog organizma je najčešće određen slijedom vrlo složenih događaja tijekom embrionalnog razvoja, a pod kontrolom su različitih gena i hormona. Međutim, pravac u kojem će krenuti razvoj prema jednom ili drugom spolu najčešće je determiniran s jednim ili vrlo malim brojem gena. Ti geni okidači nalaze se na spolnim kromosomima u onih vrsta kod kojih se spol određuje na temelju spolnih kromosoma. Spol ne mora nužno biti određen spolnim kromosomima, već može ovisiti o stupnju ploidnosti, genskoj ravnoteži, autosomalnim genima, te okolišnim faktorima.

### 1. Haplo-diploidni genetički sustav ili determinacija spola na temelju stupnja ploidije

Ovakav način determinacije spola prisutan je u insekata reda Hymenoptera (opnokrilci), primjerice kod pčela, osa i mrava (slika 5.1.). Matica može izleći oplođena diploidna jaja ili neoplođena haploidna jaja. Naime ona može kontrolirati opuštanje i stezanje sfinktera, malog kružnog mišića kojim ili dozvoljava ili sprječava ulazak spermija i na taj način kontrolira oplodnju. Iz oplođenih jaja razvit će se ženke (biparentalne), dok će se iz neoplođenih jaja razviti mužjaci (uniparentalni).

Mehanizam kojim se postiže razvitak pojedinog spola naziva se sl-CSD (od engl. *single-locus complementary sex determination*), pri čemu je ženski spol određen postojanjem dva različita alela navedenog lokusa. Heterozigoti se razvijaju u ženke, a hemizigoti (ili diploidni homozigoti) u mužjake. U pčela je identificiran gen koji određuje spol te je nazvan *csd* (od engl. *Complementay Sex Determiner*). CSD protein tvori dimere koji su funkcionalni samo ako u organizmu postoje 2 različita alela *csd* lokusa.

**Slika 5.1**. Vrste roda *Hymenoptera*

? Kojim procesom nastaju gamete trutova i zašto?

### 2. Determinacija spola na temelju genske ravnoteže

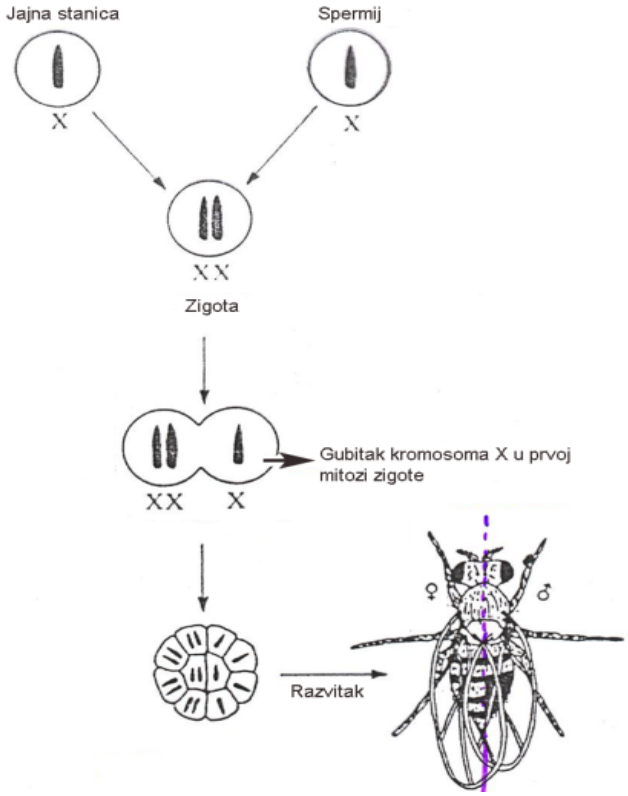
Ovaj tip determinacije spola karakterističan je za vinsku mušicu. Iako u ovom organizmu u kariotipu postoje spolni kromosomi, X i Y, za determinaciju spola nije važna samo prisutnost spolnih kromosoma već je važan omjer broja X kromosoma i setova autosoma (X/A) koji utječe na ekspresiju gena *sxl* (od engl. *sex-lethal).* Na kromosomu X nalaze se geni za tzv. numeratorske elemente dok se na autosomima nalaze geni za denominatorske elemente. Numeratorski elementi su transkripcijski faktori koji u ranom embrionalnom razvoju ženki potiču transkripciju gena *sxl* sa njegovog „ranog“ promotora. U

mužjaka nema rane transkripcije gena zbog prisutnosti većeg broja represorskih proteina kodiranih denominatorskim genima. Kasnije tijekom embrionalnog razvitka u oba spola počinje transkripcija gena *sxl* sa kasnog promotora, no prisutnost proteina Sxl u ženki potrebna je za pravilno prekrajanje pre-mRNA i proizvodnju funkcionalnog proteina Sxl. Protein Sxl je uključen u pravilnu preradu svog vlastitog transkripta kao i transkripata drugih gena te na taj način utječe na ekspresiju cijelog niza gena koji dovode do formiranja ženske jedinke.

Dakle, omjer X/A u stvari predstavlja kompeticiju između transkripcijskih aktivatora gena *slx* kodiranih genima na kromosomu X i transkripcijskih represora kodiranih genima koji se nalaze na autosomima.

| Omjer X/A | Spol |
|---|---|
| 1 | ženka |
| 0,5 | mužjak |
| >1 | superženka* |
| <0,5 | supermužjak* |
| 0,5-1 | međuspol |

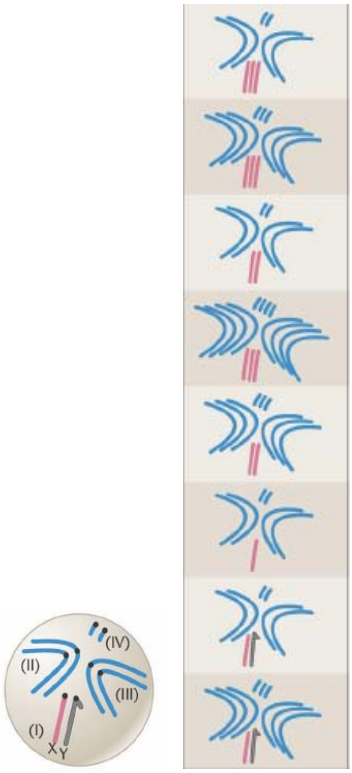
Ideja o determinaciji spola kod vinske mušice potječe od otkrića ginandromorfizma. To je vrsta spolnog mozaicizma koji se očituje u tome da jedan dio tijela mušice pokazuje karakteristike ženskog spola (stanice s dva kromosoma X), a drugi karakteristike muškog spola (jedan kromosom X) (slika 5.2.).




**Slika 5.2.** Način nastanka ginandromorfizma

? Kojim mehanizmom nastaje ginandromorf? Na slici označite karakteristična obilježja muškog, odnosno ženskog spola! Kakva je to vrsta ginandromorfizma? Kojeg su genotipa lijeva i desna strana jedinke obzirom na boju očiju (alel za bijelu boju očiju se nalazi na kromosomu X).

? Na slici su prikazani kromosomi vinske mušice: 3 para autosoma, kromosom X i Y! Odredite spol tih mušica!




### 3. Determinacija spola uvjetovana okolišnim uvjetima

U mnogih gmazova, uključujući većinu kopnenih kornjača, morske kornjače (slika 5.3.) i sve krokodile, spol jedinke određen je temperaturom okoliša tijekom inkubacije jajeta. Period u drugoj trećini inkubacije naziva se termoosjetljivi period i u tom razdoblju dolazi do aktivacije termoosjetljivog enzima aromataze koji pretvara androgene u estrogene. Temperatura pri kojoj dolazi do aktivacije enzima ovisi o vrsti organizma. Kod glavate želve, primjerice, pri temperaturi od 26°C embrij će se razviti u mužjaka, a pri 32°C u ženku.

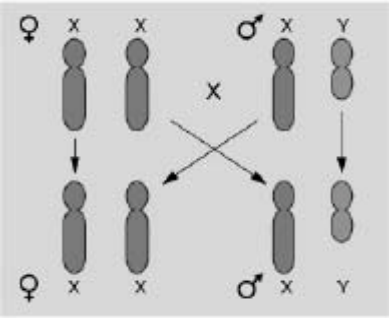
**Slika 5.3**. Mlade morske želve (*Caretta caretta*)

## 4. Determinacija spola na temelju spolnih kromosoma

Geni koji se nalaze na spolnim kromosomima odgovorni su za determinaciju spola neke jedinke. Općenito, o genotipu ovisi koji tip gonada će se formirati u određenoj jedinki, a koje onda proizvode spolne hormone važne za sekundarne spolne karakteristike te jedinke.

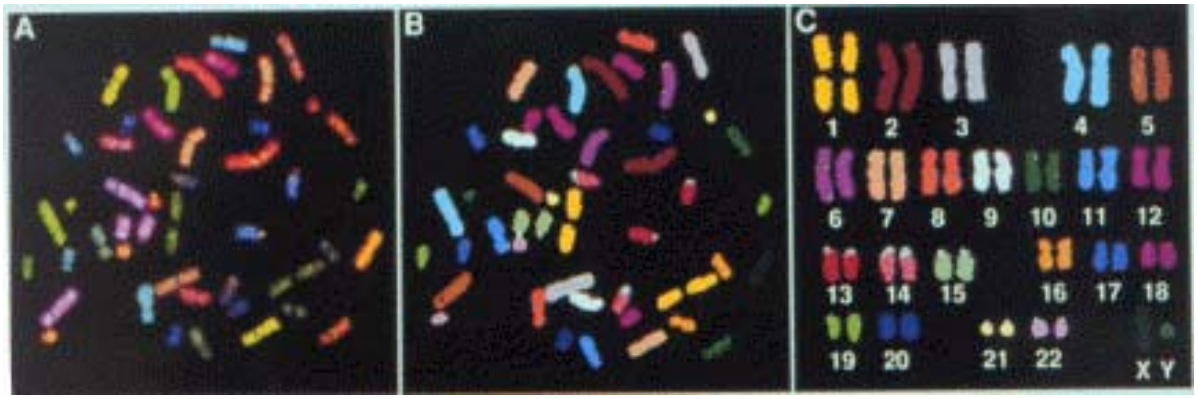
- **<u>XX/XY tip determinacije spola</u>**

Ovaj tip determinacije karakterističan je za većinu sisavaca i neke kukce (Diptera). Ženke su HOMOGAMETNOG spola (stvaraju jednu vrstu gameta s obzirom na spolne kromosome; X), a mužjaci su HETEROGAMETNOG spola (stvaraju dvije vrste gameta: 50% gameta nosi X, a 50% gameta nosi Y kromosom).




**Slika 5.4**. Nasljeđivanje spolnih kromosoma u vrstama sa XX/XY tipom determinacije spola.

Slike A i B prikazuju kariotip čovjeka, a slika C kariogram čovjeka:



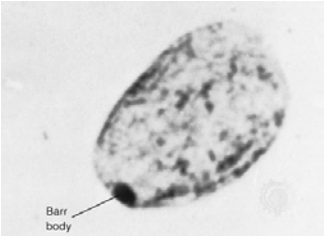

a) Zašto su na slikama A i B prikazana dva kariotipa?
b) Koliko kromosoma se nalazi u somatskim stanicama žene, odnosno muškarca?
c) Koliko se kromosoma nalazi u gametama u muškog, a koliko u ženskog spola?
d) Koliko tipova gameta stvaraju muškarci, a koliko žene?
e) Koliki je teoretski omjer spolova u svakoj generaciji?

? Kućni miš ima 40 kromosoma u somatskim stanicama.
a) Koliko je kromosoma ovaj miš naslijedio od svog muškog roditelja?
b) Koliko autosoma nalazimo u gametama miša muškog spola?
c) Koliko spolnih kromosoma nalazimo u ženskoj gameti?
d) Koliko autosoma nalazimo u somatskim stanicama ženke miša?

**Spolni kromatin (Barr-ovo tijelo**)

Budući da mužjaci sisavaca posjeduju samo jedan kromosom X u odnosu na ženke, postavlja se pitanje na koji način se postiže genska ravnoteža između spolova (kompenzacija doze). Kod ženki se, u vrlo ranom embrionalnom razvoju, jedan od dva kromosoma X nasumično inaktivira i ostaje inaktiviran tijekom cijelog života. Taj inaktivirani kromosom X vidljiv je u jezgri somatskih stanica ženki kao malo, nešto jače obojano tijelo koje nazivamo spolni kromatin ili Barr-ovo tijelo prema istraživaču koji ga je prvi otkrio (Murray Barr 1949). Broj Barr-ovih tijela u nekoj stanici je broj kromosoma X umanjen za 1.

Spolni kromatin vidljiv je u interfazi somatskih stanica ženki sisavaca uključujući čovjeka (slika 5.5.). Služi kao biljeg koji ukazuje na broj kromosoma X; broj Barr-ovih tjelešaca za jedan je manji od broja X kromosoma. U nekim slučajevima je moguće prema broju Barr-ovih tijela utvrditi poremećaje broja X kromosoma. Primjerice, u žena s rijetkim sindromom nazvanim „triple-X“ u jezgrama somatskih stanica vidljiva su dva Barr-ova tijela.




**Slika 5.5.** Barr-ovo tjelešce vidljivo kao tamno područje uz periferiju jezgre

Koliko Barr-ovih tijela imaju osobe navedenog spolnog genotipa:

X0
XY
XX
XXY
XXX

**Praktičan rad: Promatranje Barr-ovog tijela u interfaznim jezgrama epitelnih stanica bukalne sluznice.**

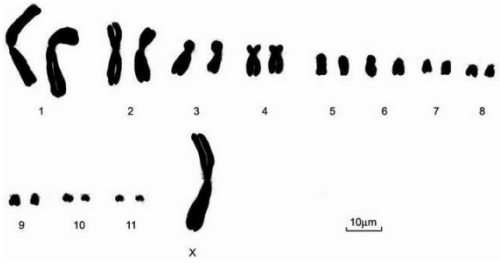
Čistim vatiranim štapićem nekoliko puta prođite po unutarnjoj strani bukalne sluznice i napravite razmaz na predmetnom stakalcu. Dodajte kap acetokarmina, pokrijte pokrovnicom, lagano zagrijte i pritisnite palcem pokrovnicu zajedno sa filter papirom („squash“). Spolni kromatin vidljiv je kao jače obojano duguljasto tijelo uz jezgrinu ovojnicu.
Nacrtajte sliku koju vidite promatrajući stanice pomoću mikroskopa te na njoj označite Barr-ovo tijelo!

- **<u>XX/X0 tip determinacije spola</u>**

Ovaj tip determinacije spola predstavlja evolucijski derivat XX/XY tipa determinacije spola, a nalazimo ga u nekih vrsta sisavaca i nekih kukaca, primjerice stjenica, skakavaca i kornjaša. Ženke su homogametnog spola (XX), dok su mužjaci (X0) hetererogametnog spola (slika 5.6.).

**Slika 5.6.** Nasljeđivanje spolnih kromosoma u vrsta sa XX/XO tipom determinacije spola.

Slika prikazuje kariogram kukca *Bradyporus macrogaster macrogaster* Lef. (Orthoptera: Tettigonioidea, Bradyporini)



a) Kojeg je spola ova jedinka?
b) Kakve gamete stvaraju ženke, a kakve mužjaci?

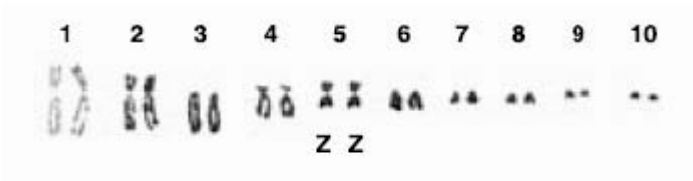
- **<u>ZW/ZZ tip determinacije spola</u>**

Spolni kromosomi su označeni sa Z i W zato da bi se naglasila razlika u odnosu na XX/XY tip determinacije spola, jer su u ovom slučaju ženke HETEROGAMETNI (ZW), a mužjaci HOMOGAMETNI spol (ZZ). Ovaj tip determinacije nalazimo kod leptira, moljaca, gmazova, nekih riba i ptica (slika 5.7.).

**Slika 5.7.** Nasljeđivanje spolnih kromosoma u vrsta sa ZZ/ZW tipom determinacije spola.

Na slici su prikazani kromosomi jedne vrste ptica.

a) Koji kariogram pripada jedinki ženskog, a koji jedinki muškog spola?
b) Koliko autosoma nalazimo u gametama, odnosno somatskim stanicama ovih jedinki?




**SPOLNO- VEZANO NASLJEĐIVANJE**

Spolno vezanim genima nazivamo one gene koji se nalaze na kromosomu X ili analognom kromosomu Z. Kod većine organizama kromosom Y nosi vrlo malo ili gotovo nema aktivnih gena, stoga se spolno vezani geni prvenstveno odnose na gene na kromosomu X. Gene na kromosomu Y nazivamo holandričnima zato jer ih nalazimo samo u mužjaka. Mužjaci su za spolno vezane gene ***HEMIZIGOTI*** jer nose samo jedan alel za spolno-vezana

svojstva.

Kod diploidnih organizama s XX/XY ili XX/XO tipom determinacije spola, svojstvo determinirano spolno-vezanim:

a) ***recesivnim*** genom iskazuje se na slijedeći način:

1. češće se iskazuje u mužjaka nego u ženki
2. rijetko se pojavljuje u muškog roditelja i muškog potomka, osim u slučaju kad je ženski roditelj heterozigot
3. ne pojavljuje se u ženki ukoliko se nije pojavilo u roditeljskoj generaciji i generaciji prije;

b) ***dominantnim*** genom iskazuje se na slijedeći način:

1. češće se iskazuje u ženki nego u mužjaka
2. javlja se u ženskih potomaka ukoliko je isto svojstvo nosio muški roditelj
3. ne prenosi se s majke na muškog potomka ukoliko majka nije nositeljica.

***U čovjeka su daltonizam, hemofilija i juvenilna mišićna distrofija najčešći primjeri spolno-vezanih recesivnih bolesti. Primjer spolno-vezanih dominantnih bolesti je sindrom fragilnog X kromosoma.***

**Nasljeđivanje bijelih očiju u vinske mušice**

Boja očiju u vinske mušice određena je genom koji se nalazi na X kromosomu. Crvena boja očiju (divlji tip) dominantna je u odnosu na bijelu boju. Budući da ženke imaju dva X kromosoma, one mogu biti homozigotne ili heterozigotne za ovaj gen, dok mužjaci mogu biti samo hemizigotni tj. boja očiju ovisi o genu koji se nalazi na X kromosomu naslijeđenom od majke:

**Nasljeđivanje boje perja u kokoši**

Šareno perje kod kokoši određeno je spolno vezanim dominantnim alelom $Z^B$, dok recesivni alel $Z^b$ određuje jednobojno perje. Na kromosomu W nema alela za boju perja.

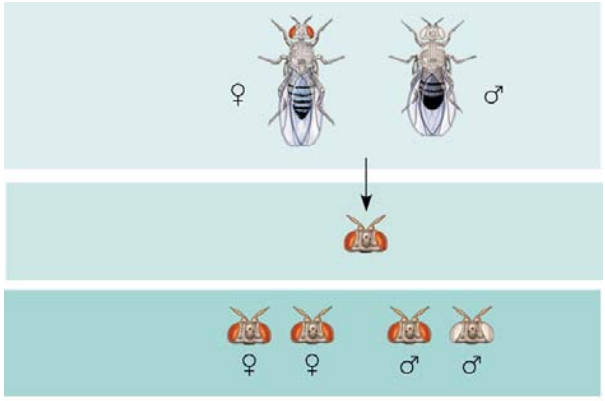
**Nasljeđivanje uvjetovano spolom**

Ekspresija nekih autosomalnih gena uvjetovana je spolom. Na primjer, ćelavost u ljudi određena je genom koji se nalazi na autosomu, a ne na spolnom kromosomu. Ipak, spol jedinke određuje fenotip - muški hormon testosteron odgovoran je za ekspresiju tog alela. Žena koja ima odgovarajući genotip koji određuje ćelavost ipak neće oćelaviti sve do iza menopauze jer hormon estrogen koči ekspresiju gena za ćelavost. Stoga se u muškaraca ovo svojstvo ponaša kao dominantno, a u žena kao recesivno.

? Odredite moguće genotipove ćelavog muškarca i ćelave žene?
Ako su oba roditelja heterozigoti, koja je vjerojatnost da njihova djeca budu ćelava?

## ZADACI

1. Nadopunite slijedeće križanje oznakama genotipa i objasnite na koji način je to križanje potaknulo Morgana da zaključi da se gen za boju očiju nalazi na X, a ne na Y kromosomu!




a) Ako bi se gen za bijelu boju očiju nalazio na autosomu, kakav fenotipski omjer biste očekivali nakon križanja čistih linija ženke crvenih i mužjaka bijelih očiju?
b) Ako bi se gen za bijelu boju očiju nalazio na kromosomu Y, kakav biste fenotipski omjer očekivali nakon križanja čistih linija ženke crvenih i mužjaka bijelih očiju?

2. Ako je ženka heterozigot za neko spolno-vezano svojstvo i ako uzmemo u obzir činjenicu o nasumičnoj aktivaciji jednog od kromosoma X, kakva će biti ekspresija alela u somatskim stanicama za to spolno-vezano svojstvo?

3. Zamislite da imate dvije čiste linije kanarinaca, jedna linija kanarinaca ima žuto perje, a druga smeđe. U križanjima između te dvije linije, žute ženke i smeđi mužjaci dobili su samo smeđe potomke, dok su smeđe ženke i žuti mužjaci dobili smeđe potomke muškog spola i žute potomke ženskog spola. Predložite hipotezu koja objašnjava ove rezultate. Napišite ova križanja.

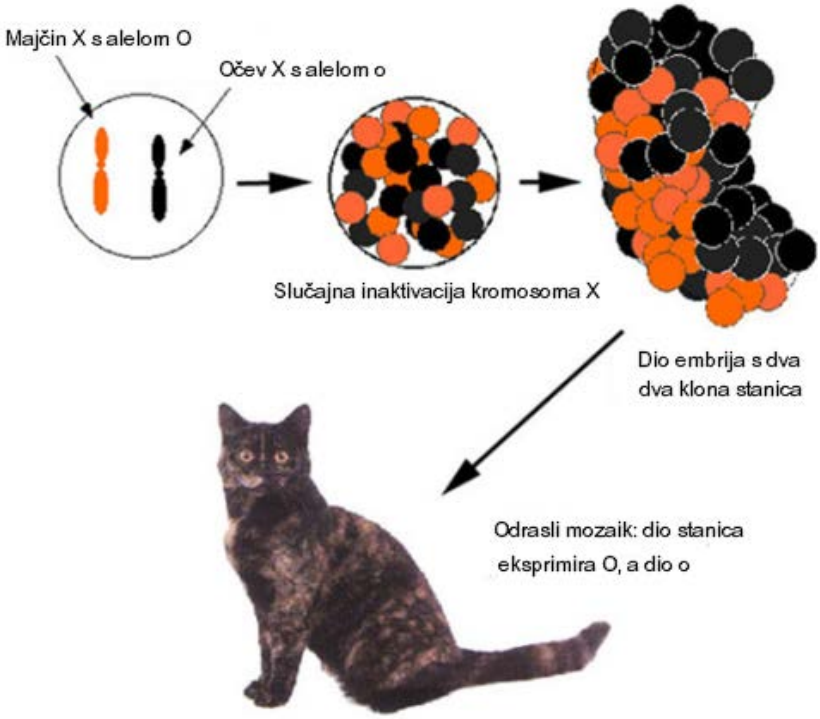
4. Križali ste ženku vinske mušice bijelih očiju s mužjakom divljeg fenotipa.

   a) Kakvo potomstvo očekujete u $F_1$ generaciji obzirom na boju očiju?
   b) Kojeg su spola potomci koji su naslijedili boju očiju od muškog roditelja, a kojeg su spola potomci koji su naslijedili boju očiju od ženskog roditelja?
   c) Objasnite na primjeru ovog zadatka princip križnog nasljeđivanja?

5. U “calico“ mačaka, krzno je određeno s dva gena, jedan se nalazi na kromosomu X, a drugi na jednom od autosoma. Spolno-vezani gen odgovoran je za crnu i narančastu boju krzna (ovisno o alelu), a bijela boja krzna određena je autosomalnim genom.

a) Kakve boje krzna može biti ženka, a kakve mužjak?
b) Napišite genotip mačke krzna calico upotrijebivši proizvoljne oznake za spolno-vezane i autosomalne alele.

6. Krzno boje kornjačevine, kombinacija narančaste i crne boje krzna isključivo ovisi o spolno-vezanom genu na kromosomu X. O čemu ovisi veličina površine krzna jedne ili druge boje?




7. Mačka krzna boje kornjačevine parila se s narančastim mužjakom. Prikažite ovo križanje. Kakvo potomstvo očekujete s obzirom na spol i boju krzna?

8. Kakvo potomstvo očekujete kod roditelja koji su fenotipski normalnog vida, ali je majka nositeljica gena za daltonizam.

9. Dječak daltonist ima roditelje normalnog vida.
   a) Napišite genotip dječaka!
   b) Ako se dječakov brat normalnog vida oženi djevojkom koja je heterozigot za to svojstvo, koji su mogući genotipovi i fenotipovi njihove djece?

10. Žena s defektnom zubnom caklinom (dominantno spolno-vezano svojstvo) ima oca daltonistu sa zdravim zubima i majku normalna vida, ali defektne zubne cakline, a udaje se za svog bratića koji je daltonist s normalnom zubnom caklinom. Koja je vjerojatnost da će njihovo dijete biti daltonist s normalnom zubnom caklinom?

11. Mišićna distrofija (MD) je bolest u ljudi uzrokovana rijetkim X-vezanim recesivnim alelom. Uzrokuje progresivno slabljenje mišića i smrt prije 20-te godine života.
    a) Koja je vjerojatnost da prvi sin žene čiji je brat imao MD, također oboli od mišićne distrofije?
    b) Koja je vjerojatnost da drugi sin žene čiji je brat imao MD, oboli od MD, ako prvi sin također ima MD?
    c) Koja je vjerojatnost da dijete zdravog oca čiji brat ima MD, oboli od MD?

12. Šareno perje kod kokoši određeno je spolno vezanim dominantnim alelom B, dok recesivni alel b određuje jednobojno perje. Kakve piliće očekujte iz križanja jednobojne koke i šarenog pijetla čiji je ženski roditelj bio jednobojan?

13. Pretpostavimo da je boja perja u papige spolno vezano svojstvo i da je zeleno perje (P) dominantno nad plavim (p). Kakve potomke očekujete nakon križanja zelene ženke i plavog mužjaka?

14. Spolno vezani gen „notch“ (N) je letalan u vinske mušice u hemizigota i dominantnih homozigota. Mutacija se fenotipski očituje kao urezi na vrhovima krila. Kakvo potomstvo očekujete nakon križanja mužjaka divljeg tipa i ženke koja ima ureze na krilima? Kakvi su fenotipski omjeri $F_1$ i $F_2$ generacije s obzirom na spol i oblik krila?

15. Smatra se da je neuobičajeno kratki kažiprst u ljudi određen genom koji se u muškaraca ponaša kao dominantan, a u žena kao recesivan. Kakav fenotip potomstva i u kojem omjeru očekujete od heterozigotnog muškarca kratkog kažiprsta i heterozigotne žene normalne duljine kažiprsta?

16. Autosomalni recesivni gen *tra*, kada ju u homozigotnom stanju, transformira ženke vinske mušice u fenotipske mužjake koji su sterilni. Taj gen nema utjecaja na mužjake vinske mušice. Križani su ženka heterozigotna za *tra* lokus i mužjak homozigotan za recesivni alel. Kakav odnos spolova očekujete među potomstvom?

## 6. VINSKA MUŠICA

Vinska mušica je maleni kukac, dvokrilac, dužine 2-3 mm čije je znanstveno ime *Drosophila melanogaster*, Meigen 1830. Naziv je dobila prema latinskim riječima koje označavaju organizam koji voli rosu, vlagu i ima tamni zadak. Vjerojatno ste je zapazili krajem ljeta i u jesen kad se u velikom broju sakuplja na toplim mjestima na kojima fermentira voće, vino, pivo ili isparava octena kiselina. Do sada je otkriveno preko 1200 vrsta roda *Drosophila*. Većina vrsta živi u tropskoj i suptropskoj zoni. Smatra se da *D. melanogaster* potječe iz indo-malajskog područja. Prateći transport voća, širi se u gotovo sva područja svijeta te postaje kozmopolit. Slab je letač. U toku dana udalji se najviše do 180 m.

Vinska mušica je pogodan organizam za upoznavanje različitih bioloških procesa (razvitak, nasljeđivanje, mutacije i dr.). Njezino je ime u znanosti vezano uz razvoj klasične i molekularne genetike. Vinska mušica se koristi u genetičkim istraživanjima od 1909. godine kada ju je u svoje pokuse uveo Thomas H. Morgan (1866-1945). Od tada je ova neugledna mušica nezamjenjiv materijal u klasičnim i molekularnim genetičkim istraživanjima. Postoji niz razloga zašto je vinska mušica modelni organizam u genetičkim istraživanjima:

- Malena je (duga oko 3 mm)
- Može se lako i uz mala materijalna sredstva uzgajati u laboratoriju i to u velikom broju
- Velika količina informacija dostupna je danas o vinskoj mušici budući da se već sto godina koristi kao modelni organizam
- Relativno malen genom (genom vinske mušice je 5% veličine ljudskog genoma) i mali broj kromosoma (2n=8)
- Čitav genom je sekvenciran
- Na tržištu su dostupne mutante bilo kojeg od nekoliko tisuća gena
- Kratak životni ciklus - vrijeme koje je potrebno da se proizvede nova generacija odraslih jedinki vinskih mušica je oko 2 tjedna (10 dana u optimalnim uvjetima)
- Veliki broj potomaka; ženka tijekom svog života može položiti stotine jajašaca, pa istraživač raspolaže s velikim brojem jedinki što čini statističku obradu podataka lakom i pouzdanom
- Divovski (politeni) kromosomi u jezgrama žlijezda slinovnica ličinaka (može se razlučiti mnogo više strukturnih detalja nego na kromosomima normalne veličine, a vidljivi su za vrijeme interfaze kada ostali kromosomi nisu vidljivi)
- Embrij se razvija izvan tijela i može se lako proučavati u svakoj fazi razvoja
- *Izostanak krosingovera u mužjaka.*

## GENOM VINSKE MUŠICE

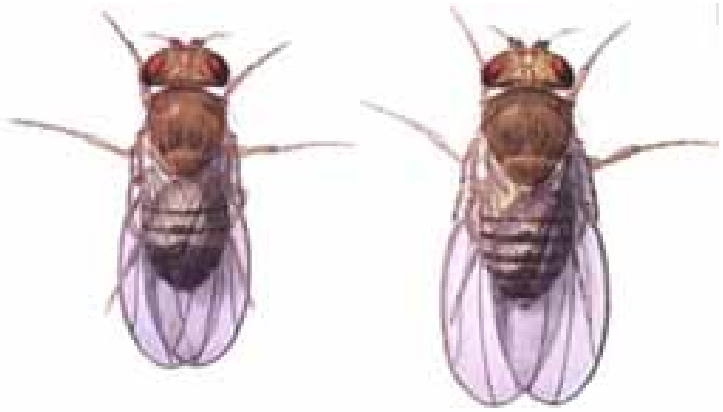
Vinska mušica ima 4 para kromosoma (2n=8): 3 para autosoma (kromosomi II; III; IV) i jedan par spolnih kromosoma X i Y. Kromosom X je velik i akrocentričan, kromosomi II i III su veliki i metacentrični, a kromosom IV je značajno manji od ostalih kromosoma u kariotipu (2% veličine najvećeg autosoma) i naziva se minutni kromosom. Veličina genoma vinske mušice iznosi 165 x $10^6$ pb. Genom se sastoji od oko 13.600 gena.

## GRAĐA TIJELA

Vinska mušica kao i svi kukci ima tijelo sastavljeno od glave, prsa i zatka. Površinu tijela obavija hitinski oklop pokriven sitnim dlačicama i krupnijim čekinjama.

Na glavi se nalaze usni organi, ticala i oči. Tri mala jednostavna oka smještena su na tjemenu, a velike poput saća sastavljene oči nalaze se na bočnim stranama glave. U mužjaka one imaju oko 740 okašaca, a u ženke oko 780. Usni organi s velikom donjom usnom se ispruže u slučaju ako lagano iglicom pritisnete glavu.

Prsa se sastoje od tri kolutića. Svaki kolutić povezan je s jednim parom člankovitih nogu. Velika ispružena krila vezana su za drugi kolutić. Iza njih na zadnjem prsnom kolutiću vide se mali izraštaji poput balončića, mahalice. To su ostaci nekadašnjeg drugog para krila nestalih tokom evolucije. Zadak je sastavljen iz 10 segmenata. U ženke jasno se uočava 7 kolutića, a u mužjaka 6. Ostali kolutići su izmijenjeni, izgrađuju strukture vezane za spolne organe.



**Slika 6.1.** Spolni dimorfizam (dvoličje) vinske mušice: mužjak (lijevo) i ženka (desno).

Upotrebom mikroskopa možete raščlanjivanjem zatka dobro vidjeti probavilo, dišne organe i spolni sustav.

## SPOLNO DVOLIČJE

U vinskih mušica relativno je dobro izraženo spolno dvoličje (dimorfizam, slika 6.1.) vidljivo okom iskusnog promatrača ili pomoću lupe. Razvrstajte narkotizirane mušice u dvije skupine prema veličini tijela i obliku zatka. Ženke su veće, zadak završava šiljato. Na leđnoj strani vidi se 5-6 vodoravnih tamnih pruga. Na zatku mužjaka vidljive su dvije pruge i tamni obli završetak zatka (Slika 3.1). Okrenite mušicu na leđa. Na prednjim nogama samo mužjaci imaju spolni češalj, vidljiv na malom povećanju kao crna točka. Sekundarne spolne osobine mužjaka i ženki vinske mušice predočene su u Tablici 6.1.

**Tablica 6.1.** Sekundarne spolne osobine u mužjaka i ženke vinske mušice

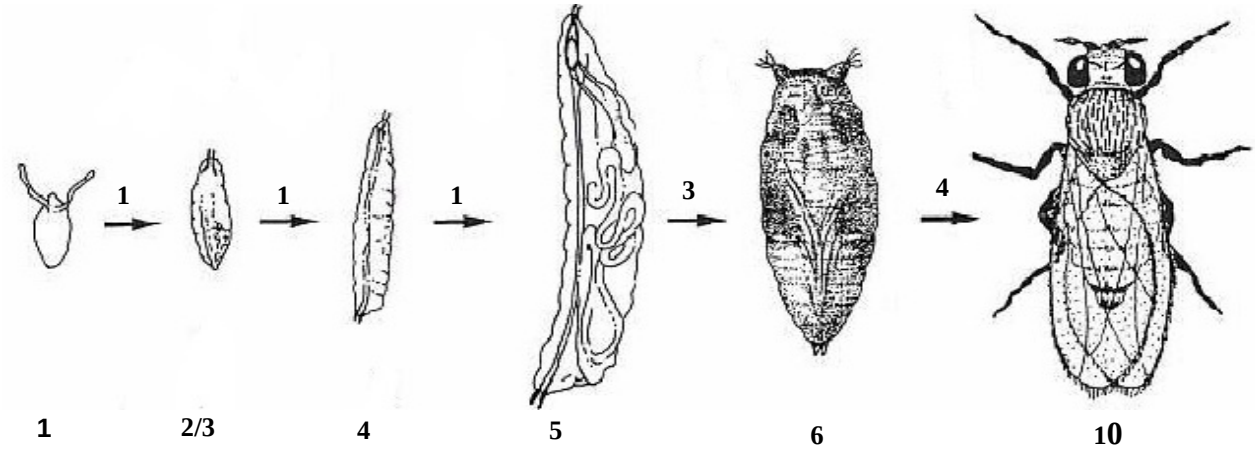
| **Mužjak** | **Ženka** |
|---|---|
| Manji | Veća |
| Zaobljen zadak | Zašiljen zadak |
| Distalni dio zatka tamno obojen | Na distalnom dijelu zatka tamne i svijetle pruge |
| Na prvom paru nogu češalj za prihvaćanje na ženku pri kopulaciji | Nema češlja na prvom paru nogu |
| Kopulatorni organi između dva genitalna nabora | Vanjsko genitalno polje s leglicom |

## RAZVOJNI CIKLUS

Razvitak vinske mušice odvija se kroz 4 stadija: jaje → ličinka → kukuljica → odrasli organizam. Embrionalni razvoj obuhvaća procese brazdanja i razvoj ličinke u jajetu. U kukuljici se odvija potpuna preobrazba, metamorfoza. Vrši se razgradnja ličinke, a izgrađuju se tkiva i organi kukca.

<u>Životni ciklus vinske mušice kod optimalne temperature od 25 ºC (Slika 6.2.):</u>

**DAN STADIJ**
1 Položeno jaje
2 Izlaženje iz jaja
3 Prvo presvlačenje
4 Drugo presvlačenje
5 Treće presvlačenje
6 Početak kukuljičenja
10 Odrasla mušica




**Slika 6.2.** Faze razvoja vinske mušice: brojevi iznad strelica predstavljaju broj dana između pojedinih faza razvoja. Brojevi ispod crteža odgovaraju gore navedenim stadijima razvoja.

## OPLODNJA

Ako stavimo dva do tri para mušica na svježu hranjivu podlogu, nakon perioda prilagođavanja u povoljnim uvjetima u toku prvog dana dolazi do parenja i oplodnje. Mužjak započinje ples krilima. Ženku prepoznaje mirisom. Za vrijeme parenja mužjak je pričvršćen za zadak ženke, savijen u luku što traje oko dvadeset minuta. 500-700 spermatozoida preživljava nekoliko dana u spolnim organima ženke. Jedno parenje dovoljno je za oplodnju do 600 jajnih stanica. Ženke vinske mušice pare se više puta pa može doći do miješanja sperme i pojave potomaka različitih svojstava.

Prva dva dana nakon izlaska iz kukuljice ženke ne odlažu jaja. Ženke nose najveći broj jajašaca četvrti i peti dan i tada ih u toku dana mogu odložiti 50-70. Broj snesenih jaja najviše ovisi o plodnosti linije i sastavu podloge. Maksimalan broj jaja ostavljaju na kulturi kvaščevih gljivica, staroj 24-36 sati. Starenjem kulture kvasca broj jajašaca se smanjuje.

## GRAĐA JAJETA

Jaje vinske mušice vidljivo je prostim okom kao bijelo sitno zrnce. Veliko je do 0,5 mm, ima ovalan oblik. Donja strana mu je ravna, a gornja obla. Na prednjem kraju nalazi se otvor, mikropila. Izraštaji (filamenti) povećavaju dodirnu površinu s podlogom i ne dozvoljavaju da jaje potone u tekuću podlogu. Time se osigurava embrionalni razvoj u atmosferi s kisikom. Ličinka izlazi iz jajeta pri temperaturi od 25 °C nakon 24 sata.

## LIČINKA

Postembrionalni razvoj vinske mušice počinje izlaskom male ličinke velike oko 0.5 mm iz jajeta. Ličinke najprije borave na površini podloge, a zatim ulaze u podlogu. Mogu živjeti anaerobno, bez kisika iz atmosfere. Prozirna kutikula obavija tijelo ličinke sastavljeno iz 12 kolutića. Prvi kolutić pripada glavi, tri izgrađuju prsa, a zadnjih osam zadak. Ličinka raste, razvija se kroz tri razvojna stadija između kojih se presvlači te odbacuje kutikulu. Od unutrašnjih organa u prozirnoj ličinki vidljivo je probavilo, uzdušnice, žlijezde slinovnice, masno tkivo, spolne žlijezde i zametne pločice iz kojih će se razviti organi kukca. Prema razvoju prednjeg dijela uzdušnica može se odrediti u kojem je razvojnom stadiju ličinka. Primarna ličinka ima samo tanke ogranke uzdušnica u prsnim segmentima. U sekundarnoj se formiraju dišni otvori. Izgledaju poput pribadače, još uvijek su zatvoreni. Otvaraju se u sekundarnoj ličinki, razgranjenim nastavcima poput kista. Završetkom trećeg razvojnog stadija ličinke dostižu dužinu do 5 mm. Izlaze iz hranjive podloge, pronalaze suha mjesta, pričvrste se, skraćuju i prelaze u stadij pretkukuljice. Kutikula se ne odbacuje, već se stvrdnjava u bačvicu, puparijum, žuto-smeđe boje. Pretkukuljica se unutar bačvice odvaja i razvija u novu kutikulu. Razvoj ličinke pri temperaturi od 25 °C traje četiri dana.

## KUKULJICA

Kukuljica se razvija formiranjem glave, prsa i zatka. Okružena je s tri membrane. Izvana je bačvica i kutikula pretkukuljice, a na površini kukuljica ima vlastitu kutikulu. Proces razgradnje tkiva, histoliza, potpuno zahvaća probavilo, žlijezde slinovnice i masno tkivo. Izgradnju novih tkiva i organa iz zametnih pločica nazivamo histogeneza. U starijoj kukuljici vidljive su obojene oči, noge i tamna krila. Potpuno razvijeni kukac izlazi otvaranjem poklopca na prednjem dijelu bačvice. Izležena vinska mušica je izdužena, svijetle

boje i bez pigmenta. Krila su joj složena na zatku. Postepeno ih širi, dobiva pigment i izgled odrasle mušice.

## UZGOJ VINSKE MUŠICE U LABORATORIJU

### PODLOGE ZA UZGOJ VINSKE MUŠICE

Odrasle vinske mušice hrane se gljivicama alkoholnog vrenja, a njihove ličinke voćem i sokovima koji previru. Osnovne tvari u svakoj hranjivoj podlozi zato moraju biti kvasac i šećer. Ovisno o namjeni uzgoja i materijalnim uvjetima vinske mušice se mogu održavati na različitim podlogama. Kratkotrajno održavanje, radi upoznavanja građe ili razmnožavanja, moguće je na prirodnoj podlozi od usitnjenog voća bogatog ugljikohidratima, npr. bananama, šljivama ili kruškama. Za kontinuirano održavanje potrebno je spriječiti razvoj plijesni pomoću nipagina ili propionske kiseline. Dodavanjem agara podloga postaje homogena, dovoljno suha da se mušice ne zalijepe.

U našim laboratorijima koristi se najčešće podloga:

voda 400 ml

agar 4 g

šećer 40g

kvasac suhi pekarski -2-vrećice (7 g)

posije (kukuruzni griz) 40 g

propionska kiselina 4 ml

Podlogu skuhajte tako da najprije postupnim zagrijavanjem vode otopite agar, a zatim šećer i kvasac. Smjesu zagrijte do vrenja, dodajte posije, kuhajte uz stalno miješanje 10 minuta. Nakon kuhanja u podlogu se doda propionska kiselina. Smjesu dobro promiješajte da dobije ravnomjernu koncentraciju konzervansa. Nakon prestanka isparavanja podlogu izlite kroz lijevak u sterilizirane staklene bočice ili epruvete do visine oko 2 cm. Nakon što se podloge ohlade zatvorite ih čepovima od vate. Do upotrebe podloge je najbolje držati u hladnjaku na temperaturi višoj od ledišta. Zamrzavanjem bi agar izgubio sposobnost vezivanja vode. Sušenje podloge spriječite pokrivanjem otvora posude folijom ili poklopcem.

### OPREMA ZA ISTRAŽIVANJE

Oprema za istraživanje je vrlo jednostavna. Potrebna je lupa, a za anesteziju mušica upotrebljava se eter. Mušice omamljene eterom stavljaju se na satno staklo i pregledavaju pod lupom. Mekanim kistom odvajaju se mušice potrebne za izvođenje eksperimenta.

**PRAKTIČAN RAD: Rukovanje vinskim mušicama i određivanje spola**

Kemikalije:

- Eter

Pribor:

- Lupa i mikroskop
- Petrijeve zdjelice
- Predmetna stakalca
- Mekani kist
- Slamčice za hvatanje i anesteziranje mušica
- Sterilna gaza
- Škare
- Ljepljiva traka

- Izradite alat za hvatanje vinske mušice. Na raspolaganju vam je slamčica, sterilna gaza i ljepljiva traka. Odrežite dio sterilne gaze (otprilike 4 cm x 4 cm). Sa sterilnom gazom pokrite jedan otvor slamčice te zalijepite ljepljivom trakom. Usišite mušice u slamčicu (otvor slamčice sa sterilnom gazom okrenut je prema gore). Dovoljno je da upušete jednog mužjaka i jednu ženku. Okrenite slamčicu tako da je otvor s gazom okrenut prema dolje. Omamite mušice nad eterom (otvor slamčice s gazom i vinskim mušicama držite nad eterom), te ih zatim prebacite na satno staklo i gledajte uz pomoć lupe ili mikroskopa na malom povećanju. Pri omamljivanju budite oprezni, eter je lako zapaljiv, ima snažan miris i može ubiti mušice ako su mu predugo izložene. Mušice odvajajte kistom da ih ne biste oštetili. Uočite spolne razlike navedene u tablici 6.1.

**MUTACIJE**

U genetičkim istraživanjima koriste se normalne mušice (divlji tip, ++) i različite mutante. Mušice divljeg tipa imaju duga ticala, ravna krila za 1/3 duža od tijela, duge noge, sivo-smeđe tijelo i žarko crvene oči (slike 6.4. i 6.5.).

Thomas H. Morgan je u svojoj knjizi „The Genetics of Drosophila“ iz 1925. opisao 61 mutantu vinske mušice. Danas ih je poznato mnogo više. Sve mutacije koje danas postoje pohranjene su u centru „Bloomington Drosophila Stock Center“ Sveučilišta Indiana, SAD i većina ih je komercijalno dostupna. Mutante se mogu naručiti preko interneta (adresa: http://flystocks.bio.indiana.edu/). Za nastavne svrhe mutante su besplatne (do pet mutanti može se besplatno naručiti).

Mutacija je promjena u genu koja rezultira promjenom određenih karakteristika (fenotipa) organizma. Mutante se od divljeg tipa mogu razlikovati prema:

- obliku i veličini krila, rasporedu žila na krilima,
- boji tijela,
- obliku i boji očiju,
- različitim defektima na glavi,
- dugovječnosti (mutante obično žive kraće),
- sterilnosti.

Ako se radi o letalnoj mutaciji mušice ugibaju rano u embrionalnom razvoju.

Zapravo, većina mutanti u prirodi ne bi preživjela, ali u laboratoriju ih se može održavati kroz niz generacija.

Mutacije mogu biti recesivne (mutantni fenotip se ispoljava samo ako se radi o recesivnom homozigotu) i dominantne (mutantni fenotip se ispoljava i kod dominantnog homozigota i kod heterozigota). Mutirani geni mogu se nalaziti na autosomima ili na spolnim kromosomima.

Mutante imaju različita imena koja opisuju promijenjeni fenotip u odnosu na divlji tip. Recesivne mutacije se označavaju malim slovom, a dominantne velikim slovom ili malim slovom uz koje se nalazi oznaka „+“ (tablica 6.2.).

**Tablica 6.2.** Mutante vinske mušice

| **kromosom** | **oznaka mutante** | **naziv mutante** | **fenotip** |
|---|---|---|---|
| I (X) | w | white | bijele oči |
| | y | yellow | žuta boja tijela |
| | wa | warty | narančaste oči |
| II | bw | brown | smeđe oči |
| | Cy | curly wings | savijena krila, dominantna mutacija (dom. homozigoti ugibaju) |
| | pr1 | reddish-purple | crveno-ljubičaste oči |
| | cn | cinnobar | cinober oči |
| | b | black | crna boja tijela |
| | vg | vestigial | zakržljala krila |
| | wg | wingless | bez krila, recesivna letalna mutacija |
| III | Antp | antapedia | na glavi umjesto ticala narastu noge, dominantna letalna mutacija |
| | e | ebony | crno tijelo |
| | cd | cardinal | narančaste oči |
| | st | scarlet | grimizne oči |
| IV | ey | eyeless | bez očiju |

Označavanje genotipa vinske mušice:
primjer: recesivni homozigot za cinober oči = cn cn; heterozigot = $cn^+$ cn; dominantni homozigot= $cn^+$ $cn^+$

**Dvostruki recesivni homozigoti (cnbw/cnbw i bwbwstst) imaju bijele oči:**

Među vinskim mušicama poznate su jedinke bijelih očiju čija boja nije posljedica jedne mutacije na kromosomu X (I), već dviju mutacija na nekim autosomima. Homozigotne recesivne mušice za cinober i smeđu boju očiju imaju bijele oči. Budući da se geni za cinober i smeđu boju očiju nalaze na istom kromosomu (oba gena su vezana za kromosom II) oznaka takvog genotipa je **cnbw/cnbw**. Također, homozigotne recesivne mušice za smeđu/***b****rown* (kromosom II) i grimiznu/***s****carlet* boju čiju (kromosom III) imaju bijele oči. Budući da se geni za smeđu i grimiznu boju očiju nalaze na različitim kromosomima oznaka takvog genotipa je **bwbwstst**.

## KRIŽANJE VINSKIH MUŠICA

Vinske mušice su idealan organizam za križanja. Prilikom križanja, važno je voditi računa da se pokus započne s djevičanskim ženkama. Razumljivo je da se u novo križanje ne smije ući s već oplođenim ženkama. Potrebno je paziti da se djevičanske ženke odvoje od ostalih mušica prije nego se počnu pariti.

## NEOPLOĐENE ŽENKE

Za upoznavanje razvojnog ciklusa vinske mušice uzmite kulturu u kojoj iz kukuljice izlaze mlade mušice. Odstranite sve mušice iz bočice. Svakih šest sati narkotizirajte mušice koje su se izlegle. Odijelite mužjake od ženki stavljajući ih u odvojene bočice s hranom. Tako se dobiju neoplođene ženke. Prvi spermiji sposobni za oplodnju pojavljuju se kod mužjaka 6-8 sati nakon izlaska iz kukuljice.

## PRAKTIČAN RAD: Postavljanje križanja vinskih mušica

Studenti se trebaju podijeliti u grupe po dvoje. Svaka grupa izvodi jedno križanje.

**Prvi tjedan** studenti postavljaju križanje roditeljske generacije (P). Asistent daje grupi dvije staklene bočice sa vinskim mušicama. Vinske mušice u obje bočice su čiste linije. U jednoj se nalaze mužjaci i ženke divljeg tipa, a u drugoj mutantne djevičanske ženke (neoplođene ženke). Bočica s mutantnim ženkama označena je brojem/slovom koji predstavlja šifru mutacije. Studenti trebaju iz bočice s divljim tipom uhvatiti 4-5 mužjaka i ubaciti ih u bočicu s ženkama. Šifru treba zapisati (zapamtiti) zbog kontrole izvođenja pokusa. Ideja je tijekom pet tjedana izvođenja pokusa dokučiti o kakvoj je mutaciji riječ (dominantna ili recesivna; spolno vezana ili autosomalna) te da li je križanje bilo dihibridno ili monohibridno. Protokol križanja naveden je u tablici 6.3.

**Drugi tjedan** od postavljanja križanja (P generacije) u podlozi se nalaze ličinke koje predstavljaju $F_1$ generaciju. Studenti trebaju iz bočice izbaciti sve odrasle jedinke tj. roditeljsku generaciju kako se ne bi parila s $F_1$ generacijom („backcrossing“ – povratno križanje).

**Treći tjedan** od postavljanja pokusa križanja (P generacije) izleći će se odrasle jedinke odnosno $F_1$ generacija. Tada treba iz bočice u kojoj se nalaze mušice $F_1$ generacije uhvatiti nekoliko mužjaka (4-5) i ženki (3-4) i prebaciti ih u novu bočicu.

**Četvrti tjedan** od postavljanja križanja (P generacije) treba iz bočice izbaciti odrasle jedinke, odnosno F1 generaciju kako se ne bi parila s $F_2$ generacijom (povratno križanje). $F_2$ generaciju predstavljaju ličinke koje su u podlozi.

**Peti-šesti tjedan** od postavljanja križanja (P generacije) izleći će se $F_2$ generacija. Studenti trebaju eterom omamiti sve jedinke $F_2$ generacije tako da začepe bočicu s mušicama vatom prethodno namočenom u eter, prebaciti vinske mušice na satno staklo, te pod lupom prebrojati dobivene fenotipove.

**Tablica 6.3.** Protokol križanja

| Vrijeme | Postupak | Pojašnjenje |
|---|---|---|
| 1. tjedan | *Nasađivanje P generacije (D x M)* | |
| 2. tjedan | *Puštanje odraslih jedinki (P generacija) iz bočice* | *Ličinke u podlozi su F1 generacija.* |
| 3. tjedan | *Nasađivanje F1 generacije (F1 X F1).** | *Odrasle jedinke su F1 generacija.* |
| 4. tjedan | *Puštanje odraslih jedinki (F1 generacija) iz bočice.* | *Ličinke u podlozi su F2 generacija.* |
| 5.-6. tjedan | *Fenotipska analiza F2 generacije*** | *Odrasle jedinke su F2 generacija.* |

**Iz bočice s odraslim jedinkama F1 generacije uhvatiti nekoliko ženki i mužjaka te ih prebaciti u novu bočicu sa svježom hranjivom podlogom za mušice.*
***Studenti trebaju prebrojati fenotipove F2 generacije križanja.*

***<u>Svaki student piše izvještaj u kojem treba biti navedeno slijedeće:</u>***

**a) o kakvom se križanju radi (monohibridno, dihibridno ili spolno vezano nasljeđivanje),**

**b) kojeg je fenotipa/genotipa mužjak, a kojeg ženka P generacije,**

**c) na kojem kromosomu se nalazi mutacija kod ženke (P generacija),**

**d) napisati križanje (P, $F_1$ i $F_2$ generaciju, te omjere fenotipova),**
**e) napisati hipotezu (tj. očekivane vrijednosti fenotipova $F_2$ generacije),**
**f) napisati eksperimentalne vrijednosti omjera fenotipova $F_2$ generacije,**
**g) odrediti hi-kvadrat vrijednost za $F_2$ generaciju (fenotip) provedenog križanja**

## 7. KARIOTIP ČOVJEKA

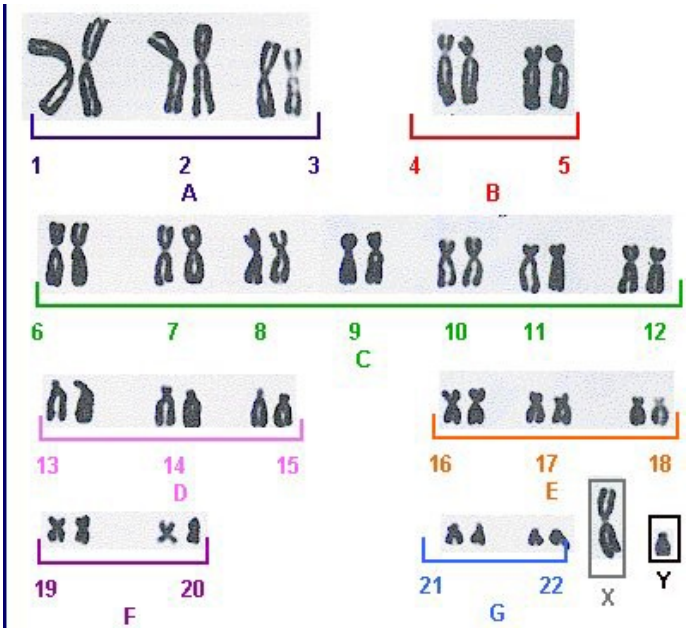
Tijo i Levan su 1956. godine dokazali da je broj kromosoma u somatskim stanicama čovjeka 46. Objekt njihovog istraživanja bilo je plućno tkivo čovječjeg embrija. Ispitavši 260 metafaza iz kulture fibroblasta plućnog tkiva humanog fetusa utvrdili su da je broj kromosoma čovjeka 46, a ne 48 kako se prije mislilo.
***KARIOTIP*** je skup svih kromosoma porijeklom iz jedne jezgre (Slika 7.6.); ***KARIOGRAM*** je kromosomska osobna karta (slika 7.1.); ***IDIOGRAM*** – grafički prikaz kariotipa (Slika 7.7.).

Prema dogovoru znanstvenika u Chicagu 1966. godine, kromosomi čovjeka posloženi su prema veličini u kariotip koji se sastoji od 23 kromosomska para. Parovi su poredani u sedam grupa (slika 7.1):

A -3 para (1-3) meta- i submetacentričnih kromosoma
B -2 para (4-5) submetacentričnih kromosoma
C -7 parova (6-12) meta- i submetacentričnih kromosoma
D -3 para (13-15) akrocentričnih kromosoma sa satelitima
E -3 para (16-18), parovi 16 i 17 su submetacentrični, par 18 je metacentričan
F -2 para (21-22) akrocentričnih kromosoma sa satelitima

Spolni kromosomi:
X kromosom je metacentričan i pripada grupi B kariotipa
Y kromosom pripada grupi G kariotipa

Primjenom različitih tehnika diferencijalnog bojanja kromosoma omogućena je preciznija identifikacija pojedinih kromosoma unutar sedam grupa (A-G) kariotipa čovjeka.

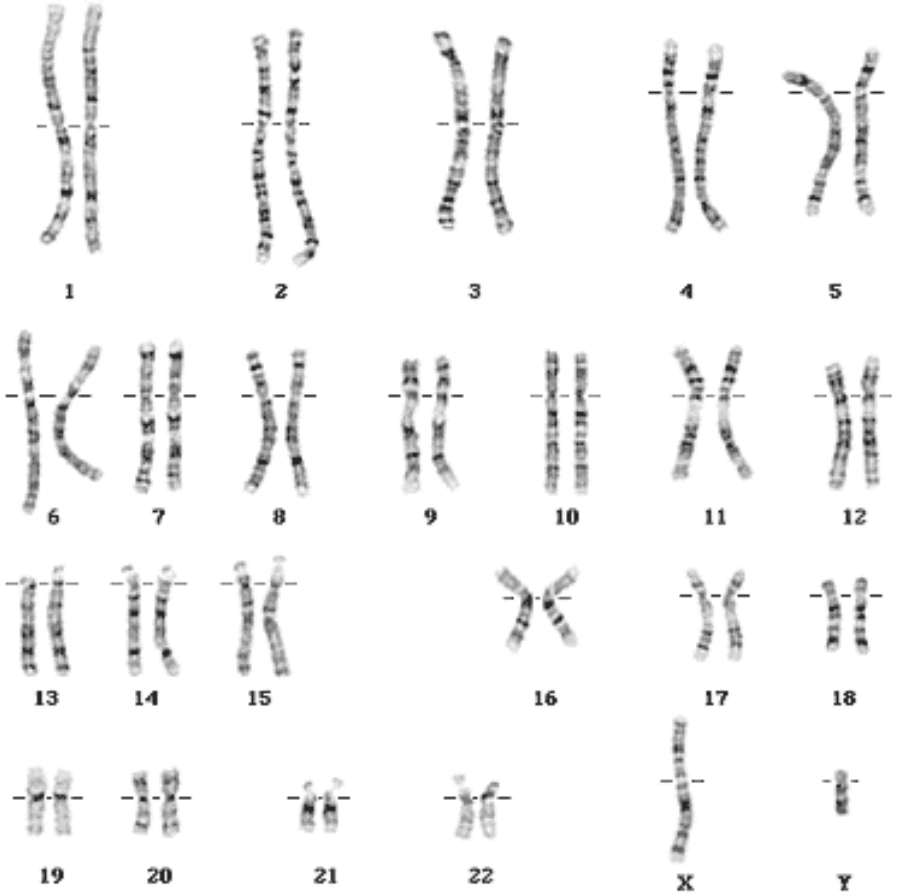



**Slika 7.1.** Kariogram čovjeka

## Analiza kromosoma čovjeka

Kromosomi čovjeka izoliraju se uglavnom iz leukocita. Sve rutinske kliničke citogenetičke analize rade se na preparatima kromosoma čovjeka koji su prethodno tretirani i bojani kako bi se vidio uzorak obojanosti (ispruganosti) koji je specifičan za svaki kromosom. Analiza ispruganosti kromosoma omogućuje otkrivanje promjena u strukturi kromosoma. Najčešće korišteno bojanje kromosoma čovjeka je G-pruganje. G-pruganje je metoda u kojoj se kromosomi tretiraju tripsinom, a nakon toga boje ljubičastom bojom Giemsa. Svaki homologni par ima jedinstveni profil G-pruga što omogućuje prepoznavanje pojedinih kromosoma u kariotipu. Tretirani kromosomski preparati analiziraju se pod svjetlosnim mikroskopom. Pregleda se 15 – 20 metafaznih stanica te im se odredi broj kromosoma. Za detaljnu analizu izabere se najmanje 5 najkvalitetnijih metafaznih ploča. Detaljna analiza temelji se na usporedbi svake pruge na jednom kromosomu s prugom homolognog kromosoma. Svrha detaljne analize je otkrivanje mogućih klinički značajnih strukturalnih promjena.

Nakon mikroskopske analize fotografiraju se najkvalitetnije metafazne stanice. Izrežu se svi kromosomi i poslože u parove prema veličini i uzorku pruganja u KARIOGRAM (Slika 7.2.). Kariogram omogućuje citogenetičaru da još bolje istraži svaki kromosom i utvrdi strukturnu promjenu (ako postoji).




**Slika 7.2.** Kariogram čovjeka. G-pruge na kromosomima čovjeka nastale nakon tretmana kromosoma tripsinom i bojanja bojom Giemsa.

## Fluorescencijsko bojanje kromosoma čovjeka

Eukariotski genom odvojen je od citoplazme jezgrinom membranom te čini jezgru, evolucijsku tvorevinu eukariota čija je svrha zaštita nasljednog materijala od negativnih utjecaja citoplazme. U jezgri eukariotskih organizama nalazimo više linearnih dugačkih molekula DNA koje se pakiraju uz pomoć histonskih i nehistonskih proteina u kompaktne strukture nasljednog materijala - kromosome. Kromosom izgrađuju dvije vrste kromatina: eukromatin i heterokromatin. Eukromatin se odnosi na jedinstvenu transkripcijski aktivnu DNA koja se replicira u ranoj S fazi staničnog ciklusa, dok se heterokromatin odnosi na visoko kondenziranu DNA koja se replicira u kasnoj S fazi staničnog ciklusa i zauzima karakterističan smještaj na kromosomima (centromerni, pericentromerni, interkalarni i telomerni smještaj).

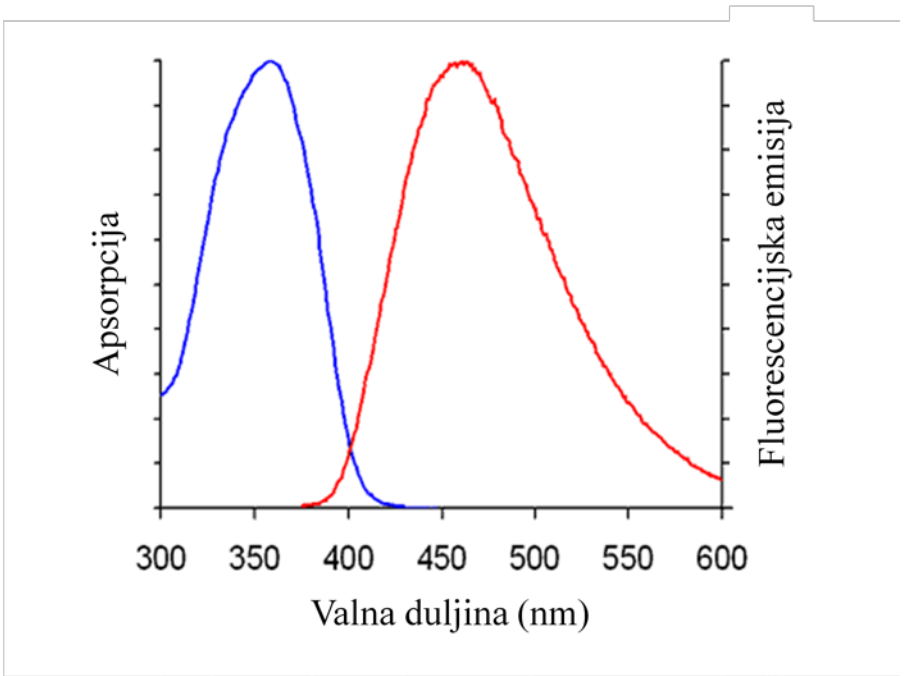
Funkcionalno postoje dvije vrste heterokromatina: konstitutivni (strukturni) i fakultativni heterokromatin. Fakultativni heterokromatin je kromatin koji je prešao u neaktivno stanje i karakterizira ga nejednoliki stupanj kondenziranosti homolognih kromosoma ili homolognih kromosomskih područja. Za razliku od fakultativnog, konstitutivni heterokromatin se pojavljuje na istim mjestima homolognih parova kromosoma. ***KONSTITUTIVNI HETEROKROMATIN*** vidljiv je u interfaznoj jezgri kao tamno obojena područja (kromocentri) nakon bojanja bojom Giemsa zahvaljujući trajnoj kondenzaciji kroz stanični ciklus. Međusobni odnos količine i rasporeda heterokromatina duž kromosoma karakterističan je za svaku vrstu i u pravilu se znatno razlikuje između srodnih vrsta. Na temelju položaja heterokromatina na kromosomima mogu se rekonstruirati događaji uključeni u evoluciju kariotipa.

Tehnike pruganja kromosoma upotrebljavaju se u svrhu identifikacije pojedinih kromosoma u kariotipu. Svaki kromosom ima određeni uzorak pruganja što omogućuje razlikovanje pojedinih kromosoma unutar kariotipa. Metode pruganja mogu se podijeliti na apsorpcijsko i fluorescencijsko bojanje. Za razliku od tehnika fluorescencijskog bojanja kod kojih se u većini slučajeva koristi jednostavno bojanje fluorescencijskim bojama (fluorokromima), ostale tehnike pruganja uključuju neku vrstu predtretmana prije bojanja.

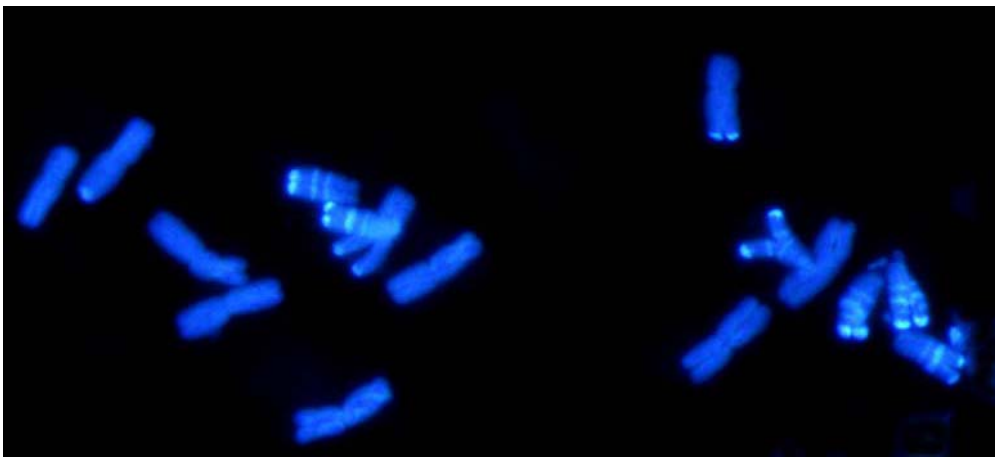
70-te godine prošlog stoljeća obilježene su naglim usponom u razvoju citogenetičkih tehnika. Nakon Giemsa C-pruganja uvedeno je pruganje kromosoma fluorescencijskim bojama kromomicinom A3 (CMA) i 4,6-diamino-2- fenilindolom (DAPI). **CMA** je antibiotik izoliran iz bakterije *Streptomyces griseus* koji specifično boji heterokromatin bogat parovima baza GC. Kromomicinski signali u većini slučajeva odgovaraju položaju 18S rDNA-lokusa zbog toga što je heterokromatin unutar ribosomskih gena bogat parovima baza GC. 4',6- diamidino-2-fenilindol (**DAPI**) je fluorescentna molekula koja se veže za heterokromatin koji je bogat parovima baza AT. Apsorpcijski maksimum za DAPI je na valnoj duljini od 358 nm (područje UV-svjetlosti), dok je emisijski maksimum na valnoj duljini od 461 nm (tablica 7.1., slika 7.3.). Kromosomi obojeni bojom DAPI fluoresciraju plavo, a svjetlo plave pruge na kromosomima odnose se na heterokromatin bogat parovima baza AT (Slika 7.4.). Heterokromatinska područja na kromosomu bogata parovima baza GC nakon bojanja kromomicinom fluoresciraju žuto upotrebom pobudne svjetlosti valne duljine između 430-450 nm (slika 7.5.). Princip bojanja zasniva se na ugradnji fluorokroma DAPI i CMA u manji utor DNA. Otkriveno je da fluorokromi pokazuju veći afinitet vezanja prema dvolančanoj DNA. Fluorescentni signali na kromosomima dobiveni nakon bojanja fluorokromoma vizualiziraju se upotrebom fluorescencijskog mikroskopa. Fluorescencijski mikroskop razlikuje se od svjetlosnog po tome što koristi živinu lampu kao izvor pobudne svjetlosti te po kompletu filtera koji propuštaju odabrane valne duljine svjetlosti.

**Tablica 7.1.** Valne duljine pobudnog i ekscitacijskog dijela spektra za fluorescentne molekule korištene u citogenetičkim istraživanja.

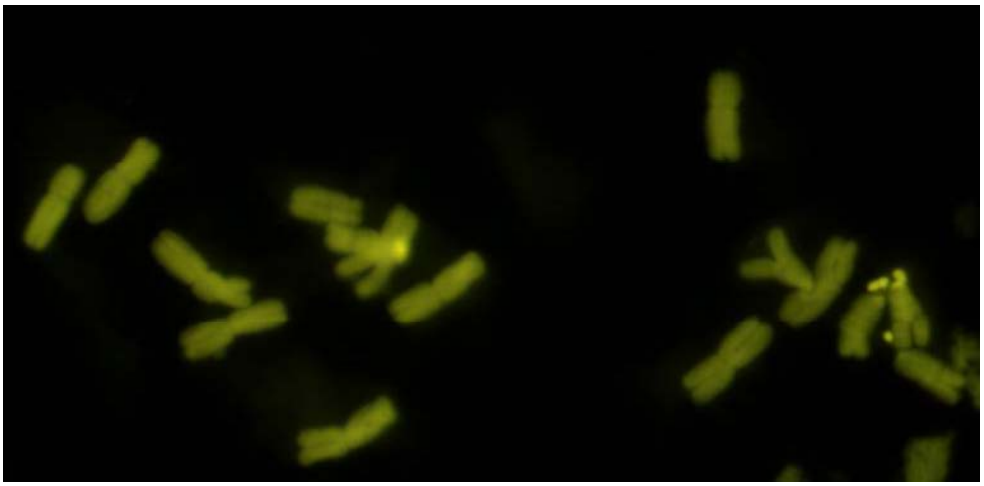
| *Fluorokrom* | *Valna duljina pobudnog maksimuma (nm)* | *Valna duljina emisijskog maksimuma (nm)* |
|---|---|---|
| Kromomicin A3 | 436-460 | 470 |
| DAPI | 345 | 425 |




**Slika 7.3.** Apsorpcijski i fluorescencijski spektar boje DAPI vezane za DNA



**Slika 7.4.** Kromosomi vrste *Anemone hortensis* (2n=2x=16) nakon bojanja fluorokromom DAPI. Svjetlo plave pruge predstavljaju heterokromatinska područja na kromosomu bogata parovima baza AT. Karakteristične interkalarne DAPI-pruge nalaze se na svim akrocentričnim kromosomima, dok se telomerne-DAPI pruge nalaze na dužim krakovima svih akrocentričnih, jednog meta-submetacentričnog kromosoma i jednog metacentričnog kromosoma.



**Slika 7.5.** Kromosomi vrste *Anemone hortensis* (2n=2x=16) nakon bojanja kromomicinom. Četiri signala na kraju kraćeg kraka dva para akrocentričnih kromosoma predstavljaju heterokromatin bogat parovima baza GC.

? U vrsti *Anemone hortensis*, heterokromatin bogat parovima baza GC nalazi se samo u području 18S rDNA-lokusa. Ako su nakon bojanja kromomicinom uočena četiri signala na kromosomima (slika 6.5.), koliko onda navedena vrsta ima 18S rDNA-lokusa? Zaokruži točan odgovor:

1 2 3 4 6 8

## Praktičan rad

**Bojanje kromosoma čovjeka bojom DAPI i kromomicinom $A_3$ (CMA)**

- Svaka grupa (tri ili četiri studenta) ima jedan preparat na raspolaganju.
- Kromomicin i DAPI su mutageni i kancerogeni – stoga OPREZ PRI UPOTREBI! Treba koristiti zaštitne rukavice i kute!
- Za vrijeme bojanja držati preparate u mraku.
- Preparati se boje kromomicinom u trajanju od 1 h

## Praktičan rad

**Izrada kariotipa čovjeka**

### Materijal

**CMA**: radna koncentracija 0,1 mg/ml (u McIvaine puferu s 2,5 mM $MgCl_2$, pH=7)
**DAPI**: radna koncenracija 0,1 µg/ml (u 2xSSC puferu)
**Distamicin**: radna koncentracija 0,2 mg/mL (u McIlvaine puferu s 2,5 mM $MgCl_2$, pH=7)
Destilirana voda

Otopina za uklapanje: McIlvaine pufer s $MgCl_2$ i glicerolom u omjeru 1:1
Pufer McIlvaine bez $Mg^{2+}$, pH=7
Pufer McIlvaine sa 2,5 mM $MgCl_2$, pH=7
Plastična pokrovnica
Pinceta
Iglica za preparaciju
Pokrovno stakalce
Kadica za bojanje preparata
Poklopac od kutije

**PROTOKOL:**

1) Položiti preparat na kadicu (stanice prema gore).

2) Nakapati 100 µl otopine CMA po preparatu. Pokriti preparat plastičnom pokrovnicom te poklopcem od kutije. Inkubirati 60 min na sobnoj temperaturi u mraku.

3) Maknuti pokrovnicu. Isprati CMA destiliranom vodom (preko preparata preliti destiliranu vodu, oprezno), otresti kapi vode i kratko osušiti preparate na zraku.

4) Nakapati na preparat 100 µl otopine distamicina, pokriti narančastom pokrovnicom te poklopcem od kutije. Inkubirati 10-15 min na sobnoj temperaturi u mraku.

5) Maknuti pokrovnicu. Isprati distamicin destiliranom vodom (preko preparata preliti destiliranu vodu, oprezno), otresti kapi vode i kratko osušiti preparate na zraku.

6) Nakapati 100 µl otopine DAPI po preparatu. Pokriti preparat plastičnom pokrovnicom te poklopcem od kutije. Inkubirati 30 min na sobnoj temperaturi u marku.

7) Maknuti pokrovnicu. Kratko isprati DAPI:

   Preliti preko preparata pufer McIvaine (pH=7, bez $Mg^{2+}$) prethodno razrijeđen u destiliranoj vodi u omjeru 1:1
   Preliti preko preparata destiliranu vodu

8) Kratko osušiti preparate. Uklopiti preparate u otopinu za uklapanje: na osušeni preparat kapnuti jednu kap smjese glicerol/pufer McIlvaine s $MgCl_2$ (pH=7) u omjeru 1:1, staviti pokrovnicu na kap, višak upiti sa filter papirom tako da se filter papir stavi na pokrovnicu i blago pritisne.

9) Mikroskopirati preparate uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa upotrebom ekscitacijskog i emisijskog filtera 2 (za DAPI) i 5 (za CMA).

1) Pri kojem ste povećanju gledali kromosome čovjeka?

2) Koliko kromosoma ima čovjek u tjelesnim stanicama?

3) Koje su boje kromosomi nakon bojanja bojom DAPI?

4) Da li ste vidjeli ispruganost kromosoma nakon bojanja bojom DAPI?

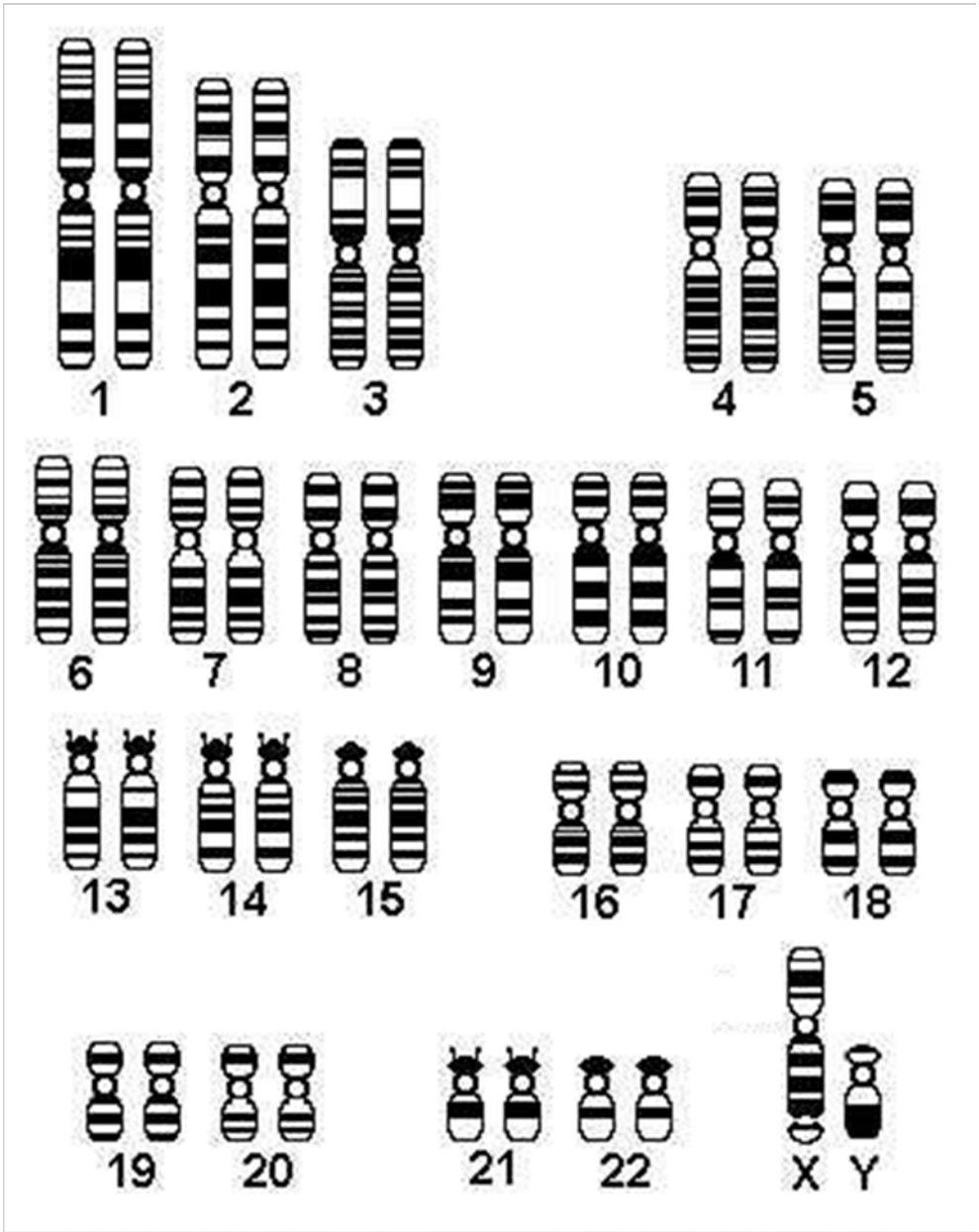
5) Koje su boje kromosomi nakon bojanja kromomicinom?

6) Koliko ste vidjeli kromomicinskih signala?

7) Koja područja na kromosomu boji CMA, a koja DAPI?

8) Nacrtaj DAPI-pruge i CMA-signale na kromosomima na slici 6.6.

**Slika 7.6.** Kariotip čovjeka.




**Slika 7.7.** Idiogram čovjeka.

# 8. KROMOSOMSKE ANOMALIJE

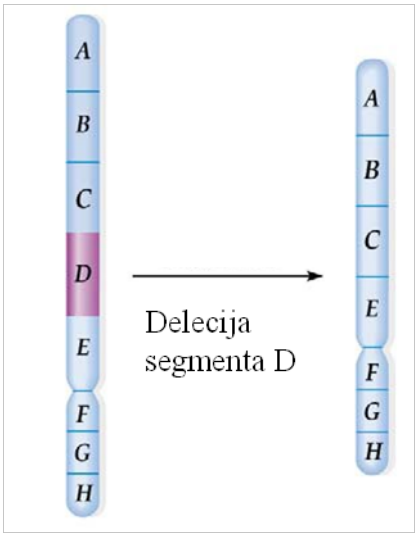
Kromosomske anomalije predstavljaju veliku promjenu u genomu. Mogu nastati spontano ili mogu biti inducirane kemikalijama ili zračenjem. Dijelimo ih na promjene strukture ili broja kromosoma. Strukturne promjene kromosoma nazivamo još i kromosomskim aberacijama. Kromosomske aberacije dijelimo na kvalitativne i kvantitativne promjene s obzirom na to da li je došlo do promjene u veličini genoma (kvantitativne promjene) ili je veličina genoma ostala ista (kvalitativne promjene). Kvantitativne promjene su delecije i duplikacije, dok su translokacije i inverzije kvalitativne kromosomske aberacije. Važno je naglasiti da kromosomske mutacije uglavnom nastaju u gametogenezi, ali mogu nastati i postzigotno, tijekom embriogeneze. Otprilike polovica spontanih pobačaja u ljudi rezultat je kromosomskih mutacija. Oko 11% muškaraca koji imaju problema s fertilnosti i oko 6% muškaraca s mentalnom retardacijom nosi neku kromosomsku anomaliju. Bez obzirom na to gdje su nastale te kromosomske anomalije prethodi im uglavnom dvostruki lom u molekuli DNA.

## PROMJENE U STRUKTURI KROMOSOMA

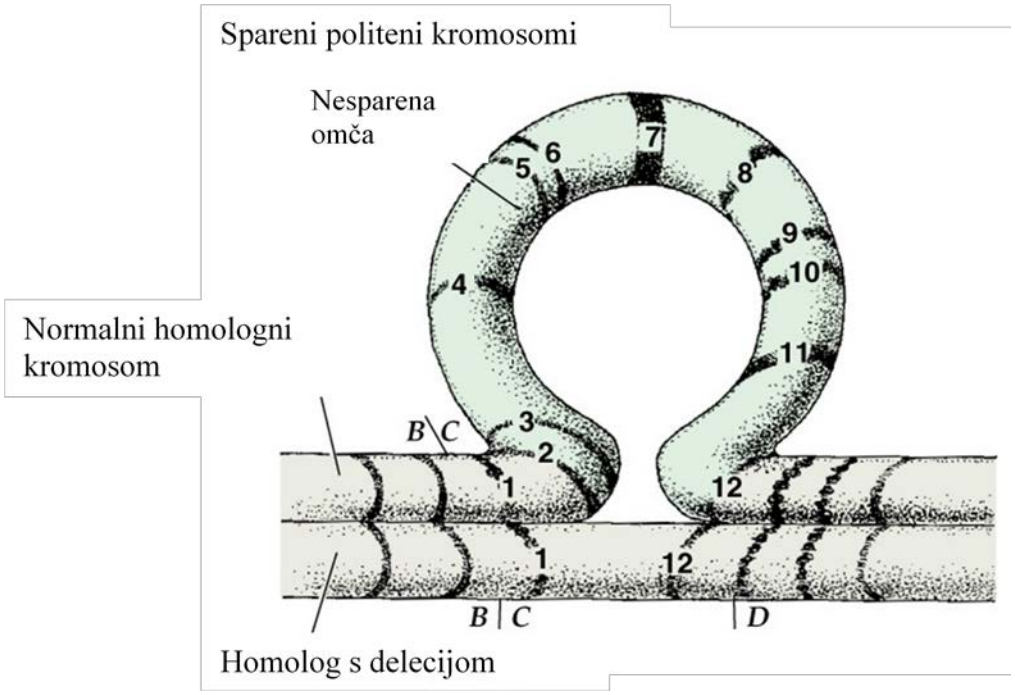
## KVANTITATIVNE PROMJENE

### DELECIJE

- Počinju s dvolančanim lomom u molekuli DNA
- Gubitak DNA s kromosoma (slika 8.1.)
- Krajevi na mjestima loma su ljepljivi i nisu zaštićeni telomernom sekvencom
- Inducirane toplinom, zračenjem, virusima, kemikalijama, transpozonima i greškama u rekombinaciji
- Mogu se vidjeti citološki na politenim kromosomima (stvaranje omče u profazi I) (slika 8.2.)




**Slika 8.1.** Delecija dijela kromosoma



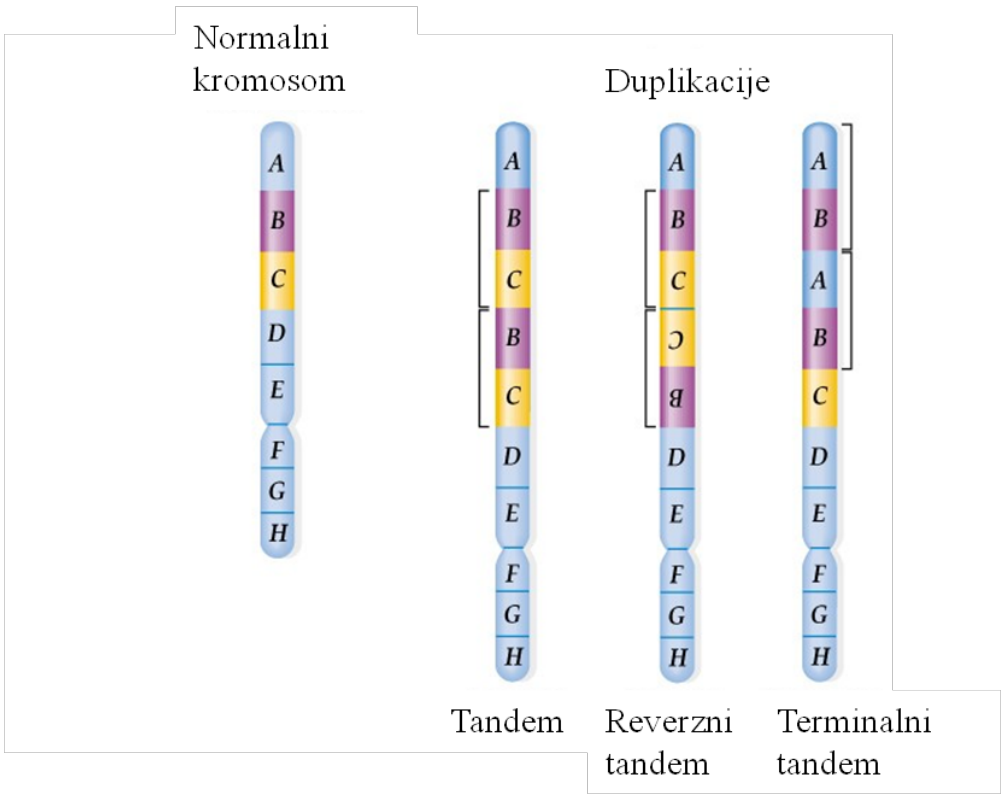

**Slika 8.2.** Delecija u politenim kromosomima vinske mušice.

Učinak delecija:

- Posljedice delecija su teške budući da se radi o gubitku genetičkog materijala.
- Delecija jednog alela homozigotnog divljeg tipa ⇒ normalan fenotip.
- Delecija heterozigota ⇒ normalan ili mutirani fenotip (vjerojatno letalan).
- Pseudodominacija ⇒ delecija dominantnog alela heterozigota rezultira u recesivnom fenotipu.
- Delecija centromera ⇒ gubitak kromosoma (uglavnom letalna).
- Bolesti u čovjeka:
    - "Cri-du-chat" sindrom
        - Delecija dijela kromosoma 5 (1/50.000 novorođenčadi)
        - Mačji plač novorođenčadi; mentalna retardacija
    - "Prader-Willi" sindrom
        - Delecija dijela kromosoma 15 (očinskog); 1/10.000-25.000
        - Slabo razvijena djeca, problemi s prehranom (pretilost), mentalna retardacija
    - "Angelman" sindrom
        - Delecija dijela kromosoma 15 (majčinskog); 1/20.000
        - Razvojni problemi, poremećaji spavanja, nekontrolirani pokreti ("Happy puppet syndrome")

## DUPLIKACIJE

- Udvostručenje dijela kromosoma (slika 8.3.).
- Citološki vidljiva kao omča (petlja) u profazi I.

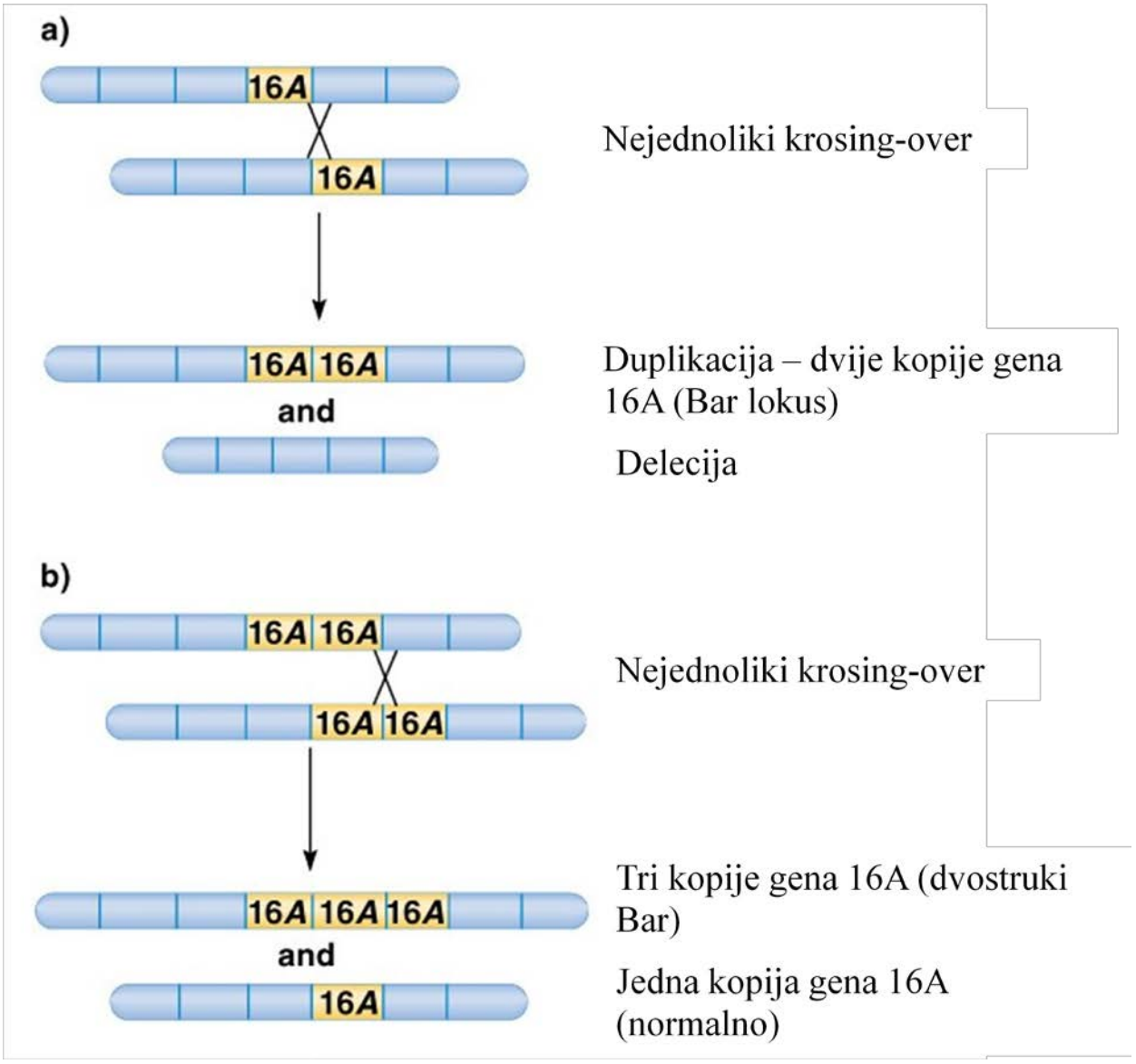



**Slika 8.3.** Udvostručenje dijela kromosoma.

?

Jedan kromosom unutar homolognog para ima deleciju (ABFGHIJ), dok je drugi normalan (ABCDEFGHIJ). Centromer se nalazi između gena G i H. Nacrtaj bivalent koji se formira u profazi I mejoze.

Duplikacija može nastati kao rezultat nejednolikog krosing-overa (slika 8.4.). Rezultat nejednolikog krosing-overa je povećanje i gubitak broja kopija uzastopnih ponavljanja. Satelitske DNA koje se sastoje od odsječaka DNA koji se uzastopno ponavljaju mogu se putem nejednolikog krosing-overa proširiti po genomu u relativno kratkom periodu. Duplikacijama su nastale mutante Bar vinske mušice (slika 8.4.). Multigenske porodice, kao na primjer hemoglobinski geni, nastale su kao rezultat duplikacija.




**Slika 8.4.** Povećanje ili gubitak kopija gena uzrokovano nejednolikom krosing-overom.

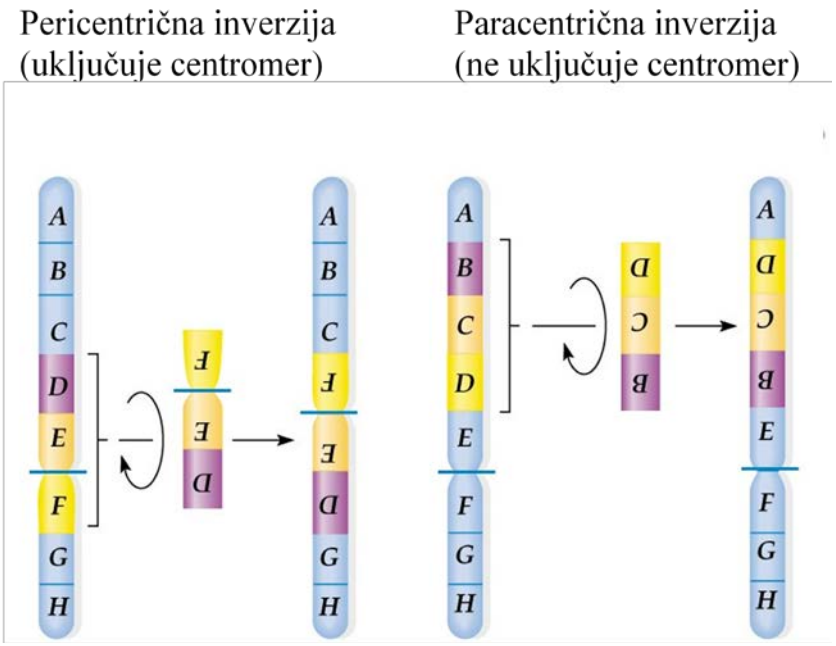
## KVALITATIVNE PROMJENE

## INVERZIJE

Inverzije se događaju kada se unutar pojedinog kromosoma dogodio lom na dva mjesta, nakon čega se odlomljeni dio kromosoma zarotira za 180° (inverzija) i ponovno intergrira u kromosom ali u obrnutoj orijentaciji. Kod inverzija nema gubitka DNA.
Inverzija ne predstavlja problem za osobu koja je tu aberaciju naslijedila od roditelja. Postoji slabo povećani rizik za fenotipske abnormalnosti ako se inverzija dogodila *de novo* (u mejozi ili postzigotno) zbog mogućeg prekida u nekom esencijalnom genu. Iako je osoba, nositelj inverzije, potpuno zdrava i normalna, ima problema sa gametogenezom. Naime, kod takvih osoba postoji povećani rizik od stvaranja kromosomski ***nebalansiranih gameta***. Nebalansirane gamete nastaju zbog toga što kromosom s inverzijom ima problema u sparivanju sa svojim homologom za vrijeme profaze I mejoze. Da bi se kromosomi mogli spariti u profazi I formira se inverzna omča (slike 8.6. i 8.7.). Problem nastaje ako se unutar inverzne omče dogodi krosing-over čiji je rezultat nastanak genetički nebalansiranih gameta koje sadrže kromosom koji je pretrpio višestruke strukturne promjene. Takve gamete ne preživljavaju (nisu vijabilne) pa je osoba s inverzijom smanjeno fertilna.

Postoje dva tipa inverzija s obzirom na to da li inverzna omča obuhvaća centromer:

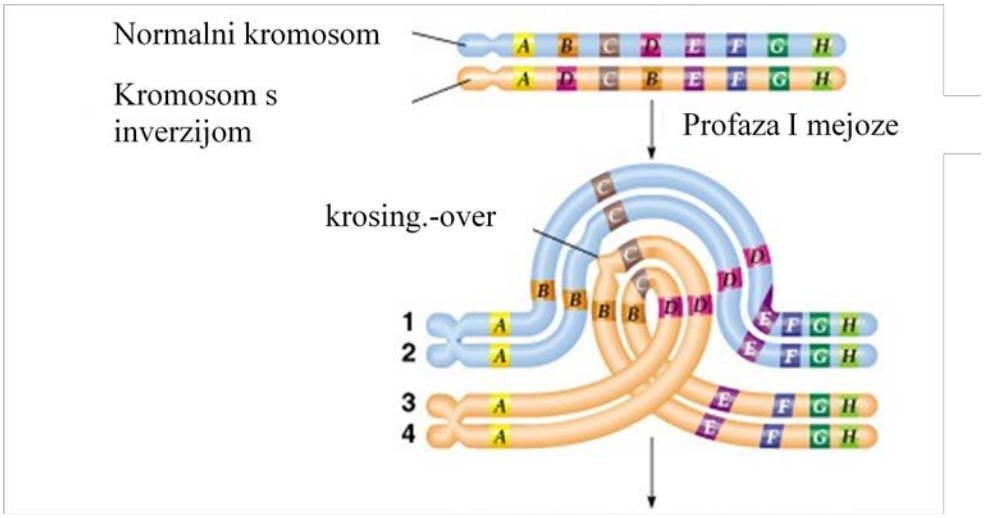
**a) PERICENTRIČNA** INVERZIJA = uključuju centromer (slika 8.5.a)
**b) PARACENTRIČNA** INVERZIJA = ne uključuju centromer (slika 8.5.b)




**Slika 8.5.** Pericentrična (a) i paracentrična (b) inverzija.

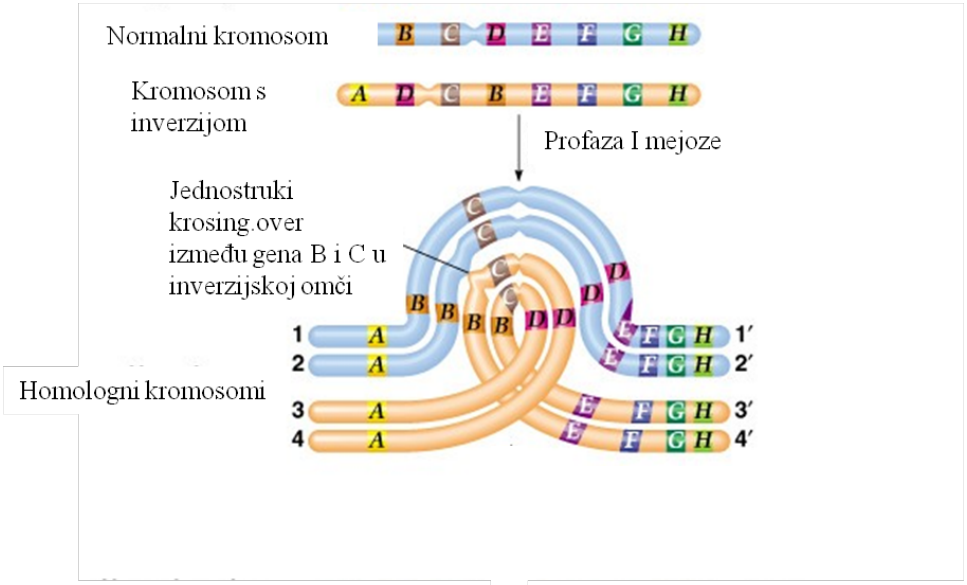
- Vezani geni obično zajedno prežive inverziju, tako da redoslijed gena obično ostane isti.
- Homozigoti: ADCBEFGH ⇒ nemaju problema u razvoju
- Heterozigoti: ADCBEFGH / ABCDEFGH ⇒ moguć je problem u gametogenezi - smanjena fertilnost
- Gamete su različite, ovisno o tome da li se radi o paracetričnoj ili o pericentričnoj inverziji.

PARACENTRIČNA INVERZIJA




**Slika 8.6.** Paracentrična inverzija – krosing-over unutar omče.

PERICENTRIČNA INVERZIJA




**Slika 8.7.** Pericentrična inverzija – krosing-over unutar omče.

**Zaključak:**

1) Za većinu tipova kromosomskih rearanžmana:

- heterozigoti imaju smanjenu fertilnost
- homozigoti su normalni

2) Inverzije mogu igrati ulogu mehanizma reproduktivne izolacije između dvije populacije, vodeći ka specijaciji.

Primjer:
IN = divlji tip; in = inverzija

gameta IN + gameta IN --> zigota: 100% vijabilno
gameta IN + gameta in --> zigota: 50% ili manje vijabilno (=smanjena fertilnost)
gameta in + gameta in --> zigota: 100% vijabilno

Dakle, inverzni heterozigoti su selekcijski nedostatak. **Objasnite zašto?**

## TRANSLOKACIJE

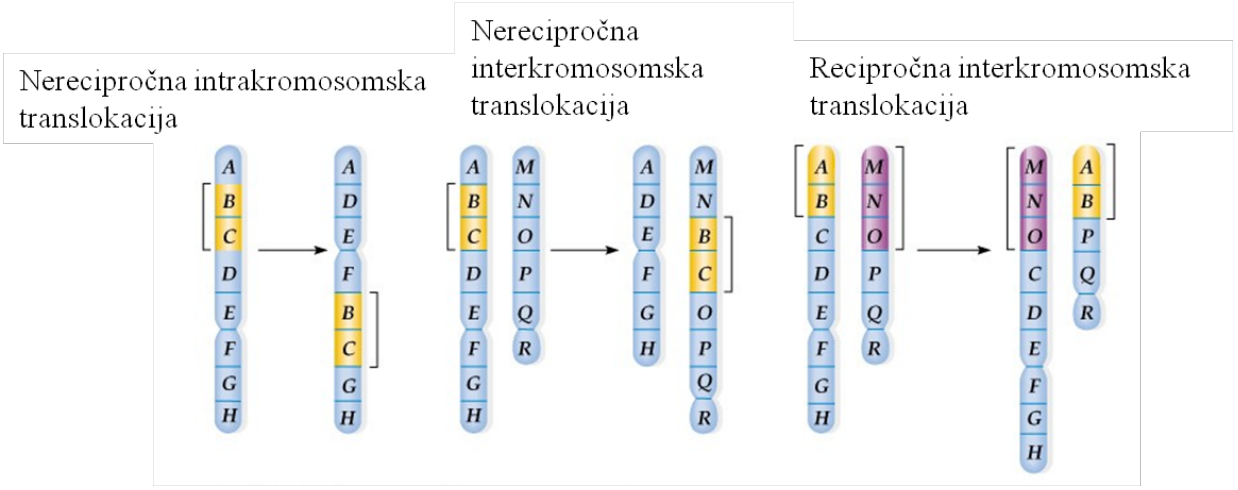
Translokacija predstavlja promjenu položaja kromosomskog segmenta, a najčešće uključuje izmjenu materijala između dva ili više kromosoma.

Pri translokaciji nema gubitka DNA. Može doći do promjene u ekspresiji ako se promijeni položaj gena = pozicijski učinak.

Ako je translokacija recipročna (balansirana) vjerojatnost nastanka problema za jedinku je ista kao i kod inverzija. Translokacija ne predstavlja problem za osobu koja ju je naslijedila od roditelja. Vjerojatnost da će osoba imati problema slabo je povećana ako je translokacija nastala *de novo*. Osoba s translokacijom ima problema u gametogenezi. Problem nastane kad osoba s translokacijom stvara gamete koje ne sadrže oba translokacijska produkta. Kad se takva gameta spoji s gametom drugog roditelja rezultat je nebalansirani embrij koji je parcijalni monosomik za jedan kromosom te parcijalni trisomik za drugi kromosom.

Translokacija može biti (slika 8.8.):

a. Intrakromosomska
b. Interkromosomska
c. Recipročna
d. Nerecipročna (=jednosmjerna translokacija) – jedan kromosom pretrpi deleciju (DONOR fragmenta), a drugi kromosom pretrpi adiciju fragmenta (RECIPIJENT fragmenta)




**Slika 8.8.** Translokacije kromosoma.

Neki tumori u čovjeka povezani su s translokacijama: kronična mijeloična leukemija, CML (engl. **"**Chronic Myelogenous Leukemia") nastaje zbog recipročne translokacije između kromosoma 22 i 9) i Burkittov limfom – nastaje recipročnom translokacijom između kromosoma 8 i 14.

**Učinak translokacije na produkte segregacije u anafazi I** (slika 8.9.):

Gamete koje stvaraju homozigoti i heterozigoti međusobno se razlikuju.

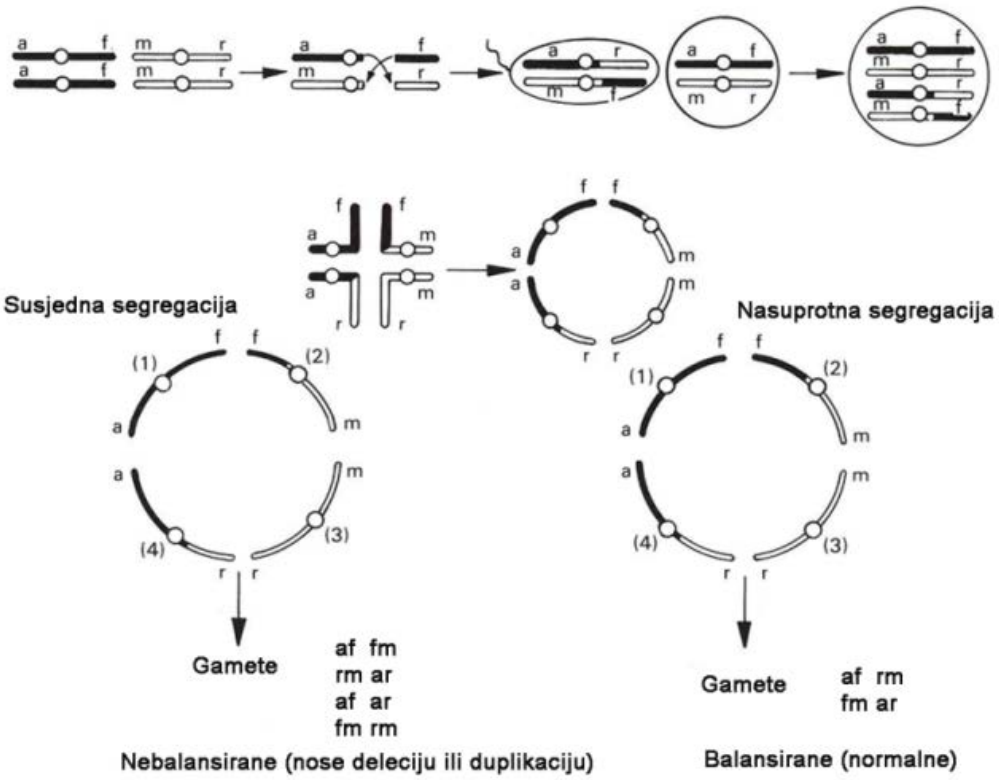
**I. Homozigoti:** translokacija vodi k promjeni vezanosti gena.

- Ako su duplikacije/delecije nebalansirane, potomstvo ne preživljava.
- Homozigotne recipročne translokacije ⇒ "normalne" gamete.

**II. Heterozigoti**: Nastaju ako se spare gameta s normalanim kromosomom (N) i gameta s translociranim kromosomom (T). **Recipročni translokacijski heterozigot** nastane ako se spoji gameta s normalnim kromosomima (N1 i N2) s gametom s recipročno translociranim kromosomima (T1 i T2). Heterozigoti su polusterilni.

- Kod jedinke s recipročnom interkromosomskom translokacijom (N1T1N2T2) u profazi I dva normalna (N1 i N1) i dva kromosoma s translokacijom (T1 I T2) formiraju jedan kvadrivalent (slika 8.9.).
- **Segregacija** kromosoma u kvadrivalentu u anafazi I ima glavni učinak na preživljavanje gameta.
- Segregacija se događa na jedan od tri moguća načina (ako se zanemari učinak krosing-overa) (slika 8.9.):

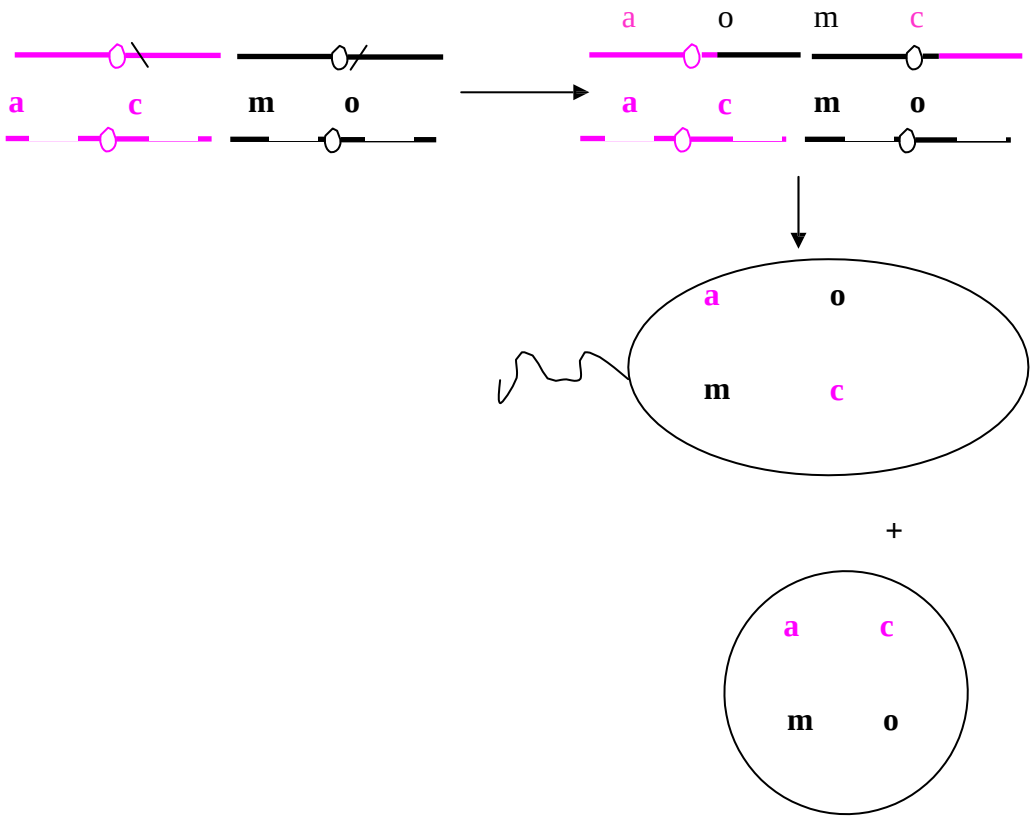
1. **<u>Nasuprotna segregacija</u>,** ~50% normalnih gameta: 4 potpuna kromosoma, svaka stanica posjeduje kromosom sa svim genima (zigota preživljava).
2. **<u>Susjedna segregacija 1 („Adjacent 1 segregation“)</u>,** ~50% gameta: svaka stanica posjeduje jedan kromosom s duplikacijom i delecijom (zigota uglavnom ne preživljava).
3. **<u>Susjedna segregacija 2 („Adjacent 2 segregation“)</u>,** rijetka: svaka stanica posjeduje jedan kromosom s duplikacijom i delecijom (zigota uglavnom ne preživljava).




**Slika 8.9.** Gametogeneza recipročnog translokacijskog heterozigota.

Segregacija kromosoma u anafazi I.

Mužjak vinske mušice posjeduje recipročnu translokaciju u somatskim stanicama. Krak c kromosoma 2 i krak o kromosoma 6 međusobno su zamijenili mjesta. Muška gameta koja sadrži oba kromosoma s translokacijom oplodila je jajnu stanicu koja ima oba normalna kromosoma te je na taj način nastala heterozigotna vinska mušica (slika 8.10.).




**Slika 8.10.** Recipročna translokacija.

Nacrtajte kvadrivalent u profazi I:

Nacrtajte kvadrivalent u anafazi I:

Nacrtajte gamete nakon susjedne segregacije:

1:

2:

3:

4:

Nacrtajte gamete nakon nasuprotne segregacije:

1:

2:

3:

4:

Da li gamete preživljavaju? Objasnite zašto?

Koja vrsta segregacije uzrokuje nastanak balansiranih gameta?

## TRANSLOKACIJE U BILJAKA I ŽVOTINJA:

Translokacije mogu biti jednostavne i složene. Složene translokacije predstavljaju seriju recipročnih translokacija koje zahvaćaju sve kromosomske parove. Česte su u škorpiona, te biljnih rodova *Rhoeo*, *Oenothera* i *Tradescantia*. U svih rodova škorpiona translokacije se održavaju u prirodi zbog toga što one imaju selektivnu prednost nad normalnim kromosomima. U biljnoj vrsti *Oenothera lamarckiana* (2n = 14) translokacijom je zahvaćeno 12 kromosoma, a preostala dva čine bivalent. Biljni rod *Tradescantia sp.* (2n = 20; 2n = 10) u mejozi stvara univalente, bivalente, trivalente i kvadrivalente.

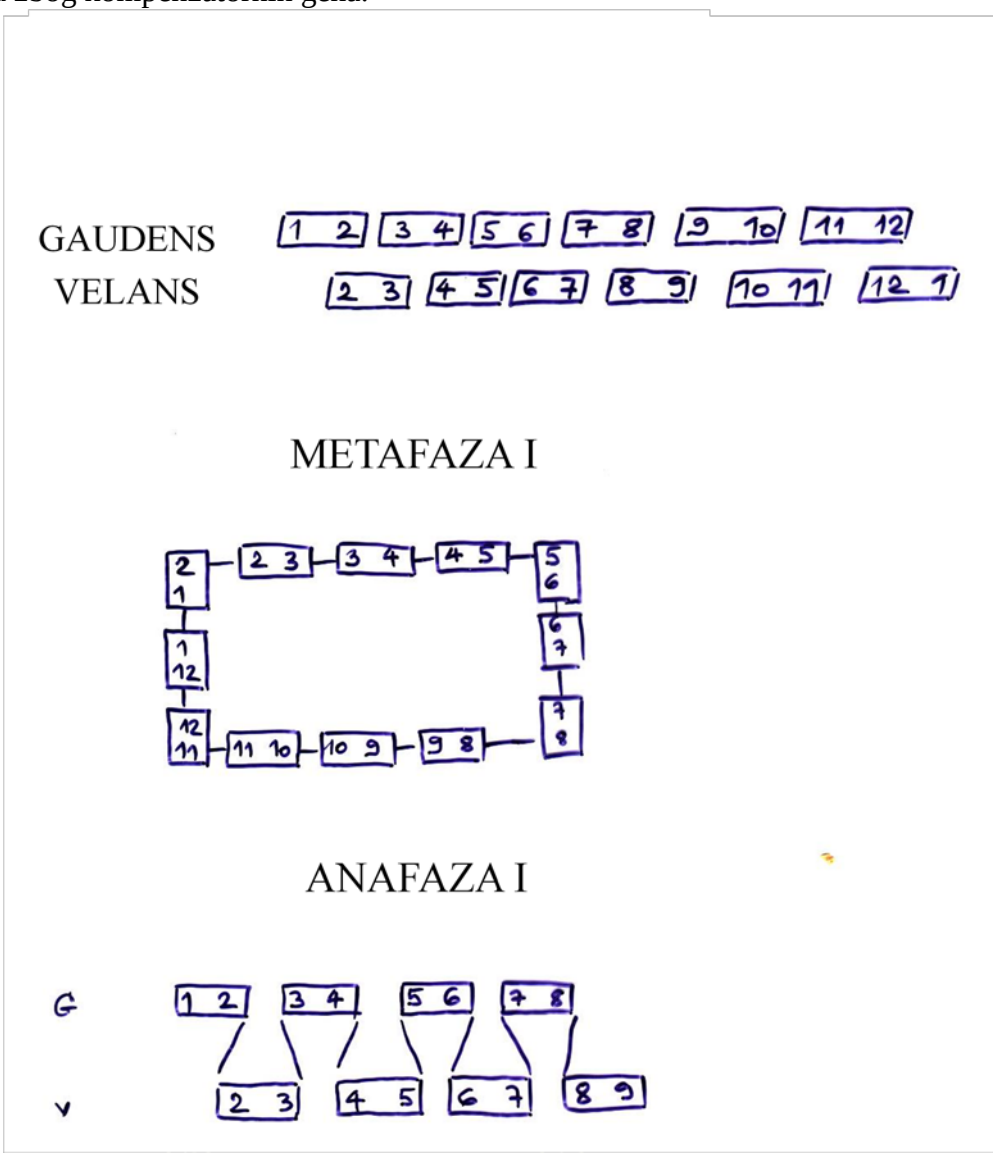
U vrsti ***Rhoeo discolor***, jedan set kromosoma zahvaćen je translokacijama, a drugi nije (slika 8.11.).

Normalan set (krakovi kromosoma označeni su brojevima):
1-2 3-4 5-6 7-8 9-10 11-12

Translokacijski set: 2-3 4-5 6-7 8-9 10-11 12-1

U profazi I svi kromosomi formiraju jedan multivalent. Multivalent se još naziva i Rennerov kompleks po autoru koji ga je otkrio. U anafazi I razdvajanje kromosoma je pravilno: svi kromosomi s translokacijama odlaze na jedan pol, dok svi normalni kromosomi putuju na suprotan pol. Gameta s translociranim kromosomima naziva se VELANS (V), a gameta s normalnim kromosomima naziva se GAUDENS (G). U prirodi preživljava samo heterozigot koji je nastao spajanjem različitih gameta (G i V). Homozigoti ne preživljavaju. Dakle, potomstvo je reducirano za 50%. Za održavanje kompleksnih translokacija u heterozigotnom stanju evoluirali su posebni mehanizmi, tj. SPECIFIČNI KARIOLOŠKI KOMPLEKSI i GENETIČKI UVJETOVANA LETALNOST. Svaka grupa od 6 kromosoma ponaša se kao jedinstvena vezna grupa gena s rekombinacijom koja je ograničena na sparene krajeve kromosoma.

Svaka grupa posjeduje određenu skupinu letalnih gena koji se nalaze u području kromosoma koje se ne sparuju. Letalni geni postaju aktivni u zigoti. Samo kombinacija GV preživljava zbog kompenzatornih gena.




**Slika 8.11. Složene translokacije i mejoza u vrste *Rhoeo discolor***

## PROMJENE BROJA KROMOSOMA

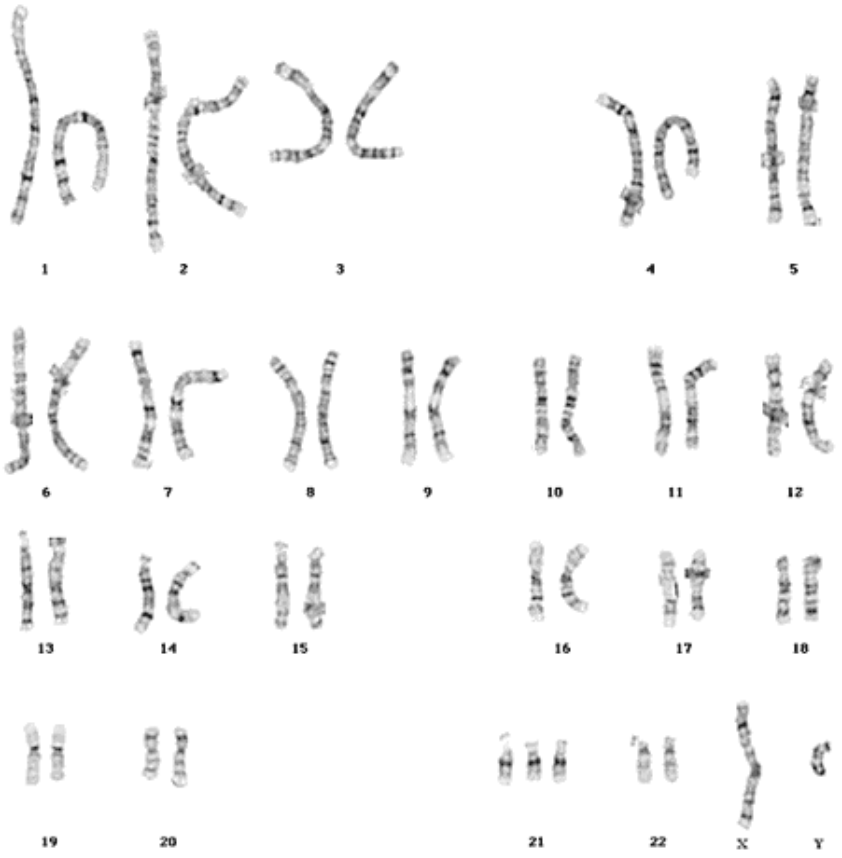
**ANEUPLOIDIJA** - promjena broja kromosoma koja zahvaća pojedine kromosome u setu. Stanici može nedostajati jedan ili više kromosoma, dok druga stanica ima višak kromosoma.

| | |
|---|---|
| 2n -2 | nulisomik |
| 2n -1 | monosomik |
| 2n -1-1 | dvostruki monosomik |
| 2n +1 | trisomik |
| 2n +1+1 | dvostruki trisomik |
| 2n +2 | tetrasomik |

Aneuploidija može nastati zbog nepravilne raspodjele kromosoma u mejozi, točnije zbog nerazdvajanja kromosoma u anafazi I ili u anafazi II. Par kromosoma odlazi na isti pol nakon čega nastaje gameta s viškom kromosoma i gameta bez jednog kromosoma. Aneuploidija uzrokuje neravnotežu u kromosomskom komplementu što rezultira abnormalnim fenotipom.

Gotovo svi monosomici za autosome u čovjeka umiru odmah nakon začeća, a samo nekoliko trisomika za autosome preživljava. Najpoznatija trisomija je Downov sindrom (slika 8.12.) ili trisomija kromosoma 21. Trisomici za kromosome 13 i 18 također preživljavaju porod ali su oštećenja veća nego u osobe s Downovim sindromom.

Opće pravilo je da gubitak ili višak spolnih kromosoma ima manje teške posljedice nego gubitak ili višak autosoma. Najpoznatije aneuplodije spolnih kromosoma su Turnerov sindrom (45, X) i Klinefelterov sindrom (47, XXY).




**Slika 8.12.** Kariotip osobe koja s Down-ovim sindromom (**47, XY, +21).**

**EUPLOIDIJA**

Euploidija je promjena broja kromosoma koja zahvaća cijeli kromosomski set.

**MONOPLOIDIJA**

Monoploidi imaju samo jedan kromosomski set, a takve su i gamete diploidnih organizama (n).

**POLIPLOIDIJA**

Poliploidi su organizmi s tri ili više kromosomskih setova (3n, 4n, 5n, 6n…)

Primjer:

n = 7
2n = 14 diploid
3n = 21 triploid
4n = 28 tetraploid
5n = 35 pentaploid
6n = 42 heksaploid

Poliplodija je uglavnom ograničena na biljno carstvo. U kritosjemenjača to je česta pojava. Najpoznatiji primjer je kultivirani krumpir *Solanum tuberosum* (4n =48), dok je divlja vrsta *S. brevidens* diploid, 2n =24.

***Autopoliploidi*** su poliploidi unutar iste vrste. Nastaju udvostručenjem čitavog kromosomskog seta u mitozi (ENDOMITOZA ZIGOTE) ili u mejozi (greška u anafazi I ili u anafazi II). Endomitoza je udvostručenje kromosoma unutar nedirnute jezgrine membrane. Uzrok nastanka autopoliploda je potpuna nefunkcionalnost diobenog vretena zbog čega udvostručeni kromosomi ne mogu biti povučeni na suprotne polove već ostaju u istoj stanici.

***Alopoliploidi*** su poliploidi porijeklom od više vrsta, koji imaju tri ili više nehomologna genoma. Spajanjem nereduciranih gameta (2n x 2n) dviju različitih vrsta nastaje ALOTETRAPLOID koji se ponaša kao nova vrsta i čiji se kromosomi mogu pariti u mejozi.

**ZADACI:**

1. *Acer platanoides* (mliječ) i *A. campastre* (klen), oba imaju diploidan broj kromosoma 2n = 26. Iako su to dvije vrste istog roda, njihovi hibridi su sterilni. Objasnite zašto? Da li je moguće dobiti fertilan hibrid i kako? Prisjetite se Karpečenkovog pokusa.

2. Diploidan broj kromosoma nekog organizma je 12. Koliko kromosoma ima:

Monosomik
Trisomik
Tetrasomik
Dvostruki trisomik
Nulisomik

Monoploid
Triploid

Alotetraploid

3. Suprug i supruga normalnog vida imaju djevojčicu daltonisticu s Turnerovim sindromom. Prikažite križanje, specijalno gamete koje daju ovu kombinaciju.

4. Majka daltonostica i otac normalnog vida imaju dijete normalnog vida s Klinefelterovim sindromom. Prikažite križanje, specijalno gamete koje daju ovu kombinaciju.

5. Diploidan broj kromosoma vrtnog graška je 2n = 14. Koliko može nastati različitih trisomika ? Koliko različitih dvostrukih trisomika može nastati?

6. Do kakve promjene obzirom na broj kromosoma može doći nakon djelovanja mutagena koji je potpuno uništio diobeno vreteno u somatskim stanicama luka *Allium cepa* (2n = 16)?

# 9. GENETIKA MIKROORGANIZAMA

**Prednosti mikroorganizama u genetičkim istraživanja:**

1. Bakterije i virusi imaju jedan set genetičke informacije (kao i gamete diploidnih organizama).
2. Geni haploidnih organizama nisu niti dominantni niti recesivni, zbog prisutnosti samo jednog alela. Svaki gen kojeg posjeduje organizam može doći do izražaja u fenotipu.
3. Relativna jednostavnost mikroorganizama (npr. virusa) pruža mogućnosti za proučavanjem strukture gena na molekularnoj razini.
4. Moguće je proučavanje mutacija, jer s lakoćom možemo dobiti velik broj stanica (jedinki) u populaciji ($10^6$-$10^9$ stanica po epruveti ili petrijevoj posudi).
5. Upotreba selektivnih podloga omogućuje izolaciju jedne mutante iz populacije od $10^6$ stanica.
6. Kratko generacijsko vrijeme (većina mikroorganizama se dijeli svakih 30 min, pa tako iz jedne stanice kroz 15 sati može nastati 30 generacija).
7. Svi potomci nespolnog razmnožavanja (binarna dioba) su genetički identični i predstavljaju klon.

**Nedostaci mikroorganizama:**

1. Dijele se amitotski
2. Nema pravilnih rekombinacijskih pojava
3. Nema morfoloških varijacija

**Nespolno razmnožavanje bakterija**

Nespolno razmnožavanje bakterija je binarno cijepanje (binarna dioba). Veliku populaciju bakterija ($10^8$-$10^9$ stanica) možemo uzgojiti u tekućoj hranjivoj podlozi, i onda nacijepiti na krutu hranjivu podlogu tako da se razvije masa stanica koja se zove livada (engl. lawn).

**Određivanje genotipa mutanti primjenom različitih hranjivih podloga**

Bakterije se uzgajaju na hranjivim podlogama koje sadrže hranjive tvari potrebne za rast i razvoj bakterija. Hranjive podloge dijelimo na:

1. **Univerzalne (standardne) podloge** koje služe za uzgoj većine bakterija
2. **Selektivne (specijalne) podloge** koje omogućuju rast samo određenih vrsta ili sojeva bakterija
3. **Diferencijalno-dijagnostičke podloge** koje služe za istraživanje biokemijskih svojstava bakterija

<u>Sastav hranjivih podloga:</u>

KOMPLETNA PODLOGA (pH = 7,5)

| | |
|---|---|
| Baktotripton | 10 g/L |
| Ekstrakt kvasca | 5 g/L |
| NaCl | 10 g/L |
| Agar | 15 g/L |

MINIMALNA PODLOGA (za izolaciju prototrofa)

| | |
|---|---|
| $NH_4Cl$ | 2,5 g/L |
| $NH_4NO3$ | 0,5 g/L |
| $Na_2SO4$ | 1,5 g/L |
| $K_2HPO4$ | 1,5 g/L |
| $KH_2PO_4$ | 0,5 g/L |
| $MgSO_4$ | 0,05 g/L |
| Glukoza | 10 g/L |
| Agar | 20 g/L |

SELEKTIVNA PODLOGA

Minimalna podloga + određena aminokiselina

KOMPLENTNA PODLOGA SA STREPTOMICINOM (za izolaciju mutanti koje su rezistentne na antibiotik streptomicin - $Str^R$)

Streptomicin sulfat 200 mg/mL

**PROTOTROFAN SOJ** – bakterijski soj koji raste na MINIMALNOJ PODLOZI. Divlji soj je prototrofan i raste na minimalnoj podlozi.

**AUKSOTROFAN SOJ** – bakterijski soj koji raste na KOMPLETNOJ ili SELEKTIVNOJ podlozi s dodatkom nekog esencijalnog spoja kojeg bakterija ne može sama sintetizirati. Auksotrofni sojevi su mutante. Na primjer, mutanta za auksin zbog mutacije u genu koji kodira za aminokiselinu auksin, ne može samostalno sintetizirati auksin u svojim stanicama. Takvi sojevi neće rasti na minimalnoj podlozi, ali će rasti na kompletnoj podlozi ili selektivnoj podlozi s auksinom.

**Riješite zadatak:**

Nakon konjugacije sojeva $met^- thr^- pan^- pro^+ bio^+ his^+$ i $met^+ thr^+ pan^+ pro^- bio^- his^-$ (Met-metionin, Thr-treonin, Pan-pantotenska kiselina, Pro-prolin, Bio-biotin, His-histidin) bakterije *E. coli*, analizirano je šest kolonija. Tehnikom "replica plating" kolonije su prenesene na selektivne podloge (minimalne podloge uz dodatak aminokiseline navedene uz svaku podlogu). Odredite genotipove kolonija prema sastavu selektivnih podloga:

a) minimalna podloga + Met i Thr – narasle su kolonije 1, 3, 4 i 5
b) minimalna podloga + Thr i Pan – narasla je kolonija 3
c) minimalna podloga + Pro i Bio – narasla je kolonija 3
d) minimalna podloga + Bio i His – narasle su kolonije 2, 3 i 6
e) minimalna podloga + Met i Pan – narasle su kolonije 1, 3 i 5
f) minimalna podloga + Pro i His – narasle su kolonije 3 i 6.

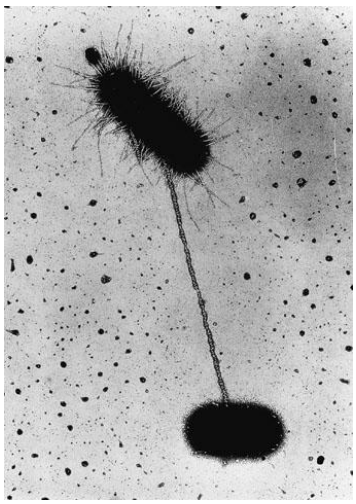
Genotip kolonije 1:
Genotip kolonije 2:
Genotip kolonije 3:
Genotip kolonije 4:
Genotip kolonije 5:
Genotip kolonije 6:

## PRIJENOS I REKOMBINACIJA GENETIČKOG MATERIJALA

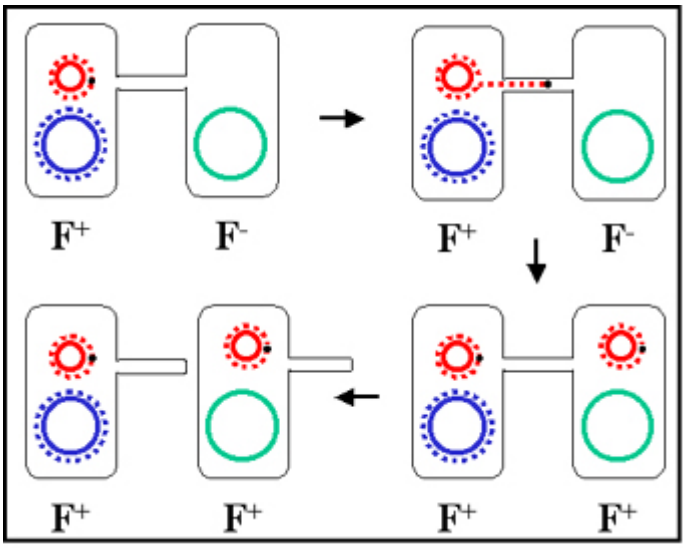
Tri su moguća načina prijenosa i rekombinacije genetičkog materijala u bakterija: transformacija, konjugacija i transdukcija. Transformacija je jedini proces gdje bakterija aktivno unosi stranu DNA i ima gene za transformaciju, dok prilikom konjugacije i transdukcije stanica pasivno prima stranu DNA bilo putem plazmida (konjugacija) ili virusa (transdukcija).

### 1. KONJUGACIJA

"Muška" stanica, donor, posjeduje spolni faktor (plazmid) F, pa se obilježava kao $F^+$, dok "ženska" stanica, recipijent, ne posjeduje taj faktor pa se obilježava kao $F^-$ (slike 9.1 i 9.2.). Neki sojevi mogu integrirati plazmid F u svoj genom. To su sojevi Hfr (engl. high frequency of recombination) koji imaju visoku sposobnost prijenosa genetičkog materijala u stanicu $F^-$. Tijekom konjugacije Hfr i $F^-$ soja dolazi do prijenosa integriranog plazmida i dijela bakterijskog kromosoma iz stanice donora (Hfr) u stanicu recipijenta ($F^-$). Dio kromosoma donora sparuje se s homolognim segmentom kromosoma recipijenta, i ako nastanu barem dvije rekombinacije (odnosno dva krosing-overa) doći će do ugradnje i nastanka rekombiniranog kromosoma. Hfr sojevi se međusobno razlikuju prema mjestu gdje se ugradio plazmid F. Da bi se izolirale željene rekombinante potrebno je provesti selekciju. Na temelju dobivenih podataka izrađuju se genetičke karte za onaj dio kromosoma koji prenosi neki Hfr soj (slika 9.3.). Za izradu genetičke karte koriste se vremenske jedinice i jedinice rekombinacije.



**Slika 9.1.** Elektronsko mikroskopska slika konjugacije između soja $F^+$ i $F^-$.




**Slika 9.2.** Konjugacija između soja $F^+$ (donor) i $F^-$ bakterije (recipijent).

**Zadatak:**

Objasnite slijedeće pojmove:

**Egzogenot =**

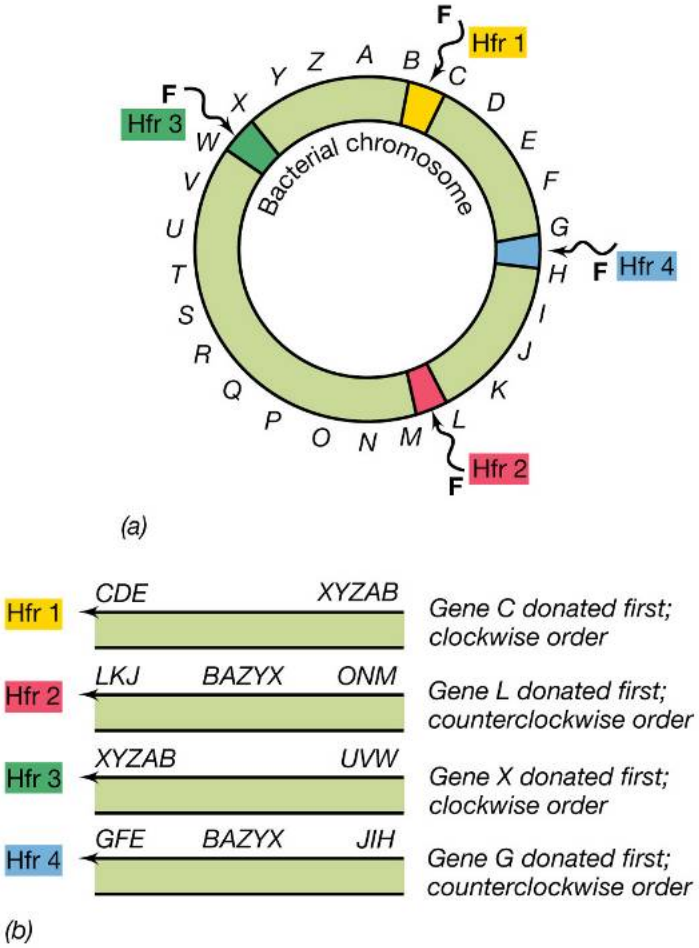
**Endogenot =**

**Merozigota =**

**Parcijalni diploid =**

Da bi se DNA mogla prenijeti iz bakterije $F^+$ u bakteriju $F^-$ prethodno se mora dogoditi jednolančani urez (engl. nick) u plazmidu F. Urez se uvijek događa na istom mjestu nakon čega jedan lanac s 5' krajem putuje u stanicu $F^-$. Tek u stanici $F^-$ sintetizira se komplementarni lanac nakon čega se plazmid cirkularizira i stanica $F^-$ postaje $F^+$. Kad se $F^+$ stanica podijeli raspodjela plazmida u stanice kćeri je nepravilna što znači da stanice $F^+$ stalno produciraju stanice $F^-$.

Konjugacija sojeva $F^+$ i $F^-$ je učinkovit proces. Nasuprot tome, vjerojatnost da će rekombinirati genom Hfr soja s genomom soja $F^-$ je mala. Vjerojatnost ugradnje alela iz stanice Hfr u genom stanice $F^-$ ovisi o uvjetima okoliša i o genomu stanice $F^-$. Na primjer, ako je u stanici $F^-$ lokus *a* mutiran ($a^-$) onda je vjerojatnost da se zamijeni divljim tipom alela *a* ($a^+$) iz stanice Hfr veća.




**Slika 9.3.** Mjesta u bakterijskom kromosomu gdje se može ugraditi plazmid F označena su crveno, plavo, žuto i zeleno. Za potrebe kartiranja određenog dijela bakterijskog kromosoma izabire se određeni bakterijski soj. Na primjer, ako želimo kartirati područje na kromosomu označeno slovima ONMLK za pokus izabiremo soj Hfr 2.

**Zadatak:**
Nacrtajte konjugaciju između bakterije $F^+$ i $F^-$ s posebnim osvrtom na sigma replikaciju.

**Zadatak:**
F plazmid se ugradio pokraj gena $trf^+$ i $leu^+$ i nastao je soj Hfr. Pri konjugaciji bakterija Hfr i $F^-$ geni *trf*+ i *leu*+ zajedno se s plazmidom F izrezuju iz bakterijskog kromosoma stanice Hfr te se prenose u stanicu $F^-$. Stanica $F^-$ je recipročnog genotipa ($trf^-$ $leu^-$). Nacrtajte ugradnju gena $trf^+$ i $leu^+$ u genom stanice $F^-$. Kakvu biste podlogu izabrali za izolaciju prototrofnih $F^-$ stanica?

## KARTIRANJE BAKTERIJSKOG KROMOSOMA

### A. PREKINUTA KONJUGACIJA ILI VREMENSKO KARTIRANJE

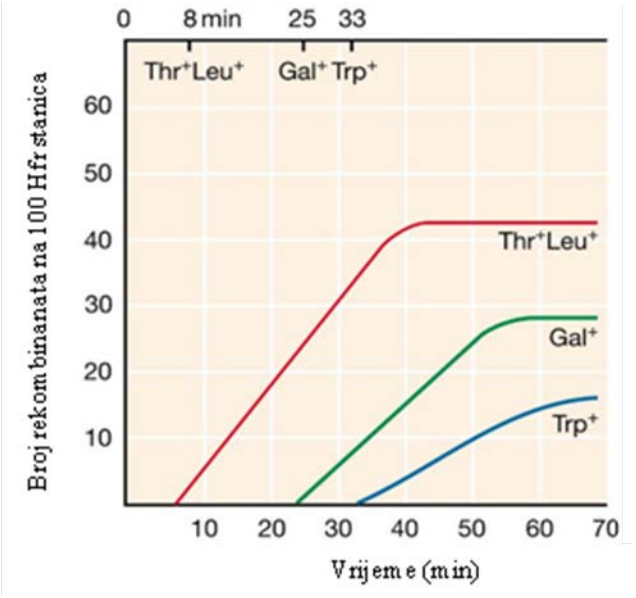
Razmak između pojedinih gena na bakterijskom kromosomu moguće je izraziti u vremenskim jedinicama. Vremensko kartiranje temelji se na pretpostavci da se konjugacija između soja Hfr i $F^-$ može se prekinuti u bilo koje željeno vrijeme. Zbog polarnosti kojom se Hfr kromosom prenosi, vrijeme potrebno da se različiti genski biljezi pojave u primaocu (recipijentu) odražava njihov linearni poredak na kromosomu davaoca (donora).

**ZADATAK:**

Soj Hfr koji nosi prototrofne biljege $a^+$, $b^+$, $c^+$ miješa se s $F^-$ sojem koji nosi auksotrofne biljege $a^-$, $b^-$ i $c^-$. Konjugacija je prekidana svakih 5 minuta i bakterije su nacijepljene na podloge koje otkrivaju prisutnost rekombinanti.

| Vrijeme | rekombinante |
|---|---|
| 5 min | $a^-b^-c^+$ |
| 10 min | $a^-b^+c^+$ |
| 15 min | $a^+b^+c^+$ |

Odredite poredak gena na temelju vremenskih jedinica: _____




**Slika 9.4.** Vremensko kartiranje.

**ZADATAK:**

Rezultati vremenskg kartiranja prikazani su na slici 9.4. Koji je redoslijed biljega gal, trp, leu i thr na bakterijskom kromosomu?

Zaokružite točan odgovor:

a) gal, trp, leu, thr ili thr, leu, trp, gal
b) thr, leu, gal, trp ili leu, thr, gal, trp

c) trp, gal, thr, leu ili leu, thr, gal, trp

Biljezi thr i leu ulaze u isto vrijeme u stanicu $F^-$. Što možete iz toga zaključiti o njihovoj relativnoj udaljenosti? Zaokružite odgovor:

Biljezi thr i leu su:

d) Daleko
e) Blizu
f) Ne mogu ništa zaključiti

## B. REKOMBINACIJSKO KARTIRANJE

Budući da karta s razmacima izraženim u vremenskim jedinicama daje relativne položaje gena na kromosomu, nedostatak ovakve vrste kartiranja je to što se ne mogu dobiti podaci o udaljenosti genskih lokusa koji su vrlo blizu (na primjer lokusa thr i leu). Za određivanje udaljenosti genskih lokusa koji blizu jedan drugoga koristi se rekombinacijsko kartiranje.

Rekombinacijsko kartiranje radi se na temelju učestalosti rekombinacije. Mogućnost za rekombinaciju u bakterija postoji samo uz parcijalan prijenos genetičkog materijala (merozigota). Strana genetička čestica (egzogenot) mora biti intergrirana u kromosom domaćina (endogenot) da bi se mogla replicirati i dalje prenositi na potomke. U sistemu parcijalnog diploida potreban je određeni broj krosing-overa za ugradnju egzogenota u kromosom domaćina.

**ZADATAK:**

Koliko je potrebno krosing-overa da bi nastala prototrofna rekombinanta $a^+b^+$? Nacrtajte krosing-overe.

$a^+$ $b^+$
Egzogenot _____
endogenot _____
$a^-$ $b^-$

Odgovor: potrebna su _____ krosingovera.

Koliko je potrebno krosingovera da bi nastala prototrofna rekombinanta $a^+b^+c^+$? Nacrtajte krosingovere.

$a^+$ $b^-$ $c^+$
Egzogenot _____
ednogenot _____
$a^-$ $b^+$ $c^-$

**ZADATAK:**

Znanstveni problem:
Lokusi thr i leu su previše blizu te se pomoću vremenskog kartiranja ne može odrediti njihov redoslijed u genomu bakterije. Cilj pokusa je odrediti redoslijed lokusa thr i leu.

Znanstvena hipoteza:

Prekinutom konjugacijom između sojeva Hfr i F- ustanovljen je slijedeći poredak lokusa na bakterijskom kromosomu: thr-leu-gal-trp ili leu-thr-gal-trp.
Dakle, postoje dvije mogućnosti redoslijeda lokusa trh i leu:
I mogućnost: redoslijed je **thr-leu**-gal-trp
II mogućnost: redolijed je **leu-thr**-gal-trp

Postavljanje pokusa:
Rekombinacijsko kartiranje temelji se na konjugaciji sojeva Hfr i $F^-$. Genotipovi sojeva Hfr i $F^-$ moraju biti RECIPROČNI. Na primjer, ako je Hfr soj $thr^-$, onda je $F^-$ soj $thr^+$. Nakon konjugacije potrebno je izolirati samo PROTOTROFNE $F^-$ sojeve. To se postiže nacjepljivanjem stanica na minimalnu podlogu sa streptomicinom nakon konjugacije. Na minimalnoj podlozi narasti će samo prototrofi, a na minimalnoj podlozi sa streptomicinom narast će prototrofi koji su rezistentni na streptomicin (odnosno $F^-$ sojevi). Dakle, za pokus ćemo izabrati sojeve Hfr koji su $Str^S$ (S-senzitivan) i sojeve $F^-$ koji su $Str^R$ (R-rezistentan).

Preostaje nam da izaberemo genotip bakterija s obzirom na lokuse leu, thr, gal i trp. Odabir genotipa mora zadovoljiti slijedeće: **da se mogućnosti I i II razlikuju u broju krosing-overa koji su potrebni za dobijavanje prototrofa**. To su slijedeći genotipovi:

**Hfr:** $leu^+$ $thr^-$ $gal^+$ $str^S$
**$F^-$:** $leu^-$ $thr^+$ $gal^-$ $str^R$

**Pitanje:** S obzirom na gore navedene genotipove sojeva Hfr i $F^-$ koliko je potrebno krosing-overa za dobivanje prototrofnog $F^-$ soja koji je $Str^R$ ako je poredak leu-thr-gal? Nacrtajte krosing-overe.

**Pitanje:** S obzirom na gore navedene genotipove sojeva Hfr i $F^-$ koliko je potrebno krosing-overa za dobivanje prototrofnog $F^-$ soja koji je $Str^R$ ako je poredak thr-leu-gal? Nacrtajte krosing-overe.

Dakle, ako je vaš odabir genotipova zadovoljio uvjet da je kod različitog poretka potreban različiti broj krosing-overa za nastanak prototrofa, izmiješate ta dva soja i nacijepite ih na minimalnu podlogu sa streptomicinom. Bitan je **samo broj** kolonija koji je narastao!

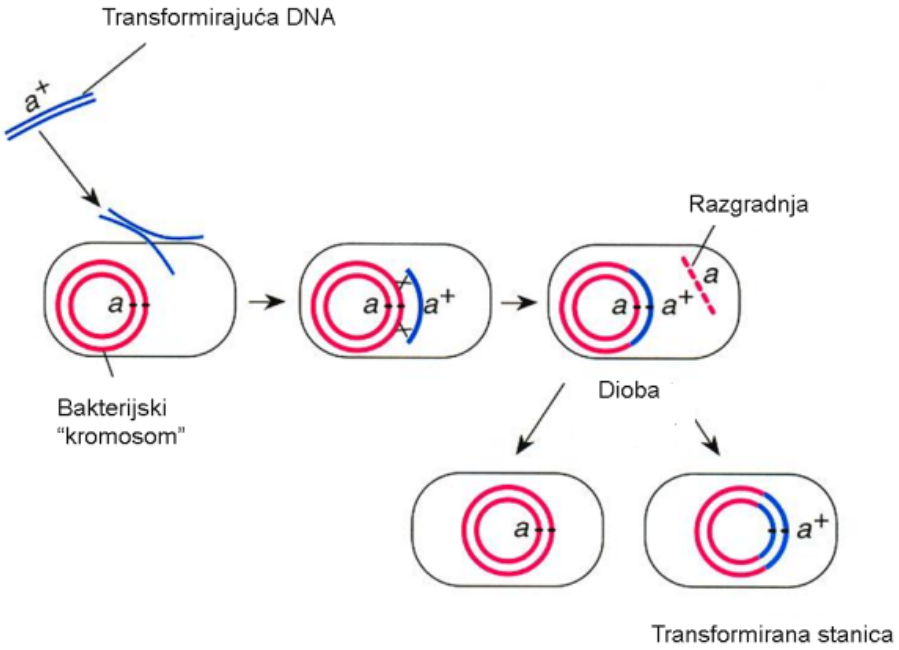
Očitavanje rezultata nacjepljivanja bakterija:

Važno je za imati na umu da je **vjerojatnost da se dogode dva krosing-overa značajno veća od vjerojatnosti za četiri krosing-overa**. To znači, u poretku lokusa gdje su potrebna dva krosing-overa za dobivanje prototrofa očekujemo da će narasti značajno više kolonija na minimalnoj podlozi sa streptomicinom nego u poretku gdje su potrebna četiri.
Koji je poredak ako je narastao VELIKI broj kolonija? _____

Koji je poredak ako je narastao MALI broj kolonija? _____

## 2. TRANSFORMACIJA

Transformacija je prijenos gole DNA iz stanice davaoca (recipijent) u stanicu primaoca (donor) (slika 9.5).




**Slika 9.5.** Transformacija.

Baterijske stanice koje su sposobne primiti stranu DNA nazivamo kompetentnim stanicama (**kompetencija** = sposobnost bakterijske stanice da primi stranu DNA). Neke bakterije kao na primjer vrste *Bacillus subtilis*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Haemophilus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Azotobacter sp.*, *Neisseria sp.*, *Thermus sp*. prirodno su kompetentne, dok se druge treba dovesti u stanje kompetentnosti. Postoji nekoliko načina kako učiniti bakterije kompetentnima: 1) kemijski tretman na primjer stanica *E. coli* s 10 mM otopinom $Ca^{2+}$ pri temperaturi od 4 ºC, 2) elektroporacija – djelovanje električnim impulsom u trajanju nekoliko milisekundi nakon čega nastaju pore u membrani kroz koje gola DNA može ući u stanicu i 3) toplinski šok kojim uzrokuje poremećaj membrane.

**Praktični rad:**

### ODREĐIVANJE GENOTIPA BAKTERIJSKOG SOJA

**Potreban materijal:**

LB ploče
2 bakterijska soja-prototrof i auksotrof
Etanol 96%-tni

Stakleni štapić za razmazivanje bakterija
Petrijeva posuda
Plamenik
Flomaster

Studenti će ovu vježbu raditi u grupama po troje. Svaka grupa ima na raspolaganju 3 ploče sa hranjivom podlogom. Jedna od ploča sadrži minimalnu podlogu, druga minimalnu podlogu sa streptomicinom, a treća minimalnu podlogu sa streptomicinom te aminokiselinama treoninom, leucinom, histidinom, prolinom i argininom.
Na raspolaganju su vam 2 bakterijska soja: A i B. Jedan od sojeva je prototrof osjetljiv na streptomicin, a drugi je auksotrof rezistentan na navedeni antibiotik.
Svaku od ploča podijelite u 2 dijela (razdjelnu liniju označite flomasterom na poleđini ploče) i označite svaku polovicu slovom A ili B.
Nasađivanje bakterija izvodi se u laminaru u sterilnim uvjetima. Potrebno je 70%-tnim etanolom sterilizirati laminar i pribor. Štapić za nasađivanje bakterija sterilizira se tako da se umoči u etanol te zapali. Pri otvaranju i zatvaranju epruvete sa bakterijskom suspenzijom potrebno je nad plamenom sterilizirati otvor epruvete.
Nakapajte 20 µl bakterijske suspenzije na odgovarajuću polovinu ploče te razmažite prethodno steriliziranim štapićem. Pričekajte 2-3 minute da se ploča osuši te je prebacite u termostat na 37°C. Na svaku ploču nasadite oba bakterijska soja (svaki na jednu polovinu)!

**Odgovorite na pitanja:**

Što očekujete, koji soj će narasti na ploči sa minimalnom podlogom bez streptamicina i zašto?
Koji će soj narasti na minimalnoj podlozi sa streptamicinom i zašto?
Koji će soj narasti na minimalnoj podlozi sa streptamicinom i aminokiselinama i zašto?
Odredite koji je soj auksotrofan a koji prototrofan.

# 10. REGULACIJA EKSPRESIJE GENA: *LAC* OPERON I BILJNI INDUCIBILNI PROMOTORI

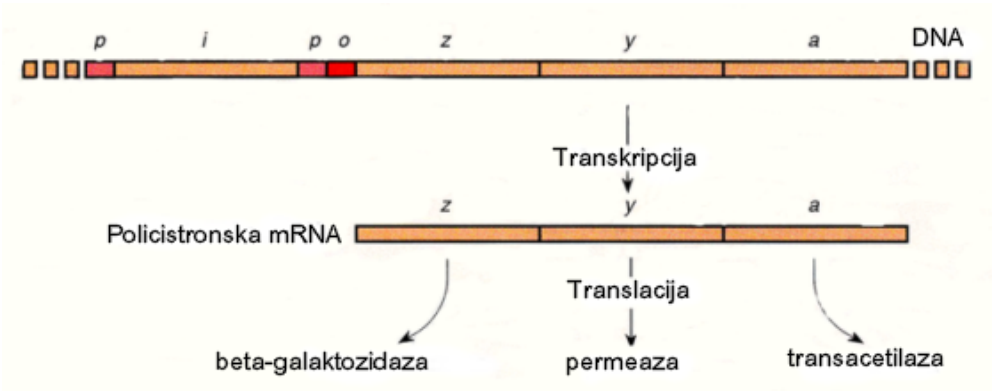
Manifestacija nekog svojstva/fenotipa zahtijeva kontroliranu ekspresiju gena. Kao što ja poznato, stanice jednog organizma su međusobno vrlo različite iako sve potječu od jedne oplođene jajne stanice. Proces nastajanja različitih tipova stanica iz jednostanične zigote naziva se *diferencijacija*, a omogućuje ga diferencijalna ekspresija gena. To znači da su u različitim tipovima stanica, kao i tijekom različitih stadija razvitka, aktivni različiti geni. Postoji nekoliko načina regulacije genske aktivnosti:

1. Neki geni eksprimiraju se stalno i u svim stanicama, neovisno o uvjetima. Takva ekspresija naziva se *konstitutivnom* i karakteristična je za gene potrebne za izgradnju osnovnih staničnih struktura te za osnovne metaboličke procese (tzv. *housekeeping geni*). Takvi geni su npr. geni za sintezu aminokiselina, nukleotida i fosfolipida, ili pak geni za katabolizam glukoze (stvaranje energije).
2. Neki geni eksprimiraju se ovisno o prisutnosti hranjivih tvari u okolini, kao npr. geni *E.coli* potrebni za korištenje laktoze kao izvora energije.
3. Geni mogu biti regulirani hormonima i faktorima rasta kod višestaničnih organizama.
4. Geni mogu biti regulirani razvojnim stadijem, odnosno uključuju se i isključuju u pojedinim stadijima razvoja organizma.

Kontrola ekspresije gena moguća je na različitim razinama: na razini transkripcije, na razini procesiranja (obrade) i stabilnosti mRNA (kod eukariota), na razini translacije, na post-translacijskoj razini.

## 1. Regulacija ekspresije gena u prokariota: lac operon u bakteriji *E.coli*

U prokariota je ekspresija gena najčešće regulirana na razini transkripcije. Kontrolu transkripcije upoznat ćete na primjeru *lac* operona *E.coli* (Slika 10.1.).




**Slika 10.1.** *Lac* operon

*E. coli*, osim glukoze, može koristiti i laktozu kao izvor energije, zahvaljujući *lac* genima koji se nalaze zajedno na jednom odsječku DNA, tzv. operonu. Operon je usklađeni regulacijski sistem ekspresije, koji obuhvaća nekoliko gena: **a)** tzv. ***strukturne gene***, **b)** ***promotor*** (slijed nukleotida kojeg prepoznaje RNA polimeraza i započinje transkripciju) i **c)** ***operator*** (slijed nukleotida na koji se veže represorski protein). Nedaleko od *lac* operona nalazi se ***regulatorni gen*** ili ***gen regulator (i)*** koji je uključen u kontrolu ekspresije strukturnih gena na način da kodira (za) represor. Represor je alosterički protein, koji ima mogućnost promjene konformacije (3D strukture) ovisno o tome da li je za njega vezan induktor (u slučaju *lac* operona induktor je laktoza). Kada u stanici nije prisutna laktoza, represor se veže na operator i fizički sprječava vezanje RNA polimeraze za promotor. S druge strane, kad je u stanici prisutna laktoza (induktor), dolazi do vezanja alolaktoze na represor. Represor s vezanom alolaktozom mijenja konformaciju i više se ne može vezati na operator. RNA polimeraza se sada može nesmetano vezati za promotor i započeti transkripciju ***strukturnih gena*** (Slika 10.2. A i B):

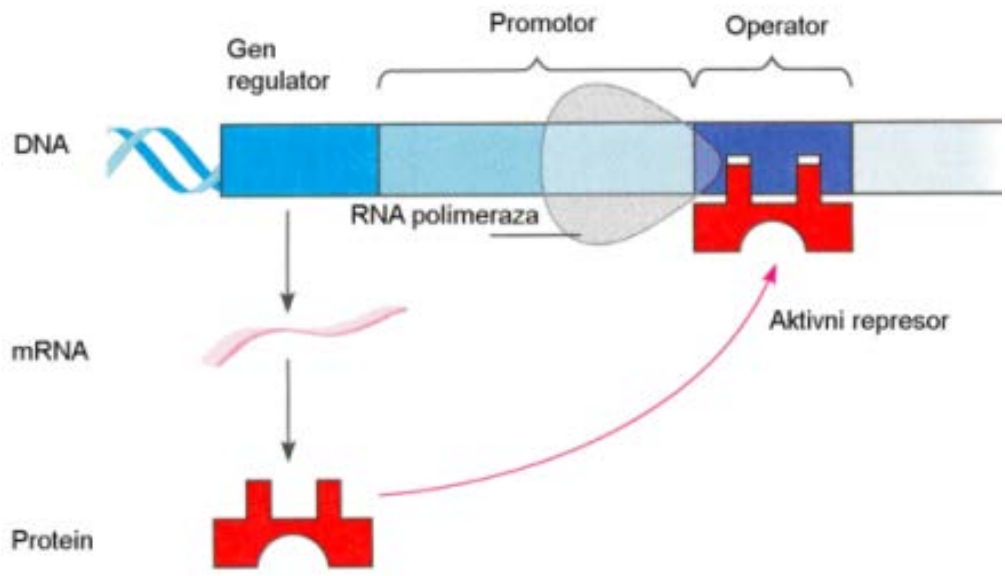
1) gen ***lacZ*** kodira za enzim β-galaktozidazu koji cijepa laktozu na monosaharide glukozu i galaktozu te pretvara laktozu u alolaktozu
2) gen ***lacY*** kodira za enzim β-galaktozid permeazu koji olakšava ulazak laktoze u stanicu
3) gen ***lacA*** kodira za enzim galaktozid transacetilazu koja štiti stanicu od toksičnih produkata β-galaktozidaze kada osim laktoze, cijepa druge galaktozide

Dakle, ekspresija strukturnih gena inducirana je samo u prisustvu laktoze. Takav način ekspresije gena naziva se ***inducibilna ekspresija***. Sistem *lac* operona funkcionira na opisani način samo ako su sve komponente sistema funkcionalne. Tako divlji tip *E. coli* genotipa $o^+z^+y^+a^+$ sintetizira sva tri strukturna enzima, ali samo u slučaju kada je laktoza prisutna u hranidbenoj podlozi.

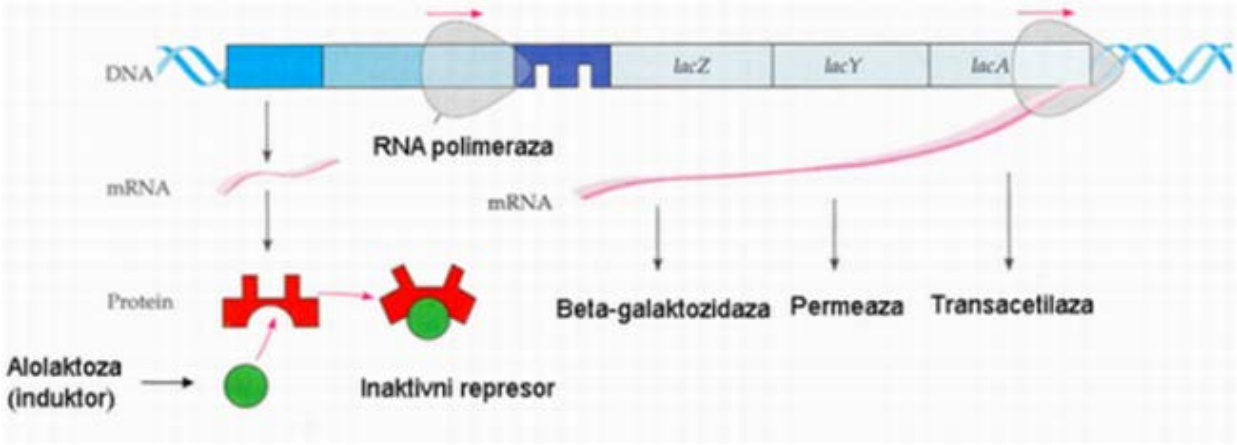
Mutacije u sustavu *lac* operona koje onemogućuju inducibilnu ekspresije gena poznate su i dobro proučene. Takve *konstitutivne* mutante, u kojima se enzimi kodirani strukturnim genima proizvode neovisno o prisutnosti supstrata, nisu posljedica mutacija u strukturnim genima (z, y, a), nego nastaju kao produkt mutacija regulatora (*i*) ili operatora (*o*). Tako mutante genotipa $o^cz^+y^+a^+$ (**$o^c$** – konstitutivni operator ili trajno «otvoren» operator) pak sintetiziraju sva tri enzima bez obzira da li je laktoza prisutna u podlozi.

S druge strane postoje mutante s izmijenjenim *regulatornim genom (i).* Ukoliko je *regulator* mutiran na način da proizvodi represor koji se više ne može vezati na operator, ekspresija strukturnih gena je konstitutivna bez obzira na prisustvo laktoze (**$i^-$**-defektni regulator). Ako je pak *regulator* mutiran na način da proizvodi represor neosjetljiv na laktozu (**$i^s$**-superrepresor), ekspresija strukturnih gena je trajno blokirana, čak i u prisustvu laktoze.
Osim navedenih, postoje mutacije koje pogađaju i strukturne gene (z, a, y) te dovode do stvaranja nefunkcionalnih enzima čak i kada je operon "otvoren".

**A Laktoze nema**




**B Laktoza prisutna**




**Slika 10.2.** Mehanizam aktivacije i represije *lac* operona. *i*-gen regulator (kodira represor); $p_{lac}$-promotor *lac* operona na koji se veže RNA polimeraza; *o*-operator: mjesto vezanja represora; *z*-prvi strukturni gen: β-galaktozidaza. Sustav *lac* operona opisali su istraživači Francois Jacob i Jacques Monod 1961. godine, a za to otkriće dobili su Nobelovu nagradu 1965. godine.

## Praktičan rad

### 1.) Indukcija *lac* operona transformacijom kemijski- i elektro-kompetentnih stanica *E. coli*

Na početku vježbe, vaš je zadatak pripremiti selektivne podloge s antibiotikom ampicilinom (*Amp*) na koje ćete kasnije nasaditi transformirane stanice *E.coli*. U tu svrhu u vodenoj kupelji naći ćete otopljeni hranjivi medij (LB). Svaka grupa treba pripremiti 4 ampicilinske podloge (konačna koncentracija ampicilina: 50 mg/L) tako da u 4 petrijevke izlije po 30 ml LB medija, prethodno pomiješanog s odgovarajućim volumenom matične otopine ampicilina.
Svaka grupa ima na raspolaganju:

- 4 petrijevke
- matičnu otopinu ampicilina (50 mg/mL)
- plastične epruvete s čepom ("falkonice") volumena 50 ml
- mikropipete i plastične nastavke

Nakon što ste priredili selektivne podloge, ostavite ih da se ohlade/stvrdnu u digestoru. Na površinu sve četiri ohlađene podloge dodajte 30 µl otopine X-Gal (kromogeni derivat laktoze) i razmažite je po površini kružnim pokretima koristeći Drigalsky špatulu. Potom samo na dvije dodajte 100 µl otopine IPTG-a (analog laktoze) i razmažite je na isti način. IPTG služi umjesto laktoze kao induktor laktoznog operona. Ostavite podloge da se suše u digestoru 10 min. Nakon toga podloge su spremne za nasađivanje transformiranih stanica *E.coli*.
Svaka grupa ima na raspolaganju:

- X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid)
- IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid)
- staklenu Trigalsky špatulu

Kompetentne stanice *E. coli* u svom laktoznom operonu imaju nepotpuni (i neaktivni) gen za β-galaktozidazu, ω-*lacZ.* Vi ćete u te stanice transfomacijom unijeti vektor/plazmid naziva *pBluescript*, koji nosi α-*lacZ* gen (*lacZ'*) za α podjedinicu β-galaktozidaze. Spajanjem α i ω podjedinice u uspješno transformiranim stanicama, formira se funkcionalna β-galaktozidaza (tzv. α-komplementacija). Ona u prisustvu IPTG-a može cijepati laktozni derivat X-Gal na galaktozu i derivat indiga (4-kloro-3-brom-indigo). Potonji spoj dimerizira i stvara plavi precipitat (5,5'-dibrom-4,4" dikloro indigo), koji transformirane stanice (kolonije) boji u plavo. Na podlozi bez IPTG-a (induktora), kolonije ostaju bijele (nije došlo do indukcije laktoznog operona). Isti soj stanica *E.coli* transformirat ćete na dva načina koja se rutinski provode u laboratorijima: toplinskim šokom (kemijski kompetentne stanice) i elektrošokom (elektrokompetentne stanice) (slika 10.3.).

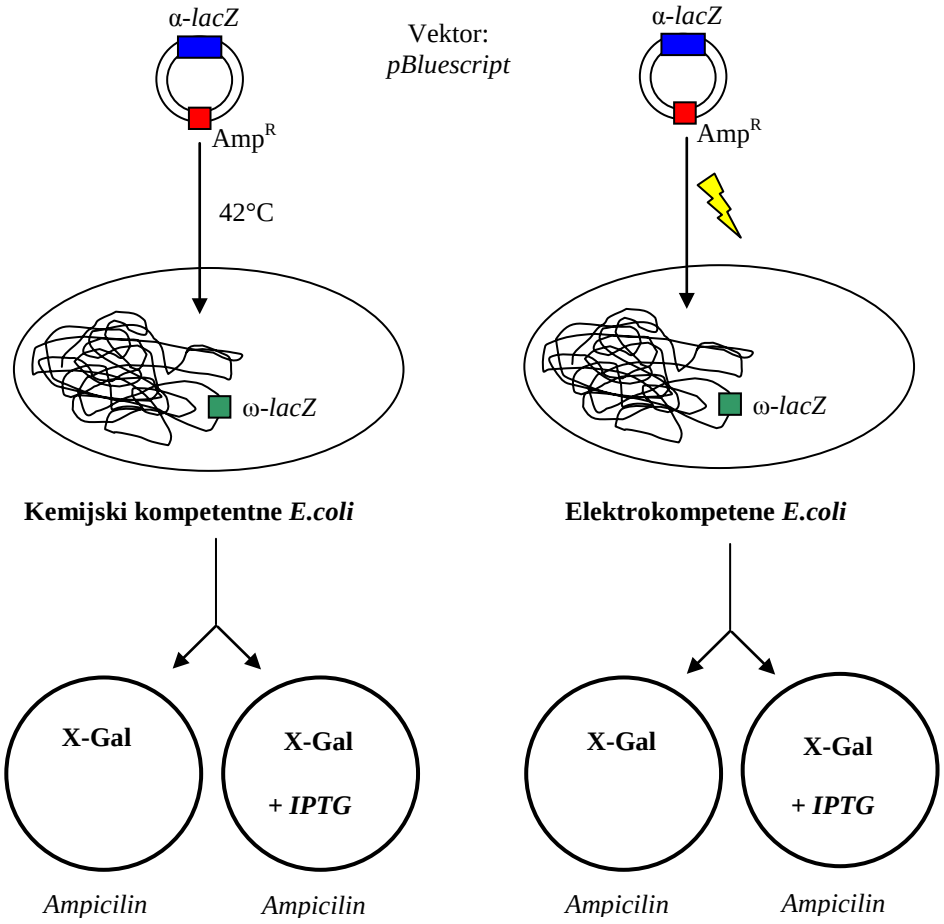
*Transformacija stanica toplinskim šokom:*

- u mikroeprivetu/epicu s kemijski kompetentnim stanicama ("KK", na ledu) dodajte 1 µl otopine *pBluescript* vektora i polako promiješajte pipetiranjem
- stanice inkubirajte na ledu 15 min
- epice sa stanicama prebacite u kupelj na 42 °C, inkubirajte 90 sekundi

- potom epice prebacite na led, inkubirajte 2 minute
- u epice dodajte 450 µl tekućeg LB medija, lagano promiješajte pipetiranjem i inkubirajte 30 min. u termobloku na 37 °C
- 50 µl stanične suspenzije nasadite na LB ploče (X-Gal, +/- IPTG) koristeći Drigalsky špatulu/etaler). Prvo na ploče bez IPTG-a!!!

*Transformacija stanica elektrošokom:*

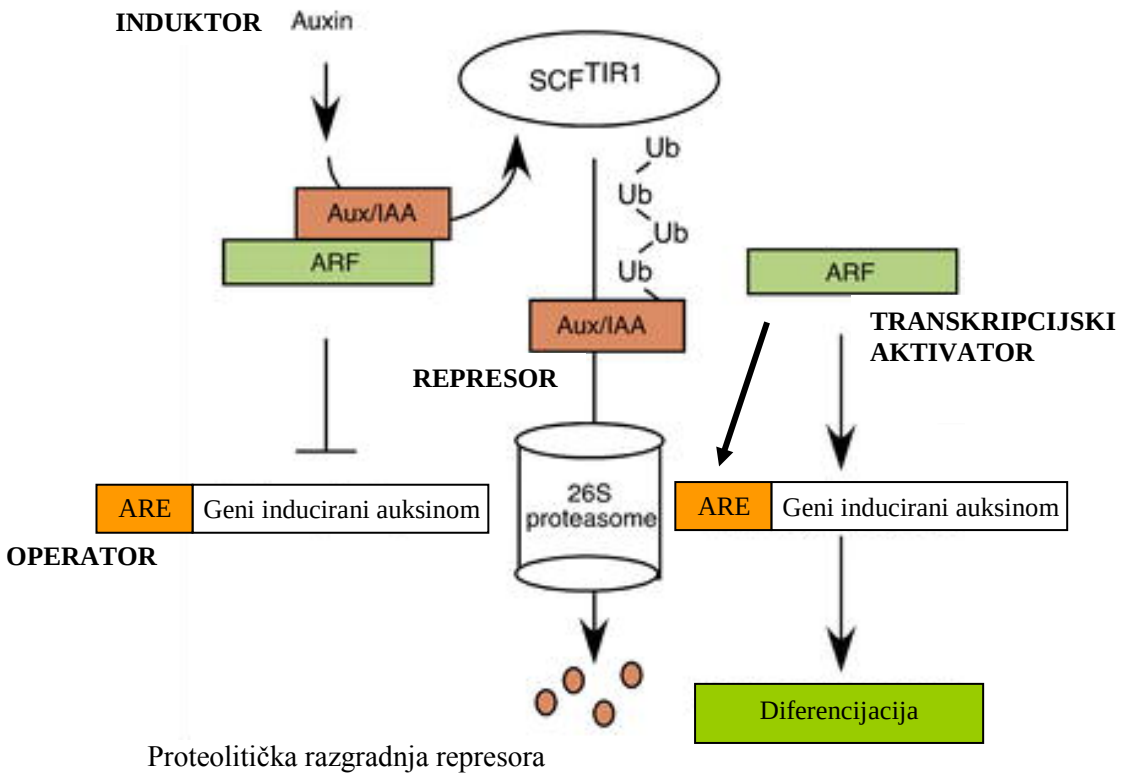
- u mikroeprivetu/epicu s kemijski kompetentnim stanicama ("EK", na ledu) dodajte 1 µl otopine *pBluescript* vektora i polako promiješajte pipetiranjem
- pomoću mikropipete sa žutim nastavkom prebacite stanice u kivetu za elektroporaciju koja se nalazi na ledu
- kivetu stavite u elektroporator (uređaj za elektroporaciju) i izložite stanice električnom šoku (u kilovoltima)
- nakon zvučnog signala izvadite stanice iz elektroporatora i u kivetu dodajte 450 µl tekućeg LB medija i lagano promiješajte pipetiranjem
- suspenziju prebacite u epicu od 1,5 ml i inkubirajte inkubirajte 30 min. u termobloku na 37 °C
- potom 50 µl suspenzije nasadite na LB ploče (X-Gal +/- IPTG) koristeći Drigalsky špatulu/etaler). Prvo na ploče bez IPTG-a!!!




**Slika 10.3.** Sažeti prikaz eksperimenta transformacije indukcije *lac* operona

## 2. Indukcija eukariotskih promotora osjetljivih na biljne hormone

U drugom dijelu vježbe vaš je zadatak inducirati ekspresiju reporter gena koji je pod transkripcijskom kontrolom hormonski osjetljivog promotora. Reporter-gen koji će se eksprimirati dodatkom biljnog hormona je β-glukuronidaza (GUS). Na raspolaganju ćete imati tri linije biljke *Arabidopsis thaliana* na hranjivoj podlozi. Sve linije ispred spomenutog reporter gena imaju promotor osjetljiv na biljni hormon auksin.
GUS gen izoliran je iz bakterije *E.coli* i koristi se kao reporter-gen u biljaka. Dodatkom supstrata X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronida), GUS ga cijepa na glukuronsku kiselinu i derivat indiga koji dimerizacijom stvara plavi precipitat vidljiv u tkivu biljke.
Sve tri biljne linije koje ćete dobiti eksprimiraju GUS reporter-gen pod utjecajem vlastitih endogenih hormona. Vi ćete pokušati inducirati/pojačati ekspresiju reporter gena (GUS) u tim linijama upotrebom egzogeno dodanog hormona auksina.
Mehanizam regulacije i aktivacije hormonski osjetljivih promotora u biljaka objašnjen je i prikazan je na slici 10.4.




**Slika 10.4.** Indukcija ekspresije gena osjetljivih na auksin. *Auxin*-induktor; *AUX/IAA*-represor; *AFR*-pozitivni regulator transkripcije; *ARE*-auksinski operator, $SCR^{TIR1}$, *26S proteasom* i *Ub*: mašinerija za proteolitičku razgradnju proteina.

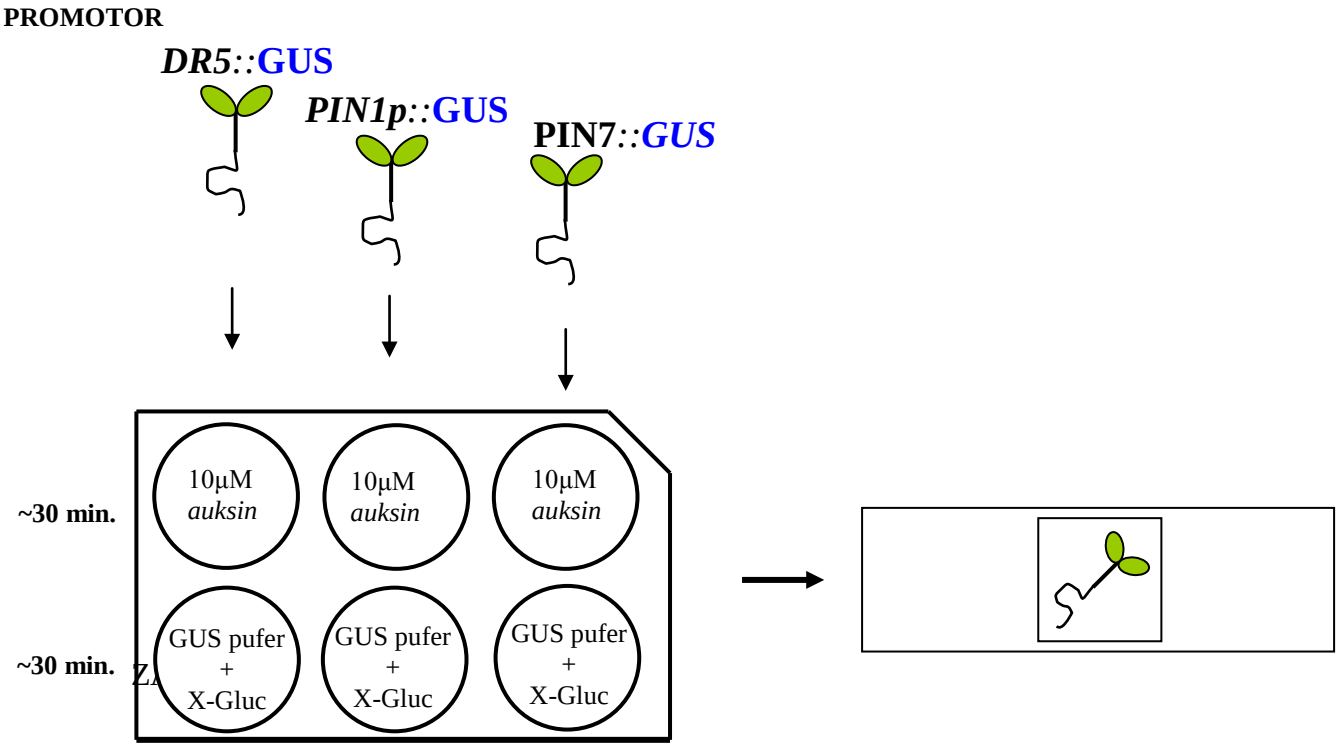
Ukratko, u nedostatku auksina, aktivator transkripcije (ARF) ne može se vezati na *auksinski operator* (ARE) jer je vezan s represorom IAA/AUX. Dodatkom auksina, IAA/AUX represor se proteolitički razgrađuje i oslobađa ARF. Sada se ARF može vezati na *auksinski operator* ARE i inducirati transkripciju gena.

Svaka grupa studenata ima na raspolaganju:

- tri linije *A. thaliana*:
  *DR5::*GUS (auksinski *transkripcijski* reporter-gen)
  *PIN1p::*GUS (auksinski *transkripcijski* reporter-gen)
  PIN7::GUS (auksinski *translacijski* reporter-gen)
- plastičnu posudicu sa 6 utora/bazenčića
- matičnu otopinu auksina
- matičnu otopinu etilena (točnije: prekursora etilena)
- matičnu otopinu citokinina
- $dH_2O$
- pufer s X-Gluc-om (spreman za upotrebu)

*Indukcija ekspresije GUS-a (Slika 10.5.):*

- u tri gornja utora/bazenčića priredite radnu otopinu hormona (neka vam je volumen svake otopine 1 ml, a koncentracija hormona 10 µM)
- pažljivo prenesite po nekoliko biljčica svake linije u priređenu otopinu hormona i inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi
- potom pažljivo prenesite biljčice u pufer s X-Gluc-om i inkubirajte na sobnoj temperaturi barem 30 min. (1 mL po bazenčiću)
- na kraju pod mikroskopom promatrajte promjene u ekspresiji reporter gena u odnosu na odgovarajuće netretirane linije




**Slika 10.5.** Sažeti prikaz eksperimenta indukcije ekspresije biljnim hormonima.

## ZADACI:

1. Odredite za svaki navedeni djelomični diploid kakva je sinteza enzima (inducibilna ili konstitutivna):
   - $i^+/i^+$, $o^+/o^+$
   - $i^+/i^+$, $o^+/o^c$
   - $i^+/i^+$, $o^c/o^c$
   - $i^+/i^-$, $o^+/o^+$
   - $I^-/i^-$, $o^+/o^+$

2. Kakva će biti sinteza ß-galaktozidaze kod sljedećih genotipova?
   - $i^+p^+o^+z^+y^+a^+$
   - $i^-p^+o^+z^+y^+a^+$
   - $i^+p^+o^cz^+y^+a^+$
   - $i^+p^+o^+z^-y^+a^+$
   - $i^+p^+o^+z^-y^+a^+/i^+p^+o^cz^+y^+a^+$.

3. Napišite hijerarhiju dominacije alela i-lokusa s obzirom na njihovo djelovanje na lac-operator.

4. Napišite hijerarhiju dominacije alela o-lokusa s obzirom na njihovu mogućnost «uključivanja» svog operona.

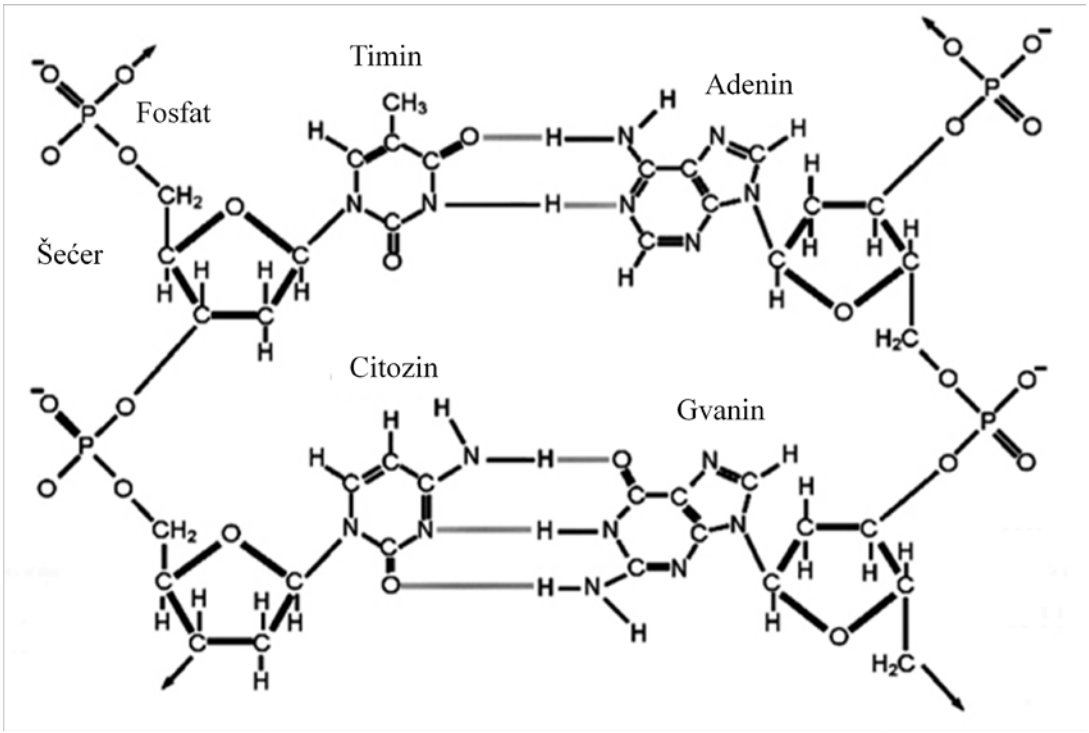
5. Upotrijebivši „+“ za sintezu i „–“ za odsustvo sinteze enzima permeaze (P) i galaktozidaze (gal) upotpunite slijedeću tablicu.

| Genotip | induktor prisutan | | induktor odsutan | |
|---|---|---|---|---|
| | P | gal | P | gal |
| $i^+o^+y^+z^+$ | | | | |
| $i^-o^+y^+z^+$ | | | | |
| $i^so^+y^+z^+$ | | | | |
| $i^+o^cy^+z^+$ | | | | |
| $i^-o^cy^+z^+$ | | | | |
| $i^so^cy^+z^+$ | | | | |

6. Kakva je sinteza ß-galaktozidaze u sljedećim merodiploidnim sojevima E. coli?
   - $i^+o^+z^+/i^+o^cz^+$
   - $i^+o^cz^+/i^+o^cz^+$
   - $i^+o^+z^+/i^-o^+z^+$
   - $i^-o^+z^+/i^+o^+z^+$

## 11. IZOLACIJA DNA IZ BILJNOG MATERIJALA METODOM „URADI SAM“ („home made“)

Deoksiribonukleinska kiselina je genetički/nasljedni materijal prisutan u stanicama svih organizama, od bakterija do čovjeka. Sastoji se od dva antiparalelna polinukleotidna lanca povezana vodikovim vezama između dušičnih baza adenina i timina, odnosno gvanina i citozina. Fosfati ($PO_4^{3-}$) molekuli DNA daju negativan naboj, što je čini dobro topljivom u vodi (slika 11.1.).




**Slika 11.1.** Građevne jedinice DNA: deoksiriboza, fosfati i dušične baze

Postupak izolacije vrlo čiste DNA (one koja će biti podobna za postupke kao što su rezanje restrikcijskim endonukleazama, radioaktivno ili neradioaktivno obilježavanje, ligaciju itd.) zahtijeva relativno složenu proceduru. Ona gotovo uvijek uključuje upotrebu specijalnih deterdženata, lužina, organskih otapala i/ili enzima. Međutim, DNA se može izolirati (i vidjeti prostim okom) prilično jednostavnim postupkom koji, u smislu materijala, ne zahtijeva ništa više od onoga što možete naći u vlastitoj kuhinji. Ukratko, postupak izolacije DNA sastoji se od tri osnovna koraka: (1) mehaničkog usitnjavanja tkiva i razgradnje stanica, (2) oslobađanja staničnog sadržaja u otopinu te (3) precipitacije/taloženja DNA iz otopine.

## Praktičan rad

Vaš zadatak tijekom ove vježbe bit će izolacija DNA u tri spomenuta koraka. Na raspolaganju ćete imati samo «kuhinjsku opremu»: mikser-rezač, filtre za kavu, kuhinjsku sol i deterdžent za pranje suđa. Izvor DNA bit će različit za svaku od četiri grupe (3-4 studenta/studentice po grupi). Svaka grupa će na stolu zateći sljedeću opremu za izolaciju (slika 11.2.): menzuru, plastični lijevak, laboratorijsku čašu, Erlenmeyer-ovu tikvicu, stakleni štapić, mikropipetu i malu plastičnu epruvetu od 1,5 ml (kolokvijalno: "ependorficu/epicu"; prema imenu proizvođača: *Eppendorf*).
Jedna od važnih točaka u dobivanju što čišće DNA je njeno odvajanje od proteina s kojima se nalazi u kompleksu. To se u laboratorijskoj praksi postiže upotrebom organskih otapala fenola i kloroforma (triklormetan) ili dodatkom nekih pročišćenih proteolitičkih enzima (sinonimi: proteaze, proteinaze, peptidaze) koji cijepaju peptidne veze između aminokiselina nekog proteina. Odvajanje DNA od proteina omogućit će sok od ananasa koji sadrži proteolitički enzim *bromelin*.

**Materijal:**

- Mljeveno meso
- Brokula (oko 200g po izolaciji)
- Banana (1 komad po izolaciji)
- Tikvica (0,5-1 komad po izolaciji)

U svim slučajevima bit će potrebno dodati manji volumen vode u mikser-rezač za što bolju homogenizaciju/usitnjavanje materijala.

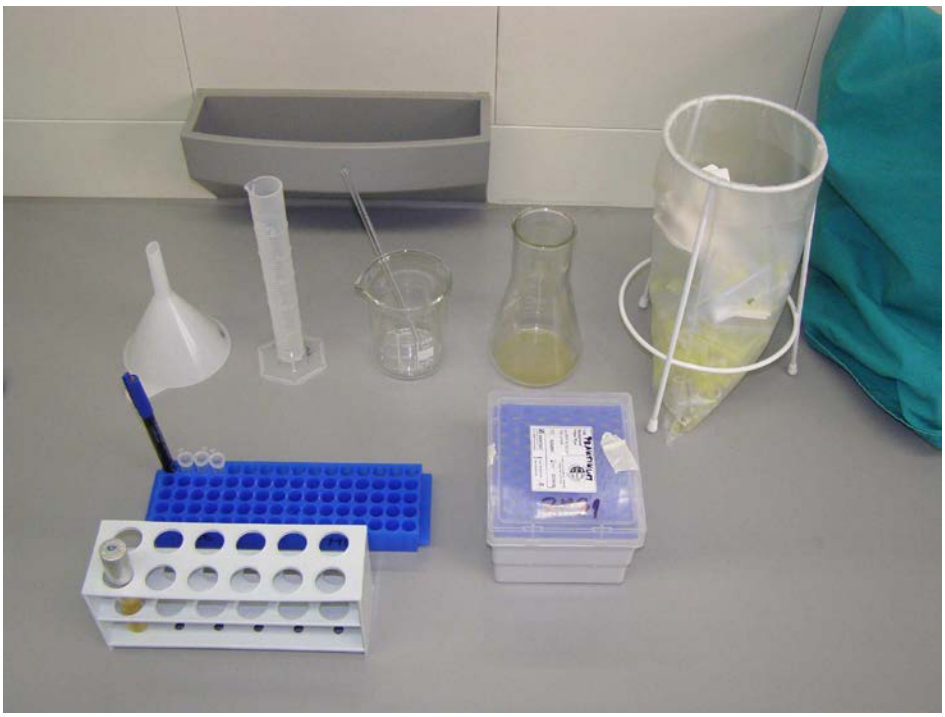
**Sastav «ekstrakcijske otopine» (pripremiti oko 150 ml):**

Vodovodna voda **:** sredstvo za pranje posuđa = 9 **:** 1 (tj. 10%v/v)
2 % kuhinjske soli (w/v)

**Postupak/protokol:**

- zagrijati vodenu kupelj na 60°C
- usitniti svoj materijal u mikseru-rezaču
- od svakog homogenata (usitnjenog materijala) dodati oko 50 ml u laboratorijsku čašu i nadopuniti s dvostrukim volumenom «ekstrakcijske otopine», inkubirajti suspenziju na 60 °C 15 min. uz povremeno miješanje staklenim štapićem
- profiltrirati suspenziju kroz filter za kavu (kroz 2 filtera) koristeći lijevak i sakupiti filtrat u staklenu epruvetu (potrebno je nešto manje od pola volumena koji stane u epruvetu); ostatak homogenata sačuvati
- kratko ohladiti filtrat na ledu te mikropipetom, dodati 1,75 ml soka od ananasa (*bromelin*) i inkubirati 10 min. na 36 °C (prirodni termostat)

- sada filtratu pažljivo dodati jednak volumen u zamrzivaču ohlađenog 96%-tnog etanola (polako niz stijenku epruvete; faze se ne smiju pomiješati!)
- odložiti staklenu epruvetu na led (cca 5') kako bi se pospješila precipitacija/ (taloženje) DNA
- precipitiranu DNA pomoću mikropipete (plavi plastični nastavak) prenjeti u malu plastičnu epruvetu od 1,5 ml («ependorficu/epicu»).
- centrifugiranjem (maksimalana brzina, 5 min.) istaložiti DNA na dno epruvete, mikropipetom ukloniti suvišni etanol, osušiti talog u digestoru te otopiti u 30 µl TE pufera (10mM **T**ris-HCl, pH 7.5; 1mM **E**DTA; Tris = tris(hidroksimetil) aminometan pufer; EDTA=etilendiamintetraoctena kiselina, helator metalnih iona)
- dodati 3 µl „Sybr safe“ boje i provjeriti kvalitetu izolirane DNA na transiluminatoru



**Slika 11.2.** Laboratorijsko suđe i oprema potrebna za izolaciju DNA

## ZADACI:

1. Objasnite koja je svrha navedenih koraka u izolaciji DNA metodom „uradi sam“:

   a) Usitnjavanje u mikseru:

   b) Deterdžent:

   c) Kuhinjska sol:

   d) Etanol

2. Koja je osnovna razlika u djelovanju povišene temperature (60 ºC) i proteaze *bromelina* na proteine u postupku izolacije DNA metodom „uradi sam“?

3. Nacrtajte što vidite u staklenoj epruveti nakon dodavanja etanola i inkubacije na ledu. Označite tekuće faze i položaj DNA.

4. Zbog čega DNA otapamo u TE puferu, a ne u vodi?

5. Biste li uspjeli izolirati DNA da ste dodali manje/više soli i deterdženta u ekstrakcijsku otopinu?

## 12. IZOLACIJA GENOMSKE DNA IZ TRANSGENIČNE BILJKE *Arabidopsis thaliana* TE PLAZMIDNE DNA IZ LABORATORIJSKOG SOJA BAKTERIJE *Escherichia coli*

Nakon što ste u prethodnoj vježbi naučili kako izolirati DNA iz voća i povrća na vrlo jednostavan način, u ovoj vježbi vaš je zadatak izolirati DNA, koristeći nešto složenije laboratorijske metode, iz organizmima *Escherichia coli* i *Arabidopsis thaliana*. Također, definirat ćemo nekoliko novih pojmova: transgena biljka, transgen, plazmid, transformacija, vektor.
Laboratorijski soj *E. coli* s plazmidom ćete dobiti u tekućoj prekonoćnoj kulturi. Zadatak svake od 4 grupe biti će izolacija tog plazmida. Što je plazmid? Plazmid je autonomna (samostalna), replicirajuća, ekstrakromosomalna (izvan kromosoma), kružna molekula DNA koja se nalazi u bakterijskoj citoplazmi odvojeno od bakterijskog genoma (koji je također kružna molekula DNA, ali puno veća). Plazmidi, kao i bakterijska DNA (bakterijski kromosom) sadrže gene. Geni na plazmidu nemaju utjecaj na rast i preživljavanje bakterije u normalnim uvjetima. Međutim, u uvjetima selektivnog pritiska plazmidi omogućuju preživljavanje bakterija koje ih posjeduju. Tako npr. plazmidi mogu nositi gene za rezistenciju na teške metale i/ili antibiotike, gene odgovorne za bakterijsku virulenciju, gene koji omogućuju razgradnju različitih kompleksnih spojeva ili gene koji omogućuju konjugaciju. Neki plazmidi se mogu ugraditi u bakterijski kromosom. Modifikacijom prirodnih plazmida dobiveni su "umjetni" plazmidi koji se koriste u tehnologiji rekombinantne DNA tj. kloniranja. U tom kontekstu takvi plazmidi često se nazivaju vektorima. U vektor se ugrađuje sekvenca DNA (slijed nukleotida) koja nam je interesantna, a obično se radi o genu za neko svojstvo. Stanice *E. coli* služe nam kao "tvornice" vektora jer se tijekom svake bakterijske diobe dijele i plazmidi/vektori te raspodjeljuju u stanice kćeri. Izoliranim plazmidima može se manipulirati, što uključuje i njihovo prebacivanje u stanice druge organizme (biljke, životinje).

Sada dolazimo do vašeg drugog zadatka: izolacije genomske DNA iz biljke-modela *A. thaliana* (Slika 12.1.). Na raspolaganju će vam biti dvije biljne linije: linija divljeg tipa i transgena linija. Potonja u svom genomu sadrži isti gen koji se nalazi i na plazmidu kojeg ćete izolirati iz *E. coli*. U biljci, taj plazmid (točnije: samo jedan njegov odsječak) ugrađen je u genomsku DNA i ne postoji kao samostalan izvankromosomski element. Taj gen (i svaki drugi strani gen koji unosimo u neki organizam) nazivamo transgen, a proces njegova unošenja je transformacija (u slučaju biljnih stanica i bakterija) ili transfekcija (u slučaju animalnih stanica).

. Biljka koja nosi takve strane gene naziva se transgena biljka ili genetski modificirana biljka (GMO-genetski modificirani organizam). Dvije grupe studenata izolirat će DNA iz transgene linije *A. thaliana* (koja sadrži dio plazmidne/vektorske DNA), dok će druge dvije grupe izolirati DNA iz divljeg tipa *A. thaliana* (prirodne, nemodificirane linije).

U narednoj vježbi, trebat ćete pokazati da transgena linija *A. thaliana* sadrži istu sekvencu/odsječak DNA kao i plazmid kojeg ste izolirali iz *E. coli*, za razliku od prirodne linije/divljeg tipa koja ne bi smjela sadržavati tu sekvencu (jer ta linija nije bila transformirana).

**Slika 12.1.** Modelna biljka *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) u cvatu (2n=10). Veličina genoma ~ 120 Mb (oko 31100 gena)

## Praktičan rad

**1. Radne otopine/puferi (za izolaciju iz *E. coli*):**

- GTE pufer (50 mM glukoza, 25 mM Tris-Cl pH 8 i 10 mM EDTA, pH 8)
- otopina za lizu/otvaranje stanica (0,2M NaOH, 1 % SDS=natrijev dodecilsulfat=ionski deterdžent); ***pripremate je sami!***
- 3 M kalijev acetat ($CH_3COOK$), pH 5,2
- Izopropanol (2-propanol)
- 70 % etanol
- TE pufer, pH 7,5

**Postupak/protokol za izolaciju iz *E. coli* (tzv. *mini prep*):**

- ulijte 1,5 ml prekonoćne kulture *E. coli* u epicu i centrifugirajte 3 min. na 10 000 rpm (rotacija/okretaja po minuti)
- odlijte supernatant (SN) u Erlenmayer-ovu tikvicu (nipošto u sudoper; bakterije s kojima radite su transgeni organizmi/GMO), dodajte novih 1,5 ml prekonoćne kulture u istu mikroepruvetu pa ponovite korak centrifugiranja kao i prvi put

- u potpunosti odlijte SN koristeći mikropipetu i talogu stanica dodajte 0,2 ml GTE pufera, resuspendirajte talog pomoću mikropipete ili stalka za mikroepruvete (brzo prelazite vrhom epice preko otvora na stalku da postignete resuspenziju)
- pripremite 0,4 ml otopine za lizu stanica (na raspolaganju imate: 0,5 M NaOH i 10 % SDS i $dH_2O$), dodajte priređenu otopinu vašem uzorku i lagano promiješajte okrećući epicu polako više puta za 180°
- inkubirajte uzorak na ledu (najduže 4 min.) pa dodajte 0,3 ml 3M kalijevog acetata (3 M $CH_3COOK$= „KAc“)
- opet lagano promiješajte sadržaj epice okrećući je polako više puta za 180°
- inkubirajte epicu na ledu 5 min. pa centrifugirajte 5 min. na 13 000 rpm
- prebacite SN (oko 0,8 ml) u novu epicu, a staru epicu s talogom bacite
- SN-u iz prethodnog koraka dodajte 0,6 ml izopropanola i promiješajte pipetiranjem ili okretanjem za 180°
- inkubirajte uzorak na -20 °C 15 min. pa centrifigirajte 5 min. na 13 000 rpm
- pažljivo odlijte SN u Erlenmayer-ovu tikvicu
- talogu dodajte 0,5 ml 70%-tnog etanola i centrifugirajte 5 min. na 13 000 rpm
- uklonite sav etanol pomoću mikropipete i talog dobro osušite u digestoru
- otopite talog u 0,05 ml TE pufera, inkubirajte na 37 °C 10 min.
- pohranite vaše uzorke na -20 °C za sljedeću vježbu

**VAŽNO: supernatant (SN) nakon centrifugiranja bakterija odlijte u Erlenmeyer-ove tikvice. SN sadrži ostatke bakterijskih stanica koje ne biste smjeli širiti u okoliš. SN iz ostalih koraka također možete odlijevati u istu Erlenmeyer-icu, iako on više ne sadrži žive stanice. Kod biljne transgene linije nema razloga za brigu, budući da biljke koje ćete koristiti nisu u cvatu niti sadrže zrele sjemenke.**

**2. Polazni materijal i oprema (za izolaciju biljne DNA):**

- 2 linije modelne biljke *Arabidopsis thaliana* (transgena linija i divlji tip)
- prekonoćna kultura *E. coli* (stanice sadrže plazmid s transgenom)
- mikrocentrifuga
- tarionik i tučak
- Eppendorf mikroepruvete (1,5 ml)
- komplet pufera i otopina
- mikropipete i plastični nastavci
- Erlenmeyer-ove tikvice

**Radne otopine/puferi za izolaciju biljne DNA:**

- *Ekstrakcijski pufer:*
  200 mM Tris/HCl (pH 8)
  250 mM NaCl
  25 mM EDTA
  0,5 % SDS
- izopropanol (sinonimi: 2-propanol, izopropilni alkohol)
- 70 % etanol (etilni alkohol)
- TE pufer, pH 8

**Postupak/protokol za izolaciju biljne DNA:**

- na dno tarionika mikropipetom dodajte 450 µl ekstrakcijskog pufera
- pincetom otkinite 1 list vaše biljne linije i stavite ga u tarionik
- kružnim pokretima tučka što bolje usitnite biljni materijal
- miropipetom sakupite dobivenu zelenu suspenziju i prebacite je u mikroepruvetu od 1,5 ml pa centrifugirajte maksimalnom brzinom 5 min.
- mikropipetom uzmite 300 µl SN-a i prebacite ga u novu mikroepruvetu, a epruvetu s talogom bacite
- zelenoj suspenziji (SN) dodajte 300 µl izopropanola, promiješajte pipetiranjem, inkubirajte 15' na -20°C pa centrifugirajte maksimalnom brzinom 5 minuta
- supernatant (SN) bacite, a talogu dodajte 0,5 ml 70%-tnog etanola te centrifugirajte 5 min pri maksimalnoj brzini
- potpuno uklonite etanol mikropipetom i talog osušite u digestoru
- talog otopite u 100 µl TE pufera
- inkubirajte na 65 °C 10 min.
- pohranite vaše uzorke na -20 °C za sljedeću vježbu

**Izolacija <u>genomske</u> DNA iz transgene biljke *Arabidopsis thaliana* i <u>plazmidne</u> DNA iz laboratorijskog soja bakterije *Escherichia coli***

(4 grupe po 4 studenta)
<u>Svaka grupa na radnom mjestu ima:</u>
1 Erlenmeyer-icu (300 ml) za odlijevanje tekućina
1 kutiju žutih nastavaka
1 kutiju plavih nastavaka
1 kutija bijelih nastavaka
1 stalak za staklene epruvete s 1 epruvetom prekonoćne kulture *E. coli* i kompletom pufera
1 tarionik s tučkom
1 plavi stalak za epruvete s epicama
1 mali koš za tipseve/plastične nastavke

<u>Komplet pufera i otopina za izolaciju sadrži:</u>

**1. GTE**
50 mM glukoza
25 mM Tris-Cl pH 8
10 mM EDTA pH 8

**2. 0,5M NaOH**
**3. 10 % SDS**
**4. 3 M $CH_3COOK$, pH 5,2**
**5. Izopropanol (2-propanol)**
**6. 70 % etanol**

**7. TE pufer**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

**8. $dH_2O$**

**9. Ekstrakcijski pufer**

200 mM Tris/HCl (pH 8)
250 mM NaCl
25 mM EDTA
0,5 % SDS

Na kolicima se nalaze:
Vrećica s epicama
Biljni materijal (transgena linija i divlji tip)
Vrećice s plavim i žutim nastavcima

Krupna oprema:
Vodena kupelj
Mikrocentrifuga

## ZADACI:

1. Koja komponenta otopine za lizu otvara bakterijske stanice u postupku izolacije plazmida iz *E.coli* i zašto?

2. Što otvara biljne stanice u postupku izolacije genomske DNA? Objasnite.

3. U kojem koraku dolazi do precipitacije/taloženja plazmidne DNA? Zašto?

4. Što se događa s bakterijskom genomskom DNA nakon neutralizacije s $CH_3COOK$?

5. Nacrtajte bakterijsku stanicu *E. coli* s jednim vektorom (označite transgen) i bakterijskim genomom. Nacrtajte biljnu stanicu u čiji genom je ugrađen jedan transgen (2n=6, metafaza mitoze, pretpostavimo da se ugradnja transgena dogodila u $G_1$ fazi interfaze, obavezno označite sestrinske kromatide).

# 13. METODA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM (PCR), ELEKTROFOREZA DNA I RESTRIKCIJSKA ANALIZA DNA

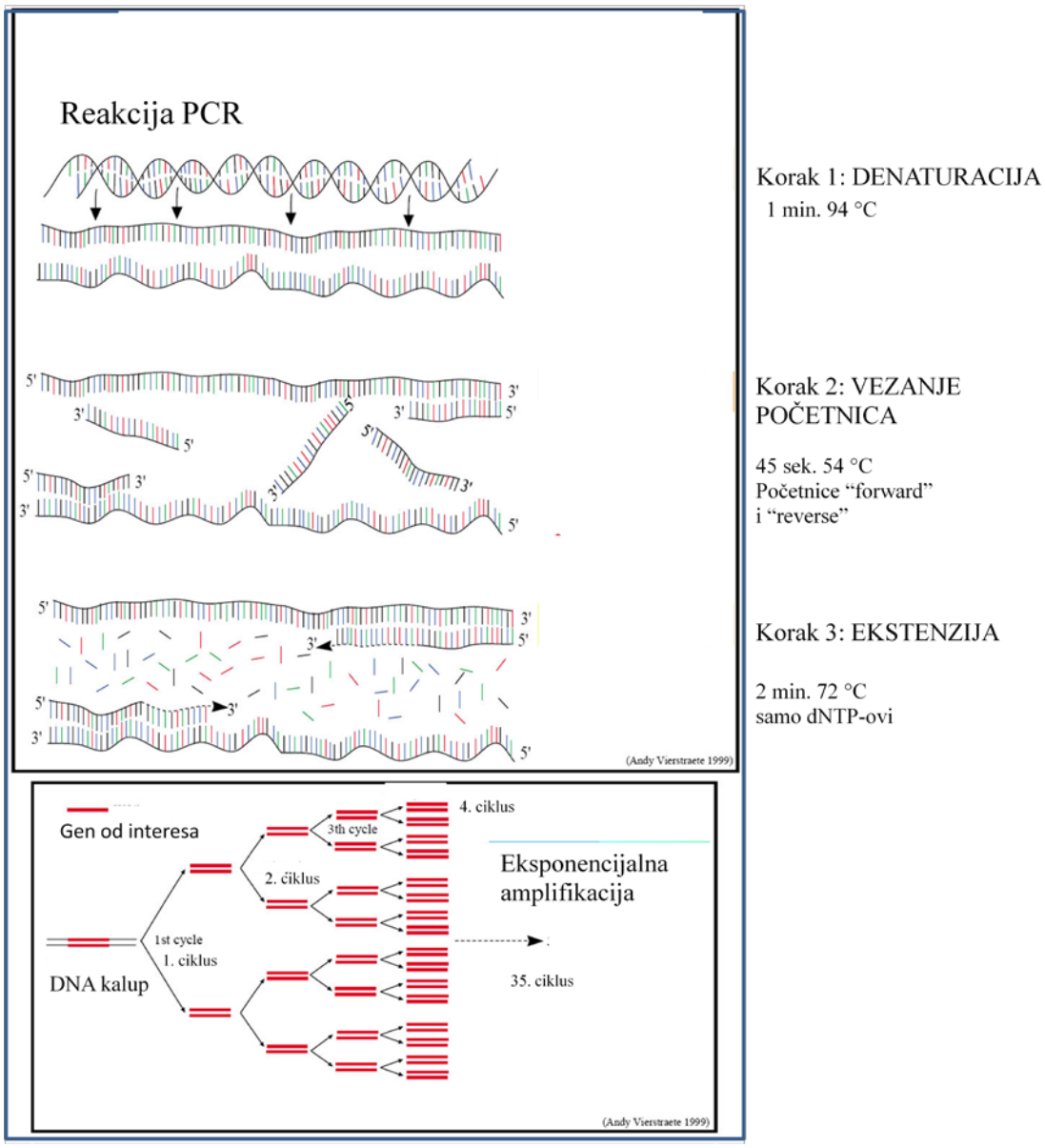
U prošloj vježbi izolirali ste plazmid/vektor iz bakterije *Escherichia coli*. Dio tog plazmida ugradio se pomoću bakterije *Agrobacterium tumefaciens* u genom biljke *Arabidopsis thaliana*. Također, izolirali ste genomsku DNA transgene biljke i divljeg tipa vrste *Arabidopsis thaliana*. Kako biste utvrdili da li je u biljni genom transgene linije zaista ugrađen dio plazmida iz *E.coli*, primjenit ćete tehniku PCR (PCR = Polimerase Chain Reaction = lančana reakcija *DNA* polimerazom). Koncept PCR-a smislio je (bio)kemičar Kary Mullis 70.-tih godina 20. stoljeća. Ideja je tehnički ostvarena sredinom 80.-tih i pokrenula je pravu revoluciju u molekularnoj biologiji. Kary Mullis je za svoju ideju 1993. dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Revolucionarnost PCR metode sastoji se u tome da od malenog broja početnih molekula DNA, tijekom nekoliko sati možete dobiti veliki broj identičnih kopija (DNA sekvence/slijeda koja vas zanima).

Za PCR su potrebne sljedeće komponente:

**(1)** DNA koju želite umnožiti (tzv. kalup),
**(2)** dvije tzv. začetnice/početnice/klice/engl. *primer* (tj. dva oligonukleotida od kojih je svaki komplementaran sa po jednim lancem DNA kalupa),
**(3)** četiri deoskiribonukleotida (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) kao "građevni blokovi" DNA
**4)** DNA polimeraza koja katalizira stvaranje kovalentne (fosfodiesterske) veze između fosfata i 3'-OH skupine deoksiriboze te tako povezuje nukleotide u DNA lanac.

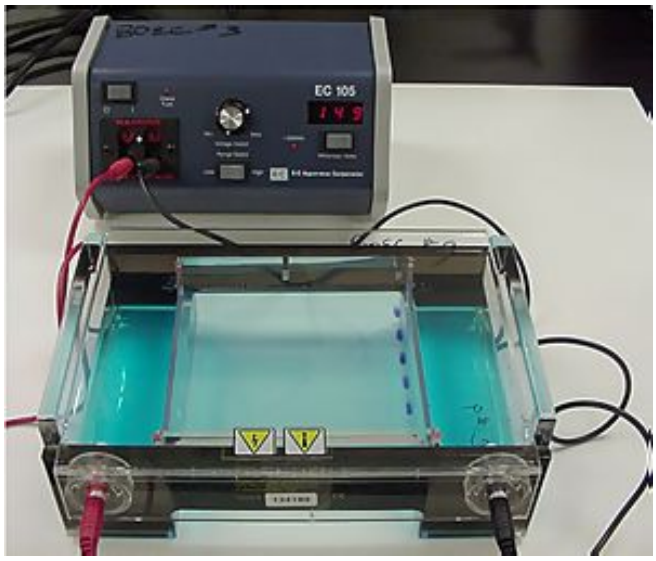
PCR reakcija se sastoji od 30-tak identičnih ciklusa (slika 13.1). Na kraju svakog ciklusa umnožavanja, broj molekula DNA udvostručen je u odnosu na prethodni ciklus (tzv. eksponencijalno umnažanje). Svaki ciklus sastoji se od tri uzastopna koraka u kojima se mijenja temperatura inkubacije svih prethodno spomenutih komponenti (1-4):

**(a)** *denaturacija* - na 95-95°C dolazi do denaturacije DNA kalupa (komplementarni lanci se odvajaju),
**(b)** *annealing/prianjanje* - temperatura inkubacije se spušta na 50-60°C pri čemu dolazi do vezanja početnica (oligonukleotida) na DNA kalup (svaka početnica se veže na samo jedan lanac),
**(c)** *sinteza novih lanaca* – na 72 °C termostabilna DNA polimeraza (najčešće iz termofilne bakterije *Termus aquaticus*) sintetizira novi lanac DNA počevši od mjesta hibridizacije/vezanja svake početnice. Nakon sinteze na 72°C, ponovo slijedi korak denaturacije **(a)** i proces se ponavlja željeni broj ciklusa/puta (obično 30-35).



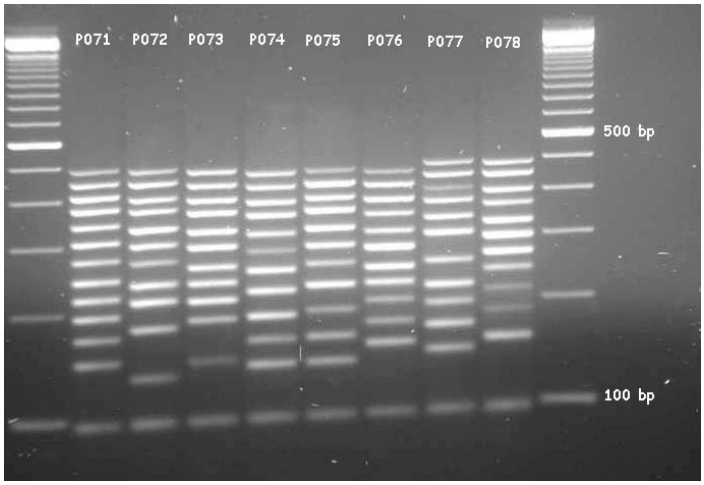

**Slika 13.1.** Reakcija PCR-a

Nakon PCR-a umnoženu DNA nanijet ćete na agarozni gel i u puferu je izložiti elekričnom polju. Taj postupak naziva se elektroforeza. Budući da je negativno nabijena,




**Slika 13.2.** Kadica za elektroforezu i uređaj za napajanje.

DNA u električnom polju putuje prema pozitivnoj elektrodi (anodi). Na tom putu molekule DNA različite dužine putuju različitim brzinama i na gelu se na kraju elektroforeze vide kao odvojeni *bend*-ovi/trake/fragmenti. Agaroza koja se koristi za izradu gela je prirodni linearni polimer polisaharida (na bazi galaktoze) koji se dobiva iz nekih vrsta crvenih algi. Dolazi u obliku bijelog praha koji se kuhanjem otapa u vodi. Tijekom postepenog hlađenja dolazi do uzajamnog povezivanja lanaca polimera vodikovim vezama te se formira gel s porama. Veličina pora gela ovisi o koncentraciji agaroze koja je obično od 0,1-3% (w/v). Gelovi s visokom koncentracijom agaroze bolje razlučuju/razdvajaju male/kratke molekule DNA, a gelovi s niskom koncentracijom agaroze bolje razdvajaju velike/dugačke molekule DNA. Elektroforeza se najčešće provodi u TAE (Tris-Acetate-EDTA) puferu koji je dobar elektrolit. Na slikama su prikazani: aparatura za elektroforezu s agaroznim gelom (slika 13.2.) i DNA fragmenti raznih veličina razdvojeni/razlučeni nakon elektroforeze na agaroznom gelu (13.3.).




**Slika 13.3.** Agarozni gel nakon elektroforeze. U krajnjoj lijevoj i desnoj stazi, vide se DNA markeri. Svaka staza sadrži nekoliko DNA *bend*-ova /traka/fragmenata.

## Praktičan rad

U ovoj vježbi vaš je zadatak pomoću PCR-a provjeriti da sadrži li transgena biljka iz prošle vježbe u svom genomu isti odsječak DNA prisutan i na plazmidu kojeg ste izolirali iz *E. coli*. Isto tako, trebate provjeriti da li biljka divljeg tipa zaista jest divlji tip, tj. da ne sadrži transgen. Nadalje, trebate iz plazmida pomoću restrikcijske endonukleaze EcoRI (Slika 13.4.) izrezati fragment koji sadrži transgen ugrađen u genom (transgene) biljke *A. thaliana*.

I konačno, trebate pripremiti gel, na njega nanijeti uzorke DNA (tri PCR reakcije i porezani plazmid s EcoRI), razdvojiti fragmente elektroforezom i vizualizirati DNA. Vizualizacija se radi pomoću boje *etidij bromida* (ili: „*syber safe*“) koja se ugrađuje između parova baza na DNA i pod UV svjetlom fluorescira narančasto-crveno. *Etidij bromid* slabo fluorescira ako nije vezan za DNA. Osim uzoraka, na gel ćete staviti i tzv. *DNA marker* (Slika 13.5.). Riječ je o mješavini DNA fragmenata poznate veličine koji putuju u gelu istovremeno s vašim uzorcima. Nakon elektroforeze ti fragmenti služe kao

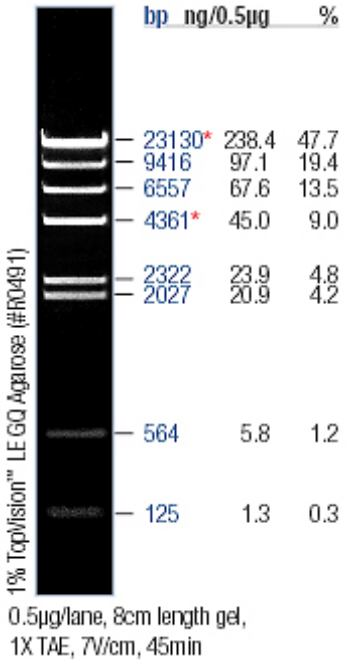
**Slika 13.4.** Sekvenca koju prepoznaje i reže restrikcijska endonukleaza EcoRI. Obratite pažlju da rezanje ostavlja 5' "stršeće" krajeve. Sekvence koje prepoznaju restrikcijski enzimi obično su palindromske tj. identične su na oba lanca ako se čitaju u istom smjeru.

standard za određivanje veličine fragmenata u vašem uzorku. Kao marker imat ćete DNA -faga porezanog s resrikcijskom endonukleazom *HindIII* .

**<u>Važno:</u> Etidij bromid je mutagen i kancerogen! Obavezan rad s rukavicama! S druge strane „*Syber Safe*“ je uglavnom bezopasan.**

**1. Polazni materijal i oprema za PCR:**

- PCR pufer (10x koncentriran)
- 25 mM $MgCl_2$




**Slika 13.5.** DNA marker (standard). Veličina fragmenata u parovima baza (pb) označena je s desne strane. Ispod fotografije gela navedeni su uvjeti u kojima je izvedena elektroforeza (1% agaroza, TAE pufer, napon 7V/cm, trajanje elektroforeze:45 min).

- 2 početnice (specifične za transgen)
- 2 mM dNTP otopina (2 mM svakog: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Taq (*<u>T</u>ermus <u>aq</u>uaticus*) DNA polimeraza
- DNA kalupi (plazmid, genomska DNA iz transgene i divljeg tipa biljke)
- $dH_2O$ (destilirana voda)
- PCR uređaj
- tri mikroepruvete za PCR po grupi (četiri grupe)
- mikrocentrifuga s adapterima za PCR *epice*

**Postupak/protokol za pripremanje PCR reakcijske otopine:**

- ukupni volumen svake PCR reakcije bit će 50 µl
- napravit ćete 3 PCR reakcije; svaku s po jednim DNA kalupom (*1.* plazmid, *2.* DNA transgene biljke i *3.* DNA divljeg tipa )

<u>U svaku reakciju dodati:</u>

- potrebnu količinu PCR pufera (razrijediti s 10x na 1x)
- $MgCl_2$, razrijediti do konačne koncentracije 2 mM
- 1 µl svake začetnice

- dNTP-ove, razrijediti do konačne koncentracije 0,2 mM
- 1 µl Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraza
- 5 µl kalupa
- $dH_2O$ do 50 µl

- staviti uzorke u PCR uređaj i pokrenuti program, tijekom vježbe promatrati tijek reakcije

**2. Polazni materijal i oprema za restrikcijsku analizu plazmida:**

- enzim/restrikcijska endonukleaza EcoR I
- pufer za EcoR I (10x koncentriran)
- plazmidna DNA iz prošle vježbe
- $dH_2O$
- termoblok/vodena kupelj/termostat na 37 °C

**Postupak/protokol za restrikcijsku analizu plazmida:**

- ukupni volumen reakcije bit će 50 µl

U svaku reakciju dodati:

- pufer za EcoR I (razrijediti ga s 10x na 1x)
- plazmidnu DNA (5 µl)
- 1 µl enzima EcoR I
- $dH_2O$ do 50 µl

- staviti reakcije na 37 °C 2-3 sata

**3. Polazni materijal i oprema za elektroforezu:**

- agaroza
- TAE pufer
- Erlenmeyer-ica
- kalup za izlijevanje gela s "češljem"
- kadica za elektroforezu
- *power-supply*/uređaj za napajanje
- vaga

**Postupak/protokol za izradu gela i provođenje elektroforeze:**

- otopiti agarozu (1% w/v) u 80 ml TAE pufera (u mikrovalnoj pećnici)
- kad se otopina agaroze ohladi na oko 60 °C, dodati etidij bromid ili „*syber safe*“ te izliti otopinu u kalup s "češljem"
- pričekati 20 min da agaroza polimerizira, pa gel staviti u kadicu za elektroforezu
- nanijeti uzorke PCR-a, restrikcijsku reakciju/digestiju plazmida i λ-marker u jažice gela
- započeti s elektroforezom na 50 V, a nakon 5 min. nastaviti na 80 V
- promatrati DNA na transiluminatoru (izvoru UV svjetla)

**PCR, elektroforeza i restrikcijska analiza DNA**

(4 grupe po 4 studenta)
Svaka grupa na radnom mjestu ima (Slika 13.6.)
1 kutiju žutih nastavaka
1 kutiju plavih nastavaka
1 kutija bijelih nastavaka
1 plavi stalak za mikroepruvete (1,5 ml) sa setom otopina i pufera za PCR i digestiju
1 mali koš za tipseve/plastične nastavke
1 bijeli stalak za PCR epice s 3 epice
1 marker (tanki)

Komplet pufera i otopina za PCR sadrži (držati na -20 °C):

**1. 10x PCR pufer**
**2. 25 mM $MgCl_2$**
**3. 2 mM dNTPs**
**4. 2 µM *primer*-i (*forward* i *reverse*)**
**5. Taq DNA polimeraza**
**6. $dH_2O$**

Komplet pufera i otopina za digestiju sadrži (držati na -20 °C):

**1. 10x pufer za *EcoRI***
**2. *EcoRI* enzim**

Na kolicima se nalaze:
Vrećica s epicama (1,5 ml)
Vrećice s plavim, žutim i bijelim nastavcima
Vrećica s PCR epicama

Krupna oprema i kemikalije:

PCR uređaj
Kadica za elektroforezu
Uređaj za napajanje (power supply)
Kalup za izlijevanje gela + 2 češlja
Steznik za kalup (umjesto selotejpa)
Erlenmeyer-ica za otapanje agaroze
1xTAE pufer
Agaroza
Sybr safe (držati na +4)+
Metalna špatula za agarozu
Mikrovalna pećnica
Transiluminator

Mikrocentrifuga s adapterima za PCR epice

**Slika 13.6.** Pribor za vježbu

## ZADACI:

**1.** Pretpostavimo da imate dva uzorka DNA. Jedan sadrži linearne DNA molekule, a drugi cirkularne/kružne DNA molekule (plazmid). Linearna DNA ima 10 restrikcijskih mjesta koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza EcoRI i 7 koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza HindIII, a kružna DNA 10 restrikcijskih mjesta koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza HindIII i 7 mjesta koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza EcoRI. Koliko fragmenata DNA ćete dobiti na gelu nakon inkubacije s EcoRI i HindIII u slučaju linearne, a koliko u slučaju kružne molekule DNA?

**2.** Pretpostavimo da nakon 7. ciklusa PCR reakcije imate sveukupno 512 molekula DNA i da je efikasnost amplifikacije/umnažanja u svakom cikllusu 100%. Koliko ste molekula DNA imali prije prvog ciklusa, koliko nakon 3., a koliko ćete ih imati prije 34. ciklusa? Sastavite jednadžbu koja povezuje eksponencijalno umnožavanje DNA, broj molekulna nakon *n* ciklusa i broj molekula na početku reakcije.

**3.** O čemu ovisi brzina putovanja molekula DNA u gelu tijekom elektroforeze? Objasnite.

a)

b)

c)

**4.** Nacrtajte gel s tri fragmenta DNA (svaki u svojoj jažici!) veličine 200, 450 i 1100 pb (pb=parova baza). Na gelu u prvoj (lijevoj) stazi nacrtajte DNA marker s 10 fragmenata (od 100 pb do 1000 pb, razlika u veličini fragmenata markera je 100 pb). Označite elektrode te smjer putovanja i veličinu fragmenata.

**5.** Dizajnirajte 2 *primer*-a, svaki dužine 6 nukleotida, koji će umožiti masno (**bold**) označeni fragment u navedenoj sekvenci. Obavezno označite 5' i 3' krajeve *primer*-a.

5'-gtgat**acatatgcgcacagaaaaaacagatacaccccagatacacagaggggctttta**atata-3'

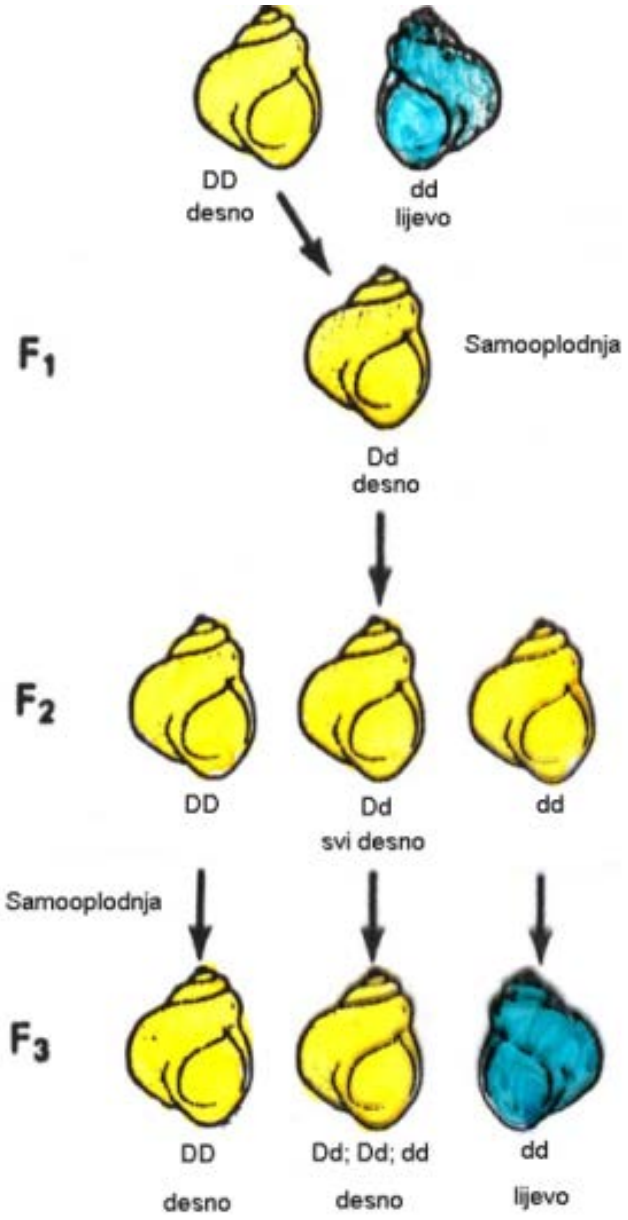
# 14. CITOPLAZMATSKO NASLJEĐIVANJE

Prijenos genetičkog materijala (DNA) ovisi o ponašanju kromosoma tijekom mitoze i mejoze, odnosno o mehanizmima prijenosa DNA u bakterija i virusa. Međutim, da bi se objasnila opažanja nasljeđivanja nekih svojstava bilo je potrebno određenu genetičku ulogu pripisati i citoplazmi. Citoplazmatsko nasljeđivanje pod kontrolom je gena koji se ne nalaze u jezgri (na kromosomima) već u citoplazmi (u DNA organela, plazmidnoj DNA, DNA infektivnih čestica). Nasljeđivanje citoplazmatskih gena ne podliježe zakonima Mendelovog nasljeđivanja. Također, utvrđeno je da na ekspresiju nekih nasljednih osobina može utjecati tzv. majčinski učinak. Majčinski učinak nastaje asimetričnim doprinosom ženskog roditelja razvoju zigote. Iako je doprinos muškog i ženskog roditelja jednak što se tiče jezgrinih (kromosomskih) gena (osim spolnih kromosoma), zigota u većini slučajeva od ženske gamete dobiva citoplazmu (s organelima ili produktima gena).

## Majčinski učinak

Primjer 1. Zavojitost kućice puža *Limnaea peregra*

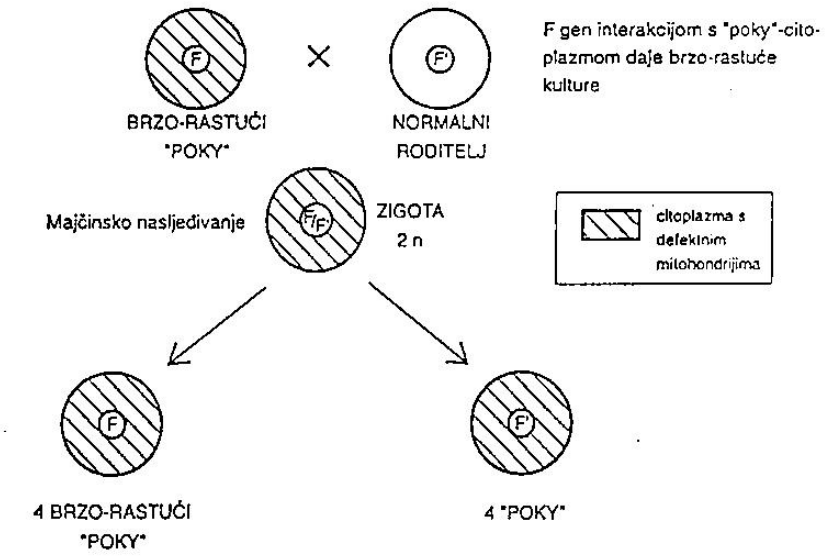
Zavojitost kućice u puževa može biti lijeva (sinistralna) ili desna (dekstralna), a određuje se držanjem puža apeksom prema gore i određivanjem smjera zavoja od otvora kućice. Smjer zavoja je određen parom jezgrinih gena $s^+$ (dominantnan alel) i s (recesivan alel). Međutim, promatranjem fenotipova potomaka recipročnih križanja (slika 14.1.) uočeno je da fenotip ponekad nije ekspresija određenog genotipa. Potomci u $F_1$ generaciji pokazivali su zavojitost koja je odgovarala zavojitosti kućice majke bez obzira na genotip potomka. Majčinski genotip odgovoran je za organizaciju citoplazme jajeta, tako da će, nakon oplodnje potomci biti ili desno zavijene kućice ili lijevo zavijene kućice bez obzira na genotip zigote. Ako ženski roditelj u genotipu ima dominantni gen $s^+$, svi puževi potomci će imati desno zavijene kućice. Genotip majke ss daje potomke sa lijevo zavijenim kućicama. Zavojitost zapravo ovisi o orijentaciji diobenog vretena u I mitozi zigote, a orijentacija vretena kontrolirana je genotipom oocite iz koje nastaje jaje. Potomci $F_2$ generacije su identični jer je i genotip majke u oba križanja identičan.




**Slika 14.1.** Nasljeđivanje zavojitosti kućice puža

Primjer 2. „Poky“ mutante gljive mješinarke *Neurospora crassa*

Mutante zvane „poky“ kod gljive *Neurospora* karakterizirane su sporim rastom zbog nepravilnosti u respiratornom enzimskom sustavu uslijed mutirane mtDNA, slično „petite“ mutantama kvasca (vidi dolje). „Poky“ svojstvo nasljeđuje se ženskim roditeljem. Kromosomski gen F u interakciji sa citoplazmom „poky“ mutante pomaže rastu „poky“ mutanata i proizvede brzo rastuću kulturu, „fast-poky“, iako je enzimski sustav još uvijek defektan (slika 14.2.). „Poky“ citoplazma nije trajno promijenjena kontaktom s F genotipom u zigoti.




**Slika 14.2.** Križanje mutante „fast-poky“ i normalnog roditelja

Gljiva će ponovo imati «poky» fenotip ako u genotipu ima, umjesto alela divljeg tipa, recesivni alel F'. Gen F nema fenotipsku ekspresiju u prisutnosti normalne citoplazme.

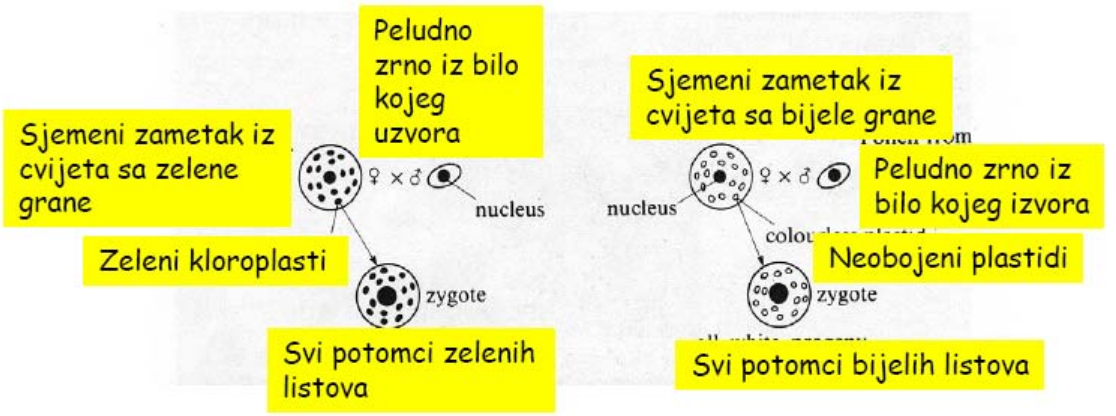
## Kloroplasti

Citoplazmatsko nasljeđivanje otkriveno je istraživanjem segregacije mutiranih kloroplastnih gena u biljaka. Kloroplasti sadrže vlastitu DNA (cpDNA) koja se razlikuje po nukleotidnom sastavu od jezgrine DNA. cpDNA je kružna, dvolan0čana molekula, veličinom i strukturom slična bakterijskoj DNA. cpDNA replicira se neovisno o jezgrinoj DNA, a također nosi informaciju za sintezu nekih plastidnih proteina važnih za strukturu i funkciju kloroplasta. Međutim, kloroplasti nisu potpuno neovisni o jezgri. Naime, većina njihovih proteina kodirana je genima smještenim u jezgri.

Primjer 3. Citoplazmatsko nasljeđivanje šarolikosti listova noćurka *Mirabilis jalapa*.

Nasljeđivanje šarolikosti listova noćurka pod kontrolom je gena u kloroplastima koji kontroliraju obojenost listova. Prilikom oplodnje ženski roditelj putem jajne stanice daje

zigoti i jezgru i citoplazmu (te u njoj i sve organelle uključujući plastide kloroplaste), dok muški roditelj daje samo jezgru. Biljke mogu imati zelene listove, šarolike listove i potpuno bijele listove. Šarolikost listova daju dva tipa kloroplasta – normalni zeleni i defektni koji ne mogu sintetizirati klorofil. Majčinski učinak manifestira se kroz gene na kloroplastima koji se nalaze u citoplazmi i nasljeđuju se od majke, bez obzira na fenotip muškog roditelja (pri oplodnji ulazi samo spermalna jezgra). Nakon samooplodnje biljke nastat će različiti potomci, ovisno o grani na kojoj su se nalazili ženski cvjetovi. Ako je zigota nastala oplodnjom iz jaja ženskog cvijeta koji se nalazio na bijeloj grani, svi potomci će biti bijeli. Razlog tome je što je zigota jajnom stanicom dobila citoplazmu koja je sadržavala defektne plastide (ne mogu sintetizirati klorofil, slika 14.3.).




**Slika 14.3.** Majčinsko nasljeđivanje boje listova.

Kod 2/3 viših biljaka kloroplasti porijeklom od muškog roditelja (peludno zrno) ne ulaze u zigotu (prijenos jezgre bez citoplazme). Stoga je nasljeđivanje kloroplasta primjer za majčinsko (citoplazmatsko) nasljeđivanje koje ne podliježe zakonima nasljeđivanja po Mendelu.

<u>Primjer 4.</u> Citoplazmatsko nasljeđivanje u alge roda *Chlamydomonas*

Normalne stanice alge roda *Chlamydomonas* ugibaju u prisustvu streptomicina, međutim mogu razviti rezistenciju rastom u malim koncentracijama streptomicina. *Chlamydomonas* nema spolova, ali ima tipove stanica $mt^+$ i $mt^-$, koji se mogu sparivati. Kad se stanice 2 različita tipa spoje, nastaje zigota, koja proizvodi 4 haploidne stanice (2 $mt^+$ i 2 mt). Rezistencija na antibiotik uvijek segregira s $mt^+$ roditeljem. $Mt^+$ roditelj donosi citoplazmu u zigotu, slično majčinskom nasljeđivanju u eukariota, dok se $mt^-$ roditelj ponaša kao muški roditelj i donosi samo jezgru, a ne i citoplazmu.

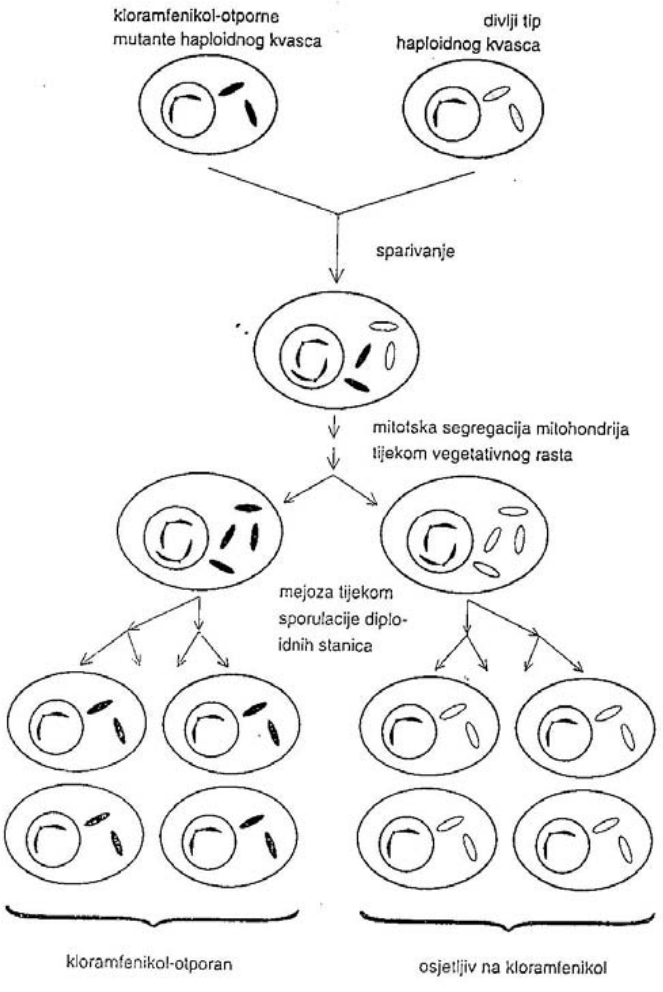
**Mitohondriji**

Sve žive stanice osim bakterija, cijanobakterija, te zrelih eritrocita imaju mitohondrije. To su mali organeli, centri aerobnog disanja, koji imaju vlastitu DNA (mtDNA). Dvolančana, kružna mtDNA se replicira neovisno o jezgrinoj DNA. mtDNA odgovorna je za sintezu samo mitohondrijskih proteina, dok su većina mt proteina pod kontrolom jezgrine DNA.

Nasljeđivanje svojstava vezanih uz funkciju mitohondrija (rast organizma, metabolizam ATP-a), primjer je citoplazmatskog nasljeđivanja. U kvasaca je nasljeđivanje mitohondrija biparentalno, dakle mitohondriji oba roditelja nalaze se u zigoti, dok se u sisavaca mitohondriji nasljeđuju isključivo citoplazmom jajne stanice, dakle od majke.

Primjer 5. Razlika u nasljeđivanju mitohondrijskih i jezgrinih gena kvasca.

Otpornost na antibiotike eritromicin i kloramfenikol kodirana je u genima mtDNA. Nasljeđivanje nije u skladu s Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Mitohondriji se nasljeđuju od oba roditelja (biparentalno), ali kroz opetovane, ponavljajuće diobe (mitotske) može doći do nastanka stanice sa samo jednim parentalnim tipom mitohondrija u citoplazmi, dok su jezgrini geni uvijek prisutni u omjeru 1:1. Nasljeđivanje mitohondrija ovisi o nasumičnoj segregaciji na početku mitoze (slika 14.4.).



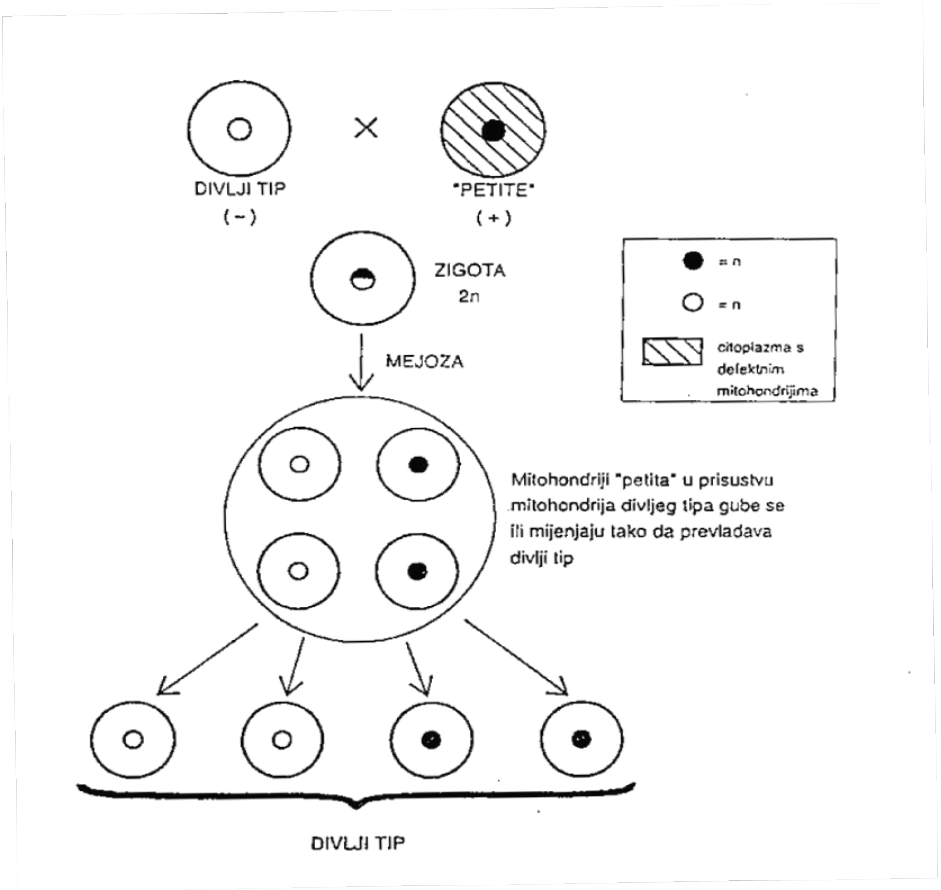

**Slika 14.4.** Nasljeđivanje otpornosti na antibiotike u kvasaca.

Primjer 6.

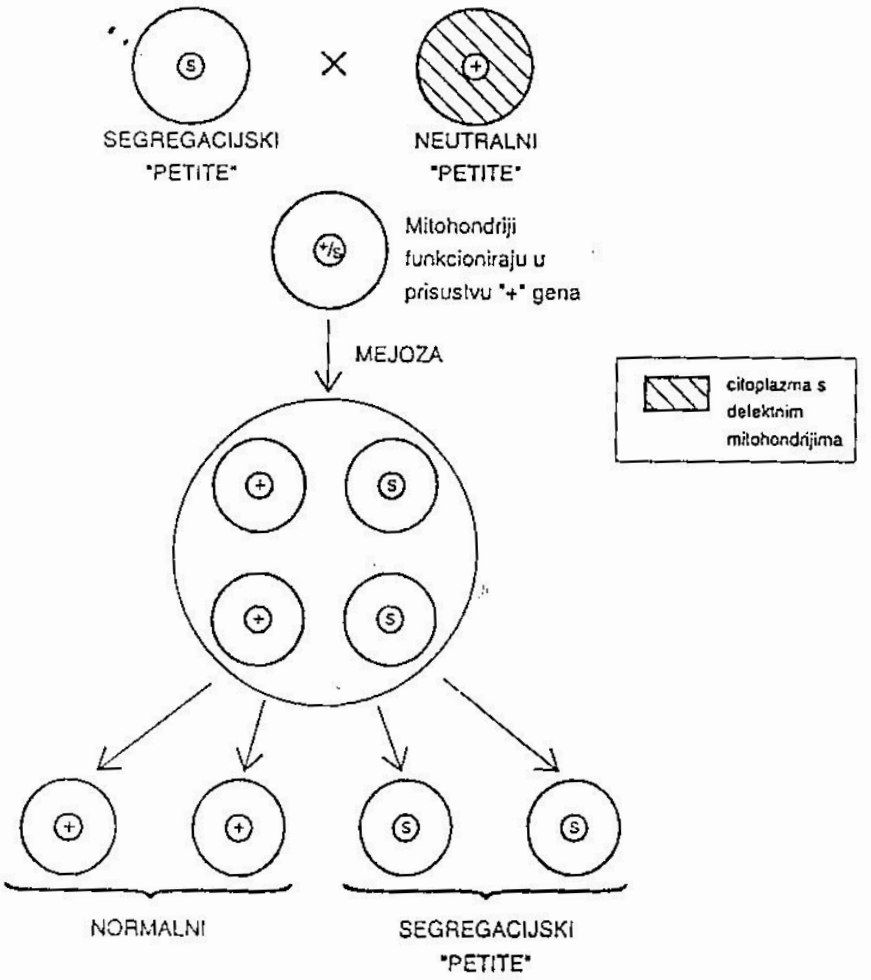
„Petite“ mutacija kod kvasca (*Saccharomyces*) je mutacija mtDNA koja je odgovorna za

promjenu nekih osobina stanica kvasca, a njezino nasljeđivanje nije u skladu s Mendelovim zakonima. „Petite“ mutante imaju promijenjeni fenotip, razlikuju se od divljeg tipa kvasca po veličini (male sitne kolonije) te u brzini rasta (sporo rastu). Mutante se razmnožavaju vegetativno (pupanjem) ali spore mogu dati tek ako se spolno razmnožavaju s divljim tipom kvasca. Kada su se mutante „petite“ spolno razmnožavale (sporulacija) s divljim tipom primijećena su tri različita tipa nasljeđivanja fenotipa.

1. „Segregacijski petite“ - omjer potomaka divljeg tipa i mutanti „petite“ je 1:1, što odgovara Mendelovom nasljeđivanju. Segregacijski „petite“ ima strukturno i funkcionalno normalne mitohondrije, ali ima recesivni alel na kromosomskom genu (genom kvasca) koji inhibira normalnu funkciju mitohondrija (aerobnu respiraciju) (slika 14.6.).
2. „Neutralni ili recesivni petite“ - svi potomci su divljeg tipa. Mutantni fenotip se više nikada ne ispoljava. Ovakvim križanjem svi potomci imaju normalne, funkcionalne mitohondrije koji mogu obavljati aerobnu respiraciju (slika 14.5.).
3. „Supresivni petite“ - skoro svi potomci „petite“ fenotipa. Defektni mitohondriji (delecija ili insercija velikog dijela mtDNA) mogu prevladati (opetovanim diobama) nad mt divljeg tipa ili pak mtDNA s mutacijom rekombinira s mtDNA divljeg tipa (tijekom fuzije dvaju mitohondrija) tako da novonastala rekombinantna mtDNA eksprimira promijenjeni fenotip.




**Slika 14.5.** Križanje divljeg tipa kvasca s „petite“ mutantom.




**Slika 14.6.** Križanje segregacijske i neutralne „petite“ mutante kvasca.

Primjer 7. Muška sterilnost u biljaka

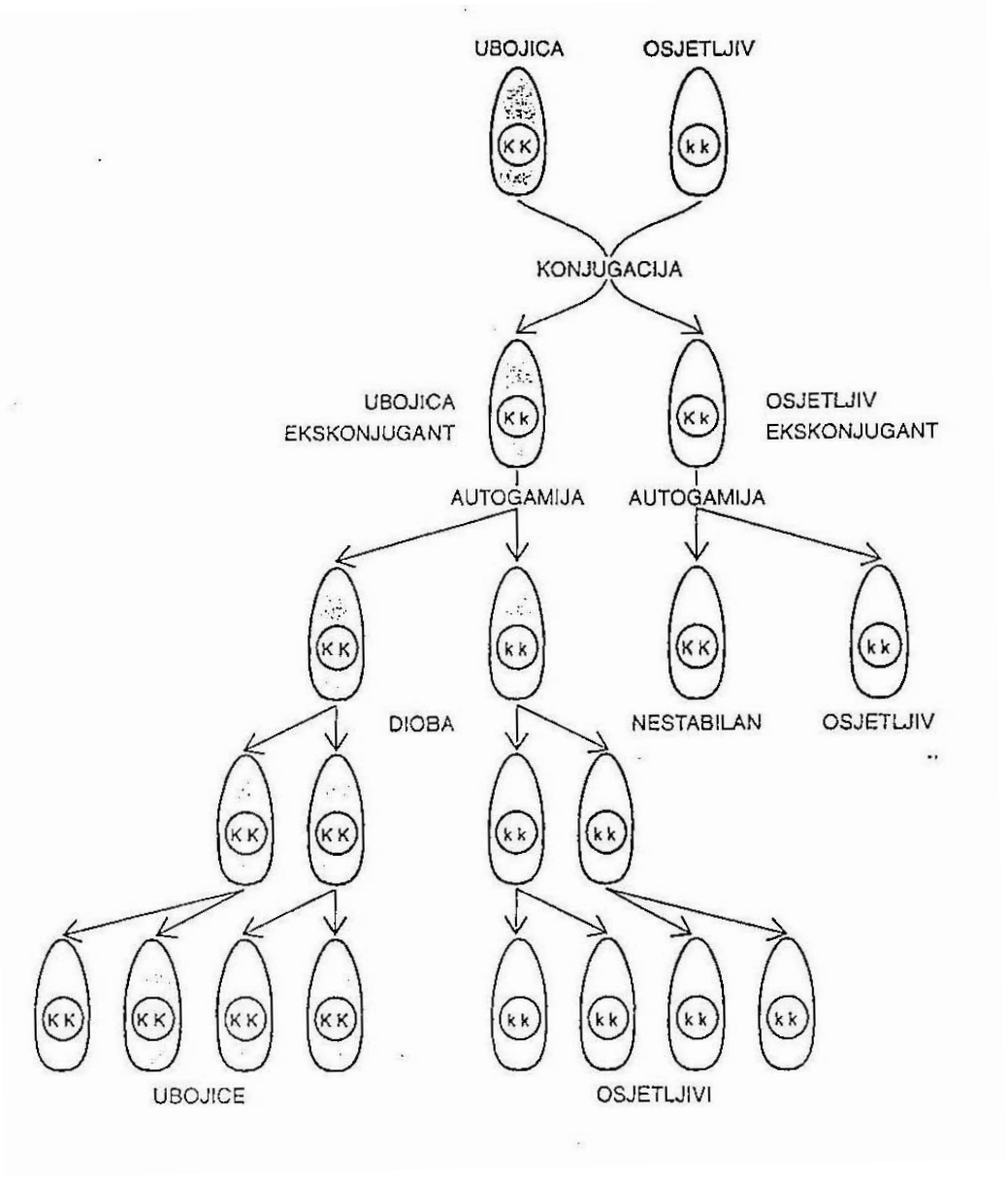
Nemogućnost stvaranja sjemena u biljaka može biti posljedica inkompatibilnosti ili sterilnosti. Sterilnost je uvjetovana nefunkcionalnim gametama, a uzrok tomu su kromosomske aberacije, mutacije gena ili utjecaj citoplazmatskih faktora. Poseban tip sterilnosti je muška sterilnost gdje je nefunkcionalnost muških gameta rezultat mutacije gena ili citoplazmatskih faktora ili pak međudjelovanja jezgre i citoplazme.

Citoplazmatska muška sterilnost ovisi o faktorima u citoplazmi. Biljke koje imaju određeni tip citoplazme (S=sterilan) su muški sterilne (ne stvaraju polen), ali takve biljke mogu dati sjeme ako je prisutan oprašivač. $F_1$ sjeme daje samo muški sterilne biljke budući da su preko majčinske gamete naslijedile citoplazmatske faktore za sterilnost. Citoplazmatska muška sterilnost ima prednost kod određenih ukrasnih vrsta, budući da biljke koje ne daju plod cvatu duže.

**„Infektivne čestice“**

Primjer 8. Kappa čestice u papučicama

1930. g. Sonneborn i suradnici pomiješali su dva soja papučice (*Paramecium aurelia*) i primijetili da su neke papučice ugibale, i to uvijek papučice istoga soja. Otkriveno je da ovi sojevi papučice izlučuju tvar koja ubija druge sojeve papučica. Tu su tvar nazvali paramecin, a kasnije je otkriveno da ona nije kodirana genima u jezgri papučice, već je proizvode čestice zvane kappa u citoplazmi nekih sojeva papučica. Kappa čestice su infektivni organizmi, slični bakterijama, koji su postigli visoki stupanj simbioze s domaćinom. Imaju DNA i RNA molekule, ali njihova prisutnost i preživljavanje u citoplazmi ovisi o genu u jezgri (K). Papučice mogu primiti kappa čestice samo iz okoliša (ili spolnim razmnožavanjem s papučicama koje već imaju kappa čestice), međutim ih ne mogu sintetizirati *de novo*. Sojevi




**Slika 14.7.** Križanje papučica genotipa KK i Kk.

papučice koji imaju kappa čestice u citoplazmi, a u genotipu barem jedan dominantni alel K

nazivaju se „killer“ sojevi ili „ubojice“. Sojevi koji nemaju kappa čestice su, bez obzira na genotip, „osjetljivi“ (engl. sensitive) (slika 14.7.).

**ZADACI:**

1. Većina sojeva alge *Chlamydomonas* osjetljiva je na antibiotik streptomicin. Pronađen je soj kojemu je za preživljavanje potreban streptomicin u podlozi ($str^d$; d-dependent, ovisan). Kako se može utvrditi da li je streptomicin-ovisnost pod kontrolom gena u jezgri ili citoplazmatskih faktora?

2. Odredite genotip i fenotip potomaka sljedećih križanja u gljive mješinarke *Neurospora crassa*:
   - „fast poky“ mužjak x normalna ženka genotipa F'
   - „poky“ ženka x „fast-poky“ mužjak
   - „fast poky“ ženka x „poky“ mužjak

3. Dobili ste sjeme muški sterilne linije kukuruza. Kako biste utvrdili da li se radi o genskoj ili citoplazmatskoj sterilnosti?

4. Odredite fenotip papučice (ubojica, senzitivan, nestabilan) kod sljedećih kombinacija genotipa i citoplazmatskog stanja.

| Genotip | Citoplazma |
|---|---|
| KK | kappa |
| Kk | - |
| kk | kappa |
| KK | - |
| Kk | kappa |
| Kk | - |

5. Homozigotni dekstralni puž oplođen je spermom homozigotnog sinistralnog puža. Heterozigotna $F_1$ generacija prolazi kroz 2 generacije samooplodnje. Kakvi su fenotipovi roditelja? Prikaži fenotip, genotip i očekivani omjer roditelja, $F_1$ i dviju generacija samooplodnje ($F_2$, $F_3$).

6. Dvije papučice ubojice genotipa KK x Kk konjugiraju uz izmjenu kappa čestica. Kojeg su fenotipa i genotipa ex-konjuganti. Prikažite to križanje!

7. Koji rezultati se mogu očekivati među potomstvom kad se križaju neutralni i segregacijski petit.

8. Ako je ženski roditelj „fast-poky“, a muški roditelj divljeg fenotipa, predvidi genotipove i fenotipove nastalih askospora.

## 15. POPULACIJSKA GENETIKA

Procesi nasljeđivanja mogu se proučavati i na razini populacije. **Populacija** je grupa jedinki iste vrste koja živi na određenom području i čije jedinke aktivno razmjenjuju genetički materijal dajući plodno potomstvo. Kada svaki član populacije ima jednaku mogućnost da se pari s bilo kojim drugim članom populacije znači da unutar populacije dolazi do slučajnog parenja jedinki (**panmiksije**). Svi geni koji se nalaze u gametskom fondu populacije čine **gensku zalihu** („gene pool“) ili populacijski skup gena.

**Populacijska genetika** daje modele i analitičke procjene kojima možemo izmjeriti genetički sastav neke populacije te ga izraziti u kvantitativnom obliku baziranom na matematičkoj analizi. Predmet proučavanja populacijske genetike je genetička struktura populacije. Genetičku strukturu populacije određuje učestalost određenih svojstava, odnosno gena i genotipova. **Učestalost genotipova** je relativni omjer različitih genotipova u populaciji. Relativni omjer alela (gena) u populaciji je **učestalost alela (gena)**. Učestalost gena i genotipova populacije značajna su svojstva koja genetičar može procijeniti i promatrati promjene ovih svojstava unutar određene populacije.

**Primjer**: krvne grupe MN u čovjeka.

U nekom uzorku od 730 australijskih domorodaca krvne grupe MN sustava javljaju se s različitom učestalošću:

| genotip | MM | MN | NN |
|---|---|---|---|
| broj osoba | 22 | 220 | 488 |
| učestalost genotipova (%) | 3 | 30,1 | 66,9 |

Način na koji se računa učestalost alela je sljedeći:

| genotip | MM | MN | NN |
|---|---|---|---|
| broj genotipova | 22 | 220 | 488 |
| broj M alela | 2x22 + 220 | | |
| broj N alela | | 220 + 2x488 | |
| ukupan broj alela | 44 + 440 + 976 | | |

učestalost alela M = ?
učestalost alela N = ?

Učestalost gena i genotipova ostaje ista tijekom niza generacija. Razlog tomu je binarna priroda nasljeđivanja, jer se prilikom oplodnje aleli slučajno kombiniraju u parove u diploidnoj zigoti. Ako promatramo par alela (A i a), tada će učestalost gameta koje će nositi alel A ili a ovisiti o učestalosti genotipova roditeljske generacije. Kada se parenje među članovima populacije odvija potpuno slučajno, tada se očekivana učestalost zigota u sljedećoj generaciji može predvidjeti ako je poznata učestalost alela u genskoj zalihi roditeljske generacije.

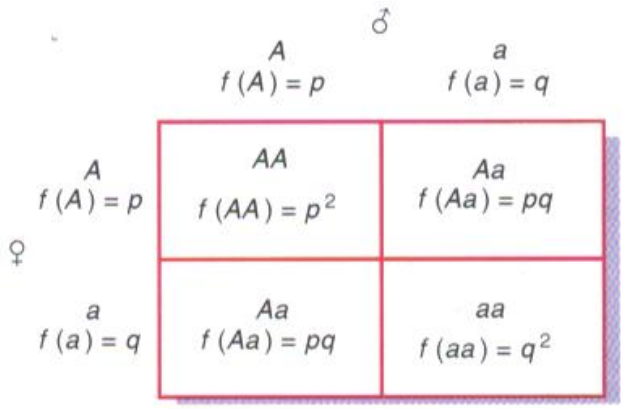
Na primjer: ako je učestalost alela A = 0,6, a alela a = 0,4, njihovom kombinacijom uvijek se dobije ista učestalost genotipova:

AA = 0,36 (0,6 x 0,6)
Aa = 0,48 (0,6 x 0,4)
aa = 0,16 (0,4 x 0,4)

Engleski matematičar G.H. Hardy i njemački genetičar W. Weinberg otkrili su neovisno jedan o drugome 1908. godine pravilo o konstantnoj učestalosti gena i genotipova u populaciji koja je u ravnoteži (**Hardy-Weinbergov zakon**).

Ako pretpostavimo da je p – učestalost alela A, a q – učestalost alela a, slobodnim kombiniranjem gameta koje sadrže te alele nastaje nova generacija genotipova: AA ($p^2$) – dominantni homozigoti; Aa (pq) – heterozigoti; aa ($q^2$) – recesivni homozigoti. Ako je ukupna učestalost oba alela 100% ili 1 (što znači: p + q = 1), tada se omjeri genotipova mogu izraziti binomnom jednadžbom (slika 15.1.):

p+q = 1 – učestalost alela u populaciji
$(p+q)^2 = 1$ – učestalost genotipova u populaciji
$\{p(A) + q(a)\}^2 = p^2 (AA) + 2 pq (Aa) + q^2 (aa)$ Hardy-Winbergova jednadžba




**Slika 15.1.** Stvaranje zigota konceptom genske zalihe. Mužjaci i ženke imaju jednaku učestalost 2 alela: f(A) = p i f(a) = q. Nakon jedne generacije slučajnog sparivanja, 3 genotipa, AA, Aa i aa, imaju učestalost $p^2$, 2pq i $q^2$.

Primjena Hardy-Weinbergove jednadžbe:

1. testiranje učestalosti genotipova,
2. utvrđivanje učestalosti gena i raspodjele genotipova u slučaju dominacije kada ne možemo fenotipski razlikovati homozigota od heterozigota,
3. izrada „modela“ - da se utvrdi kako se učestalost gena i genotipova mijenja u odnosu na određene vidove selekcije.

Navedeno pravilo vrijedi samo za populacije koje su u genetičkoj ravnoteži. Kako bi populacija ostala u genetičkoj ravnoteži mora biti zadovoljeno nekoliko uvjeta:

1. populacija je beskonačno velika i dolazi do slučajnog sparivanja (panmiksija),
2. nema selekcije; tj. svaki genotip može preživjeti kao bilo koji drugi i svaki je genotip jednako efikasan u produkciji potomaka,
3. populacija je zatvorena, tj. nema imigracija iz drugih populacija, odnosno emigracija u druge populacije,
4. nema mutacija iz jednog alelnog stanja u drugo, mutacije su dozvoljene ako su reverzibilne, tj. ako ***A*** mutira u ***a*** jednakom frekvencijom kao i ***a*** u ***A***,
5. mejoza je normalna i slučaj je jedini operativni faktor u gametogenezi.

Do poremećaja genetičke ravnoteže može doći uslijed odsustva panmiksije, te pojave mutacija, migracija, genetičkog drifta i prirodne selekcije. Ako do poremećaja u ravnoteži dođe, jedna generacija slučajnog sparivanja dovoljna je kako bi se genetička ravnoteža uspostavila i od tada će populacija ponovo biti uravnotežena (nepromjenjive gametske i zigotske učestalosti) sve dok su zadovoljeni uvjeti Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Hardy-Weinbergova jednadžba u slučaju multiplih alela:

$$p + q + r = 1$$

$$p^2 + 2\,pq + 2\,pr + q^2 + 2\,qr + r^2 = 1$$

**Varijabilnost kvantitativnih svojstava**

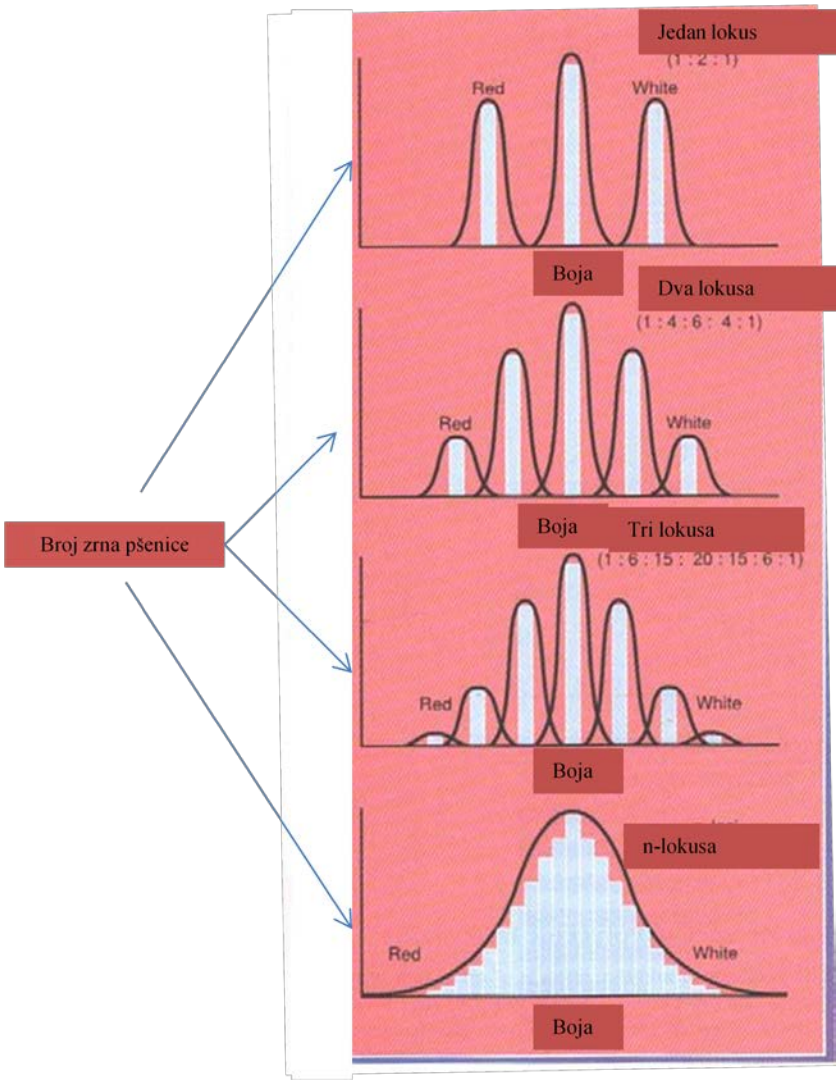
Genetičku strukturu jedne populacije možemo analizirati proučavanjem različitih svojstava, bilo da se radi o kvantitativnim (poligenskim) svojstvima ili kvalitativnim (mono- ili oligogenskim) svojstvima.

Svojstva koja smo do sada proučavali u klasičnom Mendelovom smislu su **kvalitativna** svojstva s diskontinuiranom varijabilnošću, koja se mogu lako svrstati u različite fenotipske kategorije. To su svojstva koja su pod kontrolom jednog ili malog broja genskih lokusa s po 2 alela, te s malim ili nikakvim utjecajem okoline na ekspresiju gena (fenotip). Svaki od 2 alela jako doprinosi fenotipu, a sama razlika između fenotipova je **diskontinuirana** varijabilnost (1, 2 ili 3 fenotipske klase). Geni koji određuju kvalitativna svojstva imaju očit utjecaj na fenotip, te lako uočavamo njihove mutacije.

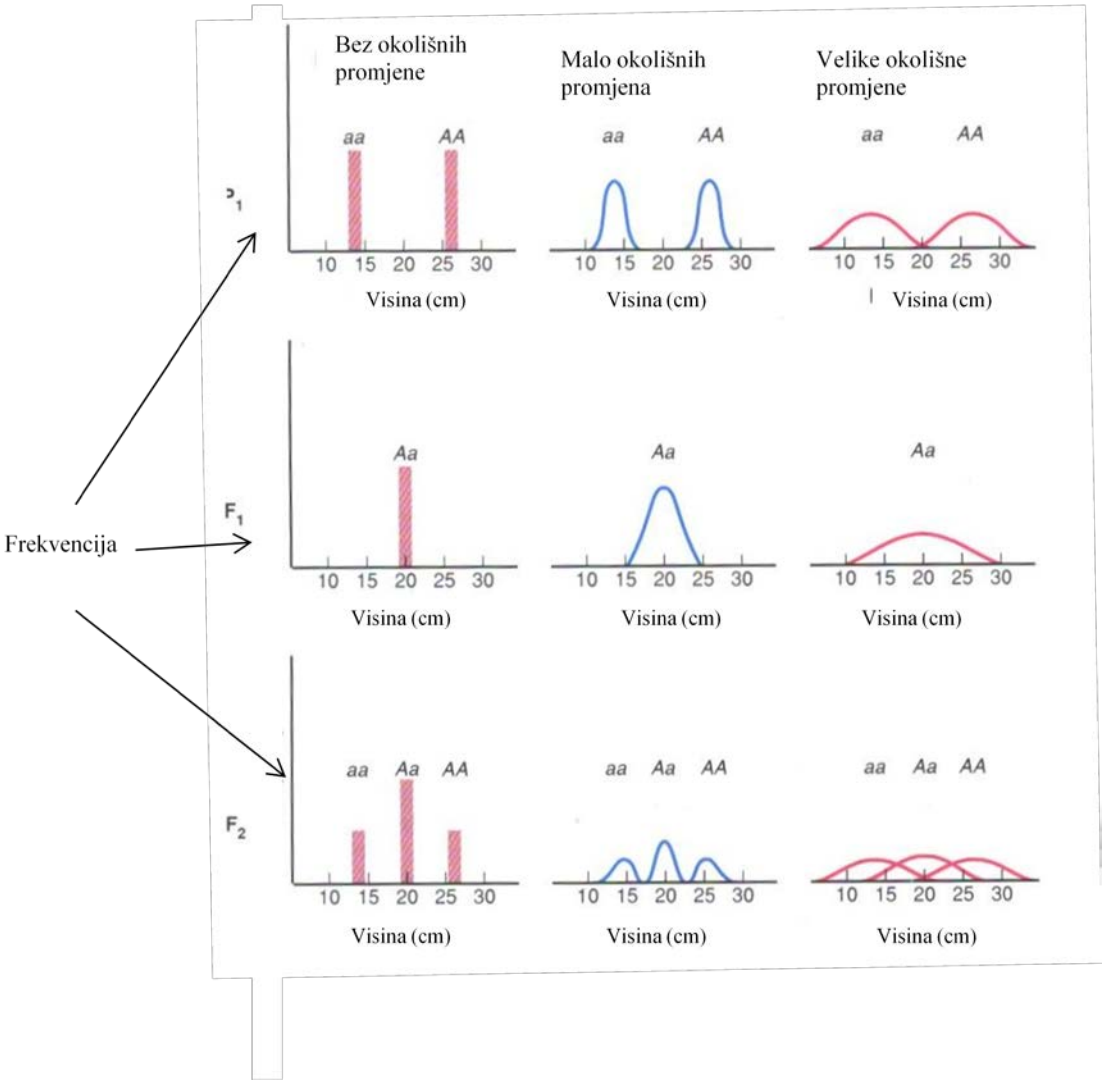
Nasuprot tome, veliki broj svojstava koja su ekonomski značajna za čovjeka (npr. prirast težine tijela, veličina stabljike, prinos zrna po hektaru i dr.) su **kvantitativna** svojstva s kontinuiranom varijabilnošću. Ta su svojstva pod kontrolom velikog broja gena (10 – 100), a svaki gen određuje tako mali dio fenotipa da njihov pojedinačni utjecaj ne može biti otkriven klasičnim Mendelovim metodama. Fenotipska varijabilnost kvantitativnih svojstava značajno ovisi o utjecaju okoline.

Ako 2 gena kontroliraju neku osobinu s jednakim udjelom (svaki sa 2 alela koji nisu u odnosu potpune dominacije) u $F_2$ generaciji dobit ćemo omjer 1:4:6:4:1. S nekim izraženim okolišnim varijacijama, te će se fenotipske klase preklapati fenotipski. Ovakva varijacija fenotipa je **kontinuirana** (slika 15.2.) jer je svaki intermedijarni fenotip moguć. S još više gena i okolišnih varijacija klasa svakog genotipa će se pretvoriti u zasebni fenotip. Ovakve osobine su

kvantitativne jer svaka jedinka u populaciji mora biti zasebno izmjerena. Okolišni uvjeti mogu uzrokovati varijacije unutar svakog genotipa (slika 15.3). Npr. dvije jedinke istog genotipa za boju očiju ne moraju imati istu boju očiju jer na fenotip utječu mnogi okolišni uvjeti (ishrana, fiziologija i dr.) Kod ljudi su djeca obično visine svojih roditelja, ali slabo hranjena djeca će biti niža od dobro hranjene djece. Rast u visinu je limitiran s uvjetima prehrane (ispod genetskog kapaciteta).




**Slika 15.2.** Promjena oblika distribucije fenotipskih klasa u populaciji povećanjem broja lokusa koji određuju boju zrna u pšenice. Ako je svaki lokus predstavljen s 2 alela koji segregiraju, u $F_2$ generaciji dobit ćemo kontinuiranu distribuciju različitih fenotipova.




**Slika 15.3.** Utjecaj okoliša na fenotipsku distribuciju (visina).

Analiza genetičke strukture i varijabilnosti populacija radi se i proučavanjem specifične učestalosti određenih tipova kromosoma i biokemijskih svojstava jedinki u populaciji. U prvom slučaju citogenetičkim se metodama utvrđuje učestalost javljanja određene grupe gena u odnosu na njihov redoslijed na određenom kromosomu. Takva grupa gena može se proučavati preko strukturnih promjena kromosoma kao što su inverzije i translokacije. Značajni podaci o genetičkoj strukturi i varijabilnosti populacija mogu se dobiti i proučavanjem varijabilnosti biokemijskih svojstava. Biokemijskom analizom proteinskih produkata koji grade enzime i kontroliraju specifične metaboličke procese u organizmu, određuje se polimorfnost gena te promjene u genskoj strukturi. Za proučavanje polimorfizma genskih lokusa koriste se metode kromatografije, lančane reakcije polimerazom (PCR-a) i elektroforeze.

**Određivanje genetičke varijabilnosti kvantitativnih svojstava**

Kvantitativna svojstva jedinki mogu varirati na različite načine, što može poslužiti kao osnova za određivanje genetičkih razlika među populacijama. Svrstavajući jedinke svake od

ispitivanih populacija u odgovarajuće veličinske kategorije (razrede) (npr. po visini, duljini, težini i dr.) dobit ćemo specifičan raspored tih jedinki na tzv. **varijacijskom poligonu** ili **krivulji**.
Nakon mjerenja i unošenja podataka u koordinatni sustav može se uočiti da su srednje vrijednosti nekog svojstva najučestalije, dok su krajnje vrijednosti sve rjeđe. Što je veći broj uzoraka to se poligon više približava varijacijskoj krivulji. Normalna varijacijska krivulja (Gaussova krivulja) je simetrična, no u praksi su češće nesimetrične krivulje. Korisno je izračunati **srednju vrijednost varijabilnosti**, budući da se ona ne poklapa uvijek s najučestalijom vrijednosti.

$$X = \sum(f \times X) / \sum F$$

f – broj jedinki pojedinih varijanata
X – vrijednost pojedinih varijanata
F – broj različitih varijanata

Uz srednju vrijednost varijabilnosti izračunava se i **standardna devijacija**. Ta veličina označava stupanj koncentracije ostalih varijanata oko srednje ili modalne varijante. To je tzv. **raspršenost varijacija**.

$$s = \sqrt{\sum(X-X)^2} / \sqrt{F} - 1$$

Budući da je svako mjerenje varijabilnosti samo slučajan izbor određenog broja jedinki iz neke populacije, nikada nema apsolutne vrijednosti varijabilnosti. To bismo dobili samo kada bismo ispitali sve jedinke određene vrste. Zbog toga je neophodno izračunati **srednju pogrešku srednje vrijednosti**.

$$S = s / \sqrt{f}$$

s – standardna devijacija
f – broj ispitanih jedinki

Srednja vrijednost varijabilnosti ne smije biti manja od trostruke srednje pogreške da bi se zaključci mogli smatrati ispravnima.

## ZADACI:

1. Sposobnost uzdužnog savijanja jezika je dominantno svojstvo (T), a nesposobnost je recesivno (t). U uzorku školskih učenika bilo je 490 sposobnih za savijanje jezika i 210 s nemogućnošću savijanja jezika. Izračunajte učestalost alela T i t. Primijenite Hardy-Weinbergovu jednadžbu i izračunajte učestalost genotipova.

2. Boju krzna mačke određuje par kodominantnih X-vezanih alela koji daju slijedeće fenotipove: $C^BC^B$ – crno krzno; $C^YC^Y$ – žuto krzno; $C^BC^Y$ – «calico» krzno (mješavina crnog i žutog). Istraživanje populacije mačaka u Rimu pokazalo je sljedeće:

| | crno | žuto | calico | ukupno |
|---|---|---|---|---|
| ženke | 554 | 14 | 108 | 676 |
| mužjaci | 622 | 84 | 0 | 706 |

   Koja je učestalost alela? Da li se učestalost genotipova ženki uklapa u Hardy-Weinbergov zakon? Da li se učestalost genotipova mužjaka uklapa u Hardy-Weinbergov zakon?

3. Od 2400 poroda u područnoj bolnici 6 beba je umrlo ubrzo nakon rođenja zbog autosomalne recesivne letalne disfunkcije (opstrukcija debelog crijeva). Koja je učestalost recesivnog alela co u populaciji? Koji dio populacije je heterozigotan za alel co? Koji dio populacije je homozigotan za normalni $co^+$ alel?

4. Očni albinizam uzrokuje X-vezani recesivni alel koji je prisutan u 1% gameta u genskoj zalihi humane populacije. Koja je očekivana učestalost očnog albinizma u muškaraca, a koja u žena?

5. Bijelu vunu ovaca određuje dominantan alel B, a crnu vunu recesivni alel b. U uzorku od 900 ovaca nađeno je 891 bijela i 9 crnih. Odredite frekvenciju alela.

6. Kod goveda rase Shorthorn (kratkorogo govedo) genotip $C^RC^R$ ima crvenu dlaku, $C^RC^W$ šarenu dlaku (mješavina crne i bijele) i $C^WC^W$ bijelu dlaku. U jednom uzorku kratkorogih goveda bilo je 108 crvenih, 48 bijelih i 144 šarenih. a) Odredite frekvenciju alela u populacijskom skupu gena. Kakav je odnos među navedenim alelima? b) Ako je ova populacija u potpunosti panmiktična, kakva će biti frekvencija genotipova u sljedećoj generaciji? c) Kako se podaci o uzorcima iz pitanja a) odnose prema očekivanjima iz pitanja b)? Je li populacija iz a) dijela zadatka u ravnoteži?

7. Farmer ima 10 krava koje dnevno daju 24, 23, 18, 26, 32, 34, 41, 12, 63 i 14 litara mlijeka. Izračunajte srednju vrijednost varijabilnosti i standardnu devijaciju. Ako farmer kupi još dvije krave koje daju 73 i 12 litara mlijeka po danu, kako to utječe na standardnu devijaciju dnevnog prinosa mlijeka?

8. MN krvne grupe kontroliraju 2 kodominantna alela ($L^M$ i $L^N$). Ispitivan je uzorak od 208 beduina u sirijskoj pustinji na prisustvo M i N antigena i utvrđeno je 119 osoba s krvnom grupom M, 76 s grupom MN i 13 s grupom N. Izračunaj frekvencije alela $L^M$ i $L^N$. Ako je frekvencija alela $L^M$= 0,3, koliko će osoba u uzorku od 500 imati krvnu grupu MN?

**Praktičan rad**

Sjemenkama graha izmjerite dužinu ili težinu. Prikažite rezultate mjerenja varijabilnosti grafom, te odredite srednju vrijednost varijabilnosti.

.

# TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI

Tehnološki napredak i sve veći zamah u industrijskoj proizvodnji glavni su uzrok antropogenog onečišćenja okoliša. Zbog toga je nužno detektirati negativne (štetne) učinke na organizmima koji nastanjuju takav onečišćeni okoliš. Primjenom kemijskih analiza moguće je vrlo precizno utvrditi prisutnost pojedinog onečišćivača i točno odrediti njegovu koncentraciju. Međutim u onečišćenom okolišu najčešće je prisutna veća količina različitih onečišćivača i određivanje koncentracije svakog pojedinog spoja neće nam dati potpuni uvid u zatečeno stanje, a nema niti podataka o njihovom utjecaju na biološku komponentu okoliša. Stoga postoji potreba za biološkim analizama koje će nam dati informaciju o tome kako neko onečišćenje mijenja i utječe na živi svijet.

## BIOTESTOVI

Postoje mnogobrojni laboratorijski testovi kojima se provodi testiranje nekog uzorka tla, vode ili zraka u kontroliranim uvjetima (temperatura, pH vrijednost, količina svjetlosti, sadržaj kisika i drugih plinova, salinitet, prisutnost anorganskih i organskih onečišćivača i sl.). Takvi testovi se mogu raditi na različitim organizmima: najčešće su to bakterije, biljke i životinje (beskralješnjaci: školjkaši i kralješnjaci: ribe) ili stanične kulture u uvjetima *in vitro.*

## GENOTOKSIČNOST

Toksičnost je po svojoj definiciji pojam kojim obuhvaćamo bilo kakav štetan utjecaj na žive organizme ili okoliš. ***Citotoksičnost*** se odnosi na negativne promjene vezane uz rast, diferencijaciju ili smrt stanica (apoptoza, nekroza). ***Genotoksičnost*** se očituje kao promjena na razini nasljedne tvari, njome se bavi ***genetička toksikologija***, a tvari koje oštećuju molekulu DNA nazivamo ***genotoksičnim tvarima*** ili ***genotoksikantima***.

Genotoksični spojevi oštećuju molekulu DNA i uzrokuju nastanak različitih oštećenja: DNA lomovi i adukti, oksidacija i dimerizacija baza, unakrsne DNA-DNA veze ili DNA-protein veze. Stanice ta oštećenja mogu popraviti ili mogu nastupiti ireverzibilne promjene koje će dovesti do mutacija (genske mutacije i kromosomske anomalije).

# BILJNI TESTOVI

Biljke se vrlo često koriste kao pogodni test organizmi za procjenu štetnih utjecaja genotoksičnih spojeva. Mnogi biljni testovi su našli široku primjenu upravo zbog jednostavnosti u rukovanju, niskih materijalnih troškova i relativno kratkog vremena koje je potrebno za analizu rezultata.

# ALLIUM- TEST

To je jedan od najstarijih i najčešće primjenjivanih testova koji je dobio ime po rodu *Allium* koji se najčešće upotrebljava, iako se mogu primijeniti i druge biljne vrste iz rodova *Vicia, Hordeum*. Tim se testom detektira citotoksičnost i genotoksičnost nekog spoja. Citotoksičnost se procjenjuje na temelju inhibicije longitudinalnog rasta korjenčića. Genotoksičnost nekog spoja se procjenjuje na temelju učestalosti kromosomskih promjena: kromosomskih aberacija i mitotskih nepravilnosti te učinka na diobeni ciklus (mitotski indeks).

## Praktičan rad

- Potrebno je prirediti nekoliko zdravih lukovica luka; ukloniti osušene korjenčiće i vanjske ljuske lukovica koje su se počele ljuštiti. Najmanji broj lukovica za svaki tretman je pet.
- Naklijavanje: lukovice se svojom bazom urone u odgovarajuće posude s odstajalom vodovodnom vodom (slika 19.1.) i nakon otprilike 2-3 dana izrastu korjenčići duljine 2 cm. Lukovice sa korjenčićima duljim od 2 cm potrebno je ukloniti iz testiranja.

Slika 19.1. Naklijavanje lukovica i tretman

- Tretman: vrijeme tretmana obično iznosi 24 ili 48 sati. Lukovice s 2 cm dugim korjenčićima se urone u kontrolnu otopinu (odstajala vodovodna voda) i test-otopine rastućih koncentracija, nakon čega slijedi opravak svih tretiranih korjenčića u vodenoj otopini slijedećih 24 sata.
- Fiksacija korjenčića: fiksativ je mješavina etilnog alkohola i octene kiseline u omjeru 3:1.
- Izrada preparata: „squash“ tehnika, bojanje (Feulgen ili orcein ili acetokarmin)
- Mikroskopska analiza: mitotski indeks (broj stanica u mitozi/ukupan broj analiziranih stanica %), kromosomske aberacije i mitotske nepravilnosti

Na temelju inhibicije logitudinalnog rasta korjenčića te analize mitotske aktivnosti meristemskih stanica vrška korjenčića procjenjuje se citotoksičnost testiranog spoja. Potrebno je izmjeriti dužinu korjenčića kontrolne skupine u odnosu na tretiranu skupinu, a srednju vrijednost dužine korjenčića, koja ujedno predstavlja inhibiciju rasta korjenčića, prikazati crtanjem krivulje rasta iz koje se određuje EC50 vrijednost (koncentracija koja uzrokuje 50% inhibicije rasta korjenčića).

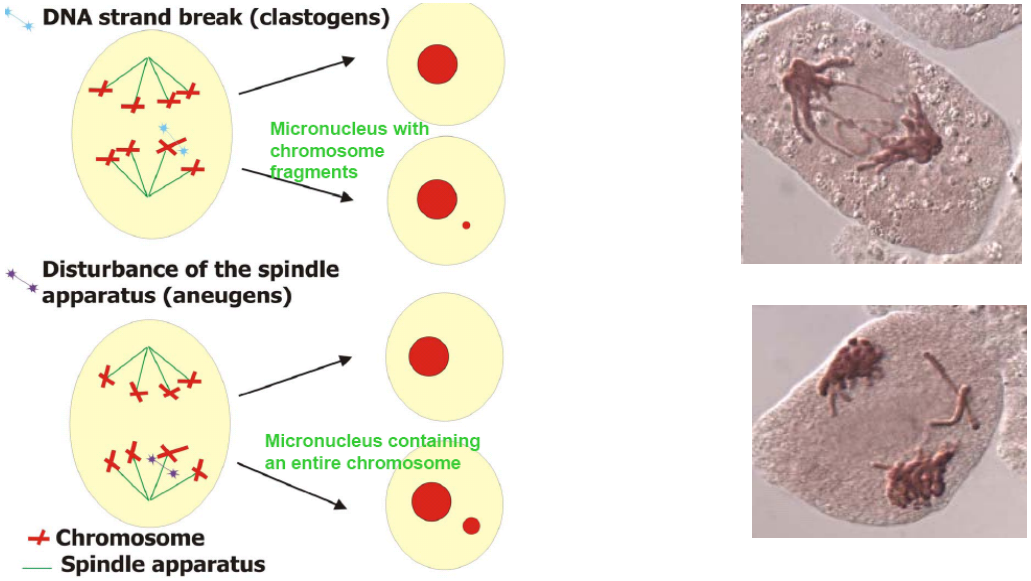
## MIKRONUKLEUS-TEST

Mikronukleus (MN) definiramo kao malo, okruglo kromatinsko tjelešce (slika 19.2) koje se nalazi uz rub interfazne jezgre i:

1. svojom konzistencijom i bojom se ne razlikuje od jezgre
2. nalazi se u istoj optičkoj ravnini kao i jezgra
3. MN i jezgra se moraju nalaziti unutar iste citoplazme
4. manji je od 1/3 promjera jezgre

Slika 19.2. Mikronukleus u stanici vrška korjenčića boba, *Vicia faba*

Postoje dva osnovna načina (slika 19.3.) nastanka MN-a: klastogeni koji je posljedica loma kromosoma i aneugeni koji je povezan s nefunkcionalnim diobenim vretenom. Bez obzira na porijeklo nastanka, dijelovi kromosoma ili pak čitavi kromosomi zaostaju u citoplazmi i nakon diobe stanice formiraju malo, okruglo tijelo koje nazivamo MN. Budući da se te jezgrice stvaraju za vrijeme anafaze i telofaze jedan od glavnih preduvjeta za primjenu ove metode je nužna diobena aktivnost stanice.

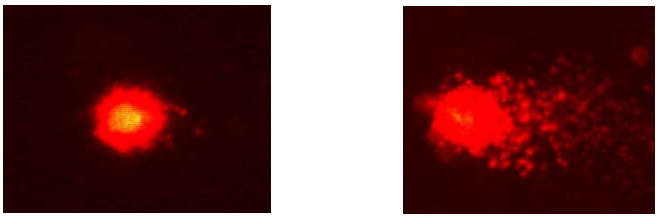



Slika 19.3. Nastanak mikronukleusa: klastogeni i aneugeni učinak: lijevo- shematski, desno- prikaz kromosomske aberacije koje mogu dovesti do formiranja MN.

Analiza rezultata mikronukleus-testa radi se brojanjem stanica koje posjeduju MN, a izražava se kao učestalost MN-a na najmanje tisuću analiziranih stanica (‰).

## KOMET-TEST

Komet-test je relativno nova metoda u biljaka kojom se u vrlo kratkom vremenu može procijeniti genotoksičan potencijal nekog spoja. Tom metodom možemo kvantificirati oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama. Metoda je dobila ime po izgledu oštećenih jezgara nakon elektroforeze koji podsjeća na komet (Slika 19.4.).



Slika 19.4. Kontrolne jezgre-lijevo i oštećene jezgre-desno

Ukoliko je došlo do oštećenja molekule DNA, nakon denaturacije kojom se relaksira struktura superzavojnice, doći će do odmatanja (denaturacije) lanaca DNA koji će se za vrijeme elektoforeze izvlačiti iz „glave kometa“ i formirati rep.

Postoji nekoliko izvedbi komet-testa. Ovisno o pH uvjetima elektoforeze moguće je detektirati različitu vrstu oštećenja molekule DNA:

| | |
|---|---|
| **pH 7** | dvostruki lomovi |
| **pH 12,1-12.3** | jednostruki i dvostruki lomovi |
| **pH>13** | jednostruki i dvostruki lomovi |
| | AP (apurinska i apirimidinska) mjesta |

Analiza oštećenih jezgara radi uz pomoć programa Komet 5 Kinetic Imaging Ltd., a parametri kojima se iskazuje oštećenje su:

1. dužina repa ili udaljenost na koju su otputovali fragmenti tijekom elektroforeze
2. postotak DNA u repu
3. repni moment: umnožak dužine repa i postotka DNA u repu

## IZVEDBA KOMET-TESTA

- **Priprema „ djelomično brušenih“ predmetnih stakalaca**

Metoda komet-testa se sastoji u uklapanju suspenzije pojedinačnih jezgara u agarozni gel na predmetnom stakalcu koje je potrebno unaprijed prirediti.

- Nanošenje prvog sloja 1% otopine agaroze normalnog tališta (NMP) u destiliranoj vodi na djelomično brušena predmetna stakalca
- Uključiti „termoblok“ na 80°C, staviti ependorf tubice s:
  a) 1% agarozom niskog tališta (LMP) u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,5) i
  b) 0.5% otopinom agaroze niskog tališta (LMP) u destiliranoj vodi
- Nakon što se agaroza otopila (provjeriti okretanjem tubica) temperaturu spustiti na 42°C.

- **Izolacija jezgara**

Biljne stanice posjeduju staničnu stijenku, stoga se izolacija jezgara radi mehanički uz pomoć oštrog žileta, uvijek na ledu.

- U plastičnu petrijevku staviti pufer za izolaciju i dio lista duhana narezati na tanke resice kao na slici 19.5.

Slika 19.5. Izolacija jezgara iz lista duhana *Nicotiaba tabacum* var. *xanthi*

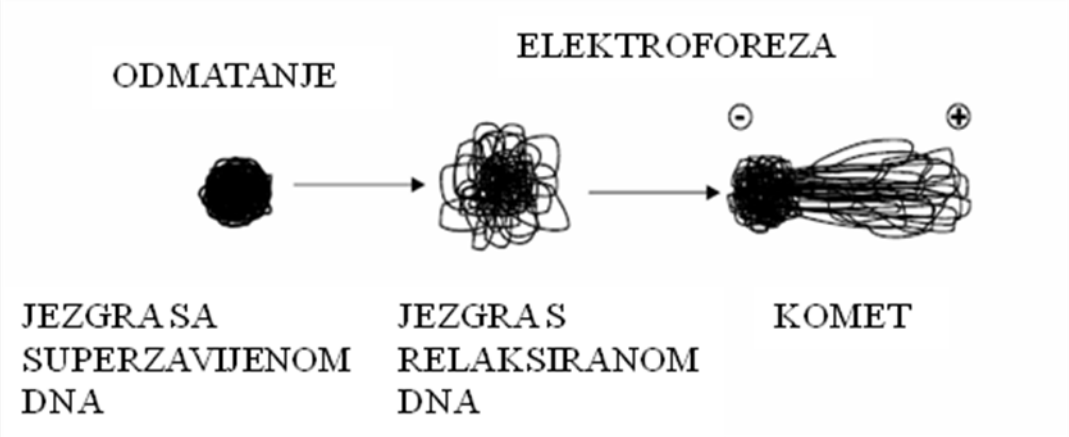
- Nagnuti petrijevku kako bi se jezgre sakupile u puferu
- Pomiješati 100 µl suspenzije jezgara sa 100 µL 1% LMP agroze, pažljivo pipetirati i nanijeti 120 µL smjese na predmetno stakalce, poklopiti pokrovnicom, staviti na led
- Ukloniti pokrovnicu nakon 5 min

Ovako pripremljena stakalca spremna su za slijedeći korak koji obuhvaća denaturaciju i elektroforezu

- **Denaturacija i elektroforeza**

Denaturacija i elektroforeza se rade u istom puferu (300 mM NaCl i 1mM EDTA, pH>13**)**. Vrijeme koje je potrebno za oba procesa kritičan je parametar koji je potrebno točno odrediti za svaku pojedinu vrstu. Pufer se uvijek mora prirediti svjež i do uporabe pohraniti na 10°C.

DNA je negativno nabijena molekula, pa za vrijeme elektroforeze negativno nabijeni krajevi DNA lomova i otpuštene DNA petlje putuju prema anodi formirajući rep (slika 19.6.). Pri manjim oštećenjima se zapravo izvlače samo slobodni krajevi molekule iz same jezgre kometa, dok kod većeg broja lomova dolazi do putovanja i samostalnih fragmenata.




Slika 19.6. Nastanak „kometa“ za vrijeme elektroforeze

- U kadicu za elektroforezu uliti pufer, provjeriti vrijednosti za napon i jakost struje
- Uroniti stakalca s jezgrama i mjeriti vrijeme denaturacije
- Nakon denaturacije uključiti struju i „voziti elektroforezu“, mjeriti vrijeme

- **Neutralizacija**

- Izvaditi stakalca iz kadice, položiti na papir i nakapavati pufer za neutralizaciju
- Isprati vodom

- **Bojanje**

Stakalca se mogu osušiti na zraku i spremiti u odgovarajuće kutije ukoliko nemamo vremena za analizu. U tom slučaju prije bojanja potrebno ih je rehidrirati namakanjem u destiliranu vodu desetak minuta. Ukoliko želimo odmah analizirati stakalca, gelove bojimo etidij bromidom

OPREZ! Etidij bromid je kancerogen!

- **Analiza**
  - Potrebno je izbrojati 50 jezgara po stakalcu pomoću fluorescencijskog mikroskopa Zeiss Axioplan (filter 09: ekscitacija kod valne duljine 520 nm, emisija kod valne duljine 610 nm).
  - Jezgre fotografirati kod povećanja objektiva 40x pomoću digitalne kamere
  - Automatizirana obrada parametara uz pomoć programa: Kinetic 5

**ZADACI:**

1. Zbog čega se u neutralnim uvjetima pomoću komet-testa ne mogu detektirati jednolančani lomovi?
2. Zbog čega nakon nanošenja agaroze na predmetna stakalca stavljamo pokrovnicu?
3. Zbog čega neke kontrolne jezgre mogu imati „velike repove“

**Protokol (prema metodi GICHNER i sur. 2003)**

**IZOLACIJA**

250-400 uL 400mM TRIS, pH 7,5, na ledu

---

**1. sloj 1% NMP**

0,6g NMP u 60 mL H20

**2. sloj 1% LMP**

0,2g LMP u 20mL PBS 100 µL jezgara + 100 µL 1% LMP

**3.sloj 0,5% LMP**

0,1g LMP u 20 mL PBS 100 µL 1% LMP

---

**DENATURACIJA/ ELEKTROFOREZA / 300 mM NaOH, 1mM EDTA/**

45 mL 10M NaOH; 7,5 mL 200 mM EDTA; do 1,5 H2O; pH > 13

uvjeti : 10 min denaturacija
25 min foreza / 26V, 300mA/ 0,72 V/ cm

---

**NEUTRALIZACIJA / 0.4 M Tris-HCl /**

11,64 g Tris, do 240 H20, pH 7,5 sa 5M HCl isprati 3X po 5 min

---

**BOJANJE PREPARATA**

70 µL 20ug/mL EtBr, 5 min, isprati vodom