

Od dvostruke zavojnice do genetičkog inženjerstva: Nobelove nagrade za DNA, RNA i molekularne mehanizme

Trogrlić, Tihana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:781820>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
ODJEL ZA BIOLOGIJU

ZAVRŠNI RAD

**Od dvostruke zavojnice do genetičkog
inženjerstva: Nobelove nagrade za DNA, RNA i
molekularne mehanizme**

Tihana Trogrlić

Split, rujan 2024.

Ovaj rad, izrađen je u Splitu 2024. godine, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnica biologije (univ. bacc. biol.).

Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za biologiju
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Od dvostruke zavojnice do genetičkog inženjerstva: Nobelove nagrade za DNA, RNA i molekularne mehanizme

Tihana Trogrlić

SAŽETAK

Putovanje od otkrića dvostruke zavojnice DNA (deoksiribonukleinska kiselina) do pojave genetičkog inženjerstva obuhvaća niz otkrića nagrađenih Nobelovom nagradom koja su u potpunosti transformirala znanost i medicinu. Razrješavanjem strukture DNA James Watson, Francis Crick i Rosalind Franklin su 1953. godine postavili temelje za razumijevanje genetičkih informacija. Naknadnim otkrićima genetičkog koda i uloge RNA u regulaciji gena, Severo Ochoa i Arthur Kornberg proširuju znanje na polju genetike i biotehnologije. Jedna od istaknutih skorijih nagrada pripada Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna za otkriće CRISPR-Cas9 tehnologije iz bakterijskog obrambenog sustava, koja daje nadu za daljnji razvitak personalizirane medicine zbog svoje preciznosti i učinkovitosti pri uređenju genoma. Integracija svih molekularnih mehanizama u praktične primjene nastavit će oblikovati budućnost svijeta, pružajući nova rješenja za složene biološke izazove i poboljšanje ljudskog zdravlja.

Ključne riječi: DNA, RNA, Nobelova nagrada, ekspresija gena, genetički kod, genetičko inženjerstvo, genom

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

Rad sadrži: 42 stranicu, 10 grafičkih prikaza, 47 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Mentor: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Ocjenjivači: Dr. sc. Ivica Šamanić, *docent Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Ana Maravić, *redoviti profesor na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Splitu*

Dr. sc. Željana Fredotović, *izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu*

Rad prihvaćen: **rujan, 2024.**

Basic documentation card

Bachelor thesis

University of Split
Faculty of Science
Department of Biology
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

From the double helix to genetic engineering: Nobel Prizes for DNA, RNA and molecular mechanisms

Tihana Trogrlić

ABSTRACT

The path from the discovery of the DNA double helix (deoxyribonucleic acid) to the advent of genetic engineering includes a series of Nobel Prize-winning discoveries that have completely changed science and medicine. By decoding the structure of DNA, James Watson, Francis Crick and Rosalind Franklin laid the foundation for understanding genetic information in 1953. With their later discoveries of the genetic code and the role of RNA in gene regulation, Severo Ochoa and Arthur Kornberg expanded knowledge in the field of genetics and biotechnology. One of the most outstanding recent awards goes to Emmanuelle Charpentier and Jennifer Doudna for the discovery of CRISPR-Cas9 technology from the bacterial defense system, which offers hope for the further development of personalized medicine due to its precision and efficiency in genome editing. The integration of all molecular mechanisms into practical applications will continue to shape the future of the world, providing new solutions to complex biological challenges and improving human health.

Key words: DNA, RNA, Nobel Prize, gene expression, genetic code, genetic engineering, genome

Thesis deposited in library of Faculty of science, University of Split

Thesis consists of: 42 pages, 10 figures, 47 references.

Original language: Croatian

Mentor: **Ivica Šamanić, Ph.D.** *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*

Reviewers: **Ivica Šamanić, Ph.D.** *Assistant Professor of Faculty of Science, University of Split*
Ana Maravić, Ph.D. *Professor of Faculty of Science, University of Split*
Željana Fredotović, Ph.D. *Associate Professor of Faculty of Science, University of Split*

Thesis accepted: **September 2024.**

IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

„Od dvostruke zavojnice do genetičkog inženjerstva: Nobelove nagrade za DNA, RNA i molekularne mehanizme“

izradila samostalno pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivice Šamanića. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica:

Tihana Trogrlić

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. POVIJEST NOBELOVE NAGRADE I DNA	3
3.1 RAZOTKRIVANJE GENETIČKOG KODA-.....	5
MEHANIZMI NASLJEĐIVANJA I EKSPRESIJE GENA.....	5
3.1.1 Otkriće dvostruke zavojnice.....	5
3.1.2 Dešifriranje genetičkog koda	9
3.2 DEŠIFRIRANJE STANIČNIH MEHANIZAMA	12
3.2.1 Nasljeđivanje kromosomima.....	12
3.2.2 Genska regulacija i kontrola.....	14
3.2.3 Mobilni genetički elementi i dinamika genoma.....	18
3.3 MANIPULIRANJE GENOMOM.....	20
3.3.1 Mehanizmi sinteze DNA i RNA.....	20
3.3.2 Genetički inženjering i uređivanje genoma.....	23
3.4 UTJECAJ OTKRIĆA NA ZNANOST I MEDICINU	26
3.5 NOBELOVE NAGRADE.....	28
4. ZAKLJUČAK	32
5. LITERATURA	33

1.UVOD

U temeljima svih živih bića postoji specifičan kod koji je zaslužan za stvaranje svake stanice, tkiva, organa i organskog sustava. Također je poznat pod nazivom gen, određuje gotovo sve u živom biću, od njegova izgleda do načina funkcioniranja organizma [1]. Proučavanjem gena, genske varijacije i nasljeđa bavi se genetika, grana biologije čija je središnja uloga razumijevanje načina prenošenja osobina međugeneracijski. Osim tog obuhvaća širok raspon tema, kao što su struktura i funkcija gena, ekspresija i regulacija gena, te genske mutacije [2]. Utemeljiteljem genetike smatra se češki prirodoslovac i svećenik Gregor Johann Mendel. Godine 1868. objavljuje svoj znanstveni rad koji objašnjava nasljeđivanje različitih svojstava u biljkama graška te vjerojatnost prijenosa dominantnih ili recesivnih gena kroz generacije, a danas poznato kao Mendelovi zakoni nasljeđivanja [3]. Mendelovo istraživanje dobilo je malo priznanja za njegova života. Značaj njegovih zakona prepoznat je tek početkom 20. stoljeća i pokrenuta je znanstvena potraga za razumijevanjem genetičkih informacija, što je dovelo do značajnog napretka u proteklih sto godina [3].

Period od početka 20. stoljeća do danas, obilježen je revolucionarnim otkrićima koja su nagrađena Nobelovom nagradom, ističući krucijalnu ulogu DNA, RNA i molekularnih mehanizama [4]. Ključni trenutak u povijesti znanosti bio je rad Jamesa Watsona i Francisa Cricka 1953. godine temeljen na potrazi za strukturom molekule DNA [4]. Otkriće dvostruke zavojnice postavilo je temelje za razumijevanje genetičkih informacija i njihova prijenosa, pokrenulo je niz otkrića i omogućilo osnivanje novih grana znanosti. Primjerice molekularna genetika koja proučava strukturu i funkciju gena na molekularnoj razini, uključujući procese replikacije, popravka, transkripcije i translacije [4]. Takva molekularna perspektiva omogućila je znanstvenicima identificiranje genske osnove bolesti, razvoj genskih terapija i stvaranje genetički modificiranih organizama. Uz molekularnu genetiku razvija se genomika i genetičko inženjerstvo. Genomika kao znanstvena disciplina bavi se mapiranjem svih gena u organizmu, uz pomoć sekvenciranja i analize genoma, kako bi se pružilo bolje razumijevanje funkcije gena [2]. Najmlađe discipline znanosti su tehnologija rekombinantne DNA i genetičko inženjerstvo [4]. Razvojem ovih tehnika otvorila se mogućnost za manipulaciju genetskog materijala s dotad neviđenom preciznošću. Za razvitak

tehnologije rekombinantne DNA, Nobelovom nagradom je 1980. godine nagrađen Paul Berg [4]. Bergova otkrića omogućila su umetanje specifičnih gena u strane molekule DNA i stvaranje genetički modificiranih organizama s novim osobinama [4]. Tehnologija CRISPR-Cas9 za uređivanje genoma je vrhunac genetičkog inženjerstva, stoga su 2020. godine za ovo otkriće Nobelovom nagradom nagrađene Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna [4]. Tehnologije uređivanja gena nude brojne mogućnosti kao što su genska terapija, modeliranje bolesti i poljoprivredna biotehnologija [4]. Iako je napredak u znanosti uvelike omogućio razvitak medicine, mnoge moderne tehnologije ostaju strogo regulirane u liječenju iz etičkih razloga [4].

Cilj završnog rada je istaknuti značaj DNA i RNA kao molekula nasljeđa te njihova strukturna i funkcionalna svojstva. Fokus ovog rada prvenstveno je objasniti razvoj tehnika molekularne biologije i kako su te tehnike dovele do značajnog napretka u razumijevanju genetičkih mehanizama i inženjeringa. Ideja je predstaviti kronološki pregled Nobelovom nagradom nagrađenih otkrića o DNA, RNA i molekularnim mehanizmima. Ova otkrića imaju značajne implikacije za znanost i medicinu, te na to kako određene tehnologije mogu ponuditi moguća rješenja za izazove ljudskog zdravlja. Na temelju prethodno spomenutog, potrebno je raspraviti o etičkim razmatranjima i društvenim implikacijama genetičkog inženjeringa.

2. POVIJEST NOBELOVE NAGRADE I DNA

Nobelove nagrade svjetski su priznate kao najviše počasti koje se dodjeljuju za intelektualna postignuća, a dodjeljuju se u različitim područjima svake godine kao što su fizika, kemija, medicina, mir i književnost [5]. Ove prestižne nagrade postoje zahvaljujući švedskom izumitelju Alfredu Nobelu [5]. Njegov najpoznatiji izum, dinamit, imao je revolucionarno značenje za građevinsku industriju. Potaknut nazivima kao „trgovac smrću“ odlučio je ostaviti pozitivnije nasljeđe, dana 27. studenog 1895. godine Nobel je potpisao svoju posljednju volju i oporuku u Švedskom-norveškom klubu u Parizu [6]. Dodijelio je 31 milijun švedskih kruna za osnivanje Nobelovih nagrada, tražio je da se ove nagrade dodjeljuju svake godine pojedincima ili organizacijama koji su značajno pridonijeli u pet već spomenutih područja [5]. Pet godina nakon njegove smrti dodijeljene su prve Nobelove nagrade: Wilhem Conrad Rontgen za otkriće x-zraka (fizika), Jacobus Henricus van't Hoff za otkriće kemijske termodinamike (kemija) [6]. Glavna svrha nagrade je odavanje počasti pojedincima i organizacijama koji su dali značajan doprinos čovječanstvu, kao i Nobelovim osobnim težnjama za pozitivnim nasljeđem [5]. Ne radi se samo o financijskoj nagradi već i međunarodnom priznanju koje će osigurati i unaprijediti daljnja sredstva za njihov rad [6]. Nagrađivanjem pojedinaca i organizacija zbog znanja, promicanja mira i nadograđivanja ljudske kulture, motiviraju i inspiriraju se ljudi diljem svijeta da nastave revolucionarna istraživanja i teže boljem svijetu [6].

Deoksiribonukleinska kiselina ili DNA je molekula života koja nosi genetičke upute za život (rast, razvoj, funkcioniranje i reprodukciju) svih živih organizama i mnogih virusa [6]. Njezino otkriće i istraživanje njezine strukture i funkcije ključni su za razumijevanje mehanizama nasljeđivanja i molekularne osnove samog života, te razvoja biologije i medicine [7]. U 19. stoljeću Gregor Mendel je postavio temelje genetike i objasnio osobine nasljeđivanja, međutim fizička osnova DNA je ostala nepoznata [7]. Friedrich Miescher godine 1869. otkrio je tvar koja sadrži fosfor i dušik u jezgri bijelih krvnih stanica nazivajući je „nuklein“ [8]. Ta tvar je kasnije identificirana kao molekula DNA [8]. Njezino značenje kao nositelja genetičke informacije u to vrijeme nije bilo prepoznato. Početkom 20. stoljeća dolazi do većeg razumijevanja uloge DNA u nasljeđivanju. Frederick Griffith 1928. godine eksperimentom prikazuje transformaciju (genetički materijal iz jednog soja bakterije može prenijeti u drugi soj, pritom mijenjajući njegove karakteristike)

Streptococcus pneumoniae [9]. Konačni dokaz DNA kao genetičkog materijala došao je 1944. godine, Oswald Avery, Colin MacLeod i Maclyn McCarty nastavili su se na „Griffithov eksperiment“ kako bi odredili biokemijsku prirodu transformacije *in vivo* [10]. Koristili su S i R soj bakterije *S. pneumoniae*. Prvo su koristili specifične enzime (proteaza, RNaza, DNaza) za izolaciju bioloških makromolekula (proteina, DNA, RNA) iz toplinski inaktiviranog S soja, te su komponente pomiješali sa živim R sojem bakterija kako bi promatrali hoće li doći do transformacije u S soj [10]. Istraživanjem su snažno dokazali kako je DNA odgovorna za transformaciju u bakterijama, a ne protein [10]. U istom vremenu znanstvenici su počeli povezivati kromosome s nasljeđivanjem; nositelji genetičkog materijala. Kromosomsku teoriju nasljeđivanja podupro je rad Thomasa Hunt Morgana 1933. godine proučavanjem mutacija na mušici *Drosophila melanogaster* [11]. Određivanje strukture DNA bilo je jedno od najvažnijih postignuća koje je revolucioniralo polja genetike i postavilo temelje za daljnja istraživanja. Rane 1950-e Rosalind Franklin i Maurice Wilkins uz pomoć kristalografije x- zraka dobili su slike visoke rezolucije koje su pružile nužan dokaz spiralne strukture DNA [12]. Koristeći se već poznatim informacijama o molekuli DNA; sastav četiri vrste nukleotida, Chargaffovo pravilo (količina adenina jednaka timinu, količina citozina jednaka gvaninu), difrakcija X-zraka koja ukazuje na spiralnu strukturu, Watson i Crick su 1953. godine predložili teorijski model dvostruke zavojnice DNA [13]. Nakon otkrića dvostruke zavojnice, istraživanja DNA se naglo proširila. Šezdesetih godina prošlog stoljeća provodila su se istraživanja koja su pomogla u dešifriranju genetičkog koda i prevođenju sekvence DNA u proteine (Robert Holley, Har Gobind Khoran, Marshall Nirenberg) [14]. Razvojem tehnologije rekombinantne DNA 1970-ih, znanstvenici Paul Berg, Herbert Boyer i Stanley Cohen su omogućili manipulaciju i kloniranje DNA, postavivši temelje za budućnost biotehnologije i moderne medicine [15]. Usporedno se pojavljuje i tehnologija sekvenciranja DNA, što je rezultiralo sekvenciranjem cijelog ljudskog genoma u projektu „Projekt ljudskog genoma“ (1990.- 2003.). Od rane identifikacije „nukleina“ do sekvencioniranja cijelog ljudskog genoma, svako otkriće temeljeno na prethodnim saznanjima doprinijelo je unapređivanju znanosti i razumijevanju genetike i time otvorilo nova vrata u medicini i biotehnologiji [16]. Nobelove nagrade dodijeljene su brojnim znanstvenicima za radove u poljima razumijevanja DNA i genetičkih mehanizama koji leže u osnovi nasljeđa i staničnih funkcija. Nagrade odaju priznanja znanstvenicima čiji su radovi unaprijedili i oblikovali put modernim genetičkim istraživanjima, biotehnologiji i medicini, naglašavajući dubok utjecaj razumijevanja molekule života.

3.1 RAZOTKRIVANJE GENETIČKOG KODA- MEHANIZMI NASLJEĐIVANJA I EKSPRESIJE GENA

Otkrivanje genetičkog koda, mehanizma nasljeđivanja i ekspresije gena bile su glavne nepoznanice biologije, a obuhvaćala su stoljeća istraživanja. Najznačajnija otkrića bila su nagrađena Nobelovom nagradom, dajući uvid u strukturu DNA, mehanizme sinteze genetičkog materijala, dešifriranje genetičkog koda, genetsku kontrolu, nasljeđivanje i genetički inženjering.

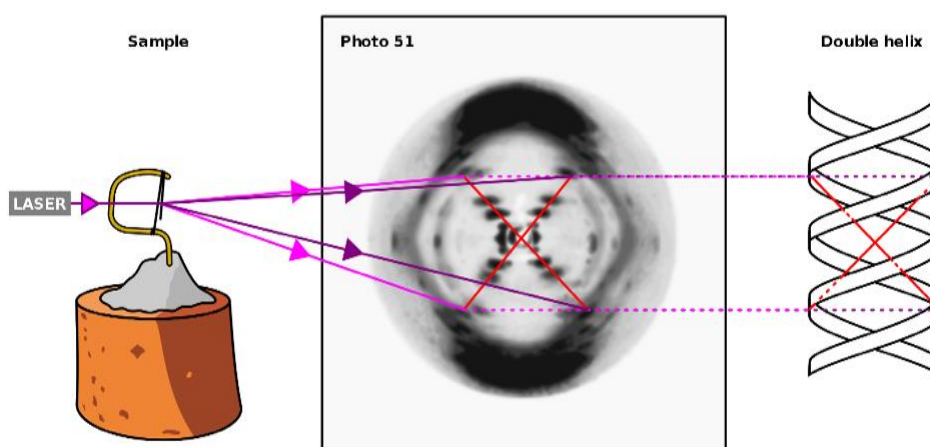
3.1.1 Otkriće dvostruke zavojnice

Godine 1962. James Dewey Watson (r. 1928.), Francis Harry Compton Crick (1916. – 2004.) i Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916. – 2004.) zajedno su primili Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu zbog određivanja molekularne strukture deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i njezinog značaja za prijenos informacija u živom organizmu 1953. godine [13]. Wilkinsova kolegica Rosalind Franklin (1920. – 1958.), nije bila počašćena Nobelovom nagradom kao njezini suvremenici, iako je njezin doprinos bio od iznimne važnosti [12]. O razlozima njezina isključenja raspravljalo se i još uvijek nisu jasni. Postoji odredba Nobelove nagrade koja određuje da se ni u kojem slučaju iznos nagrade ne smije dijeliti između više od tri osobe [12]. Možda je glavni faktor mogla biti činjenica da je preminula prije dodjele nagrade, ali ta je odredba protiv posthumnih nagrada uvedena tek 1974. godine [12].

Molekula koja je temelj nasljeđa ili poznata kao molekula života, DNA, nosi gensku informaciju koja se koristi u rastu, razvoju, funkcioniranju i reprodukciji svih živih organizama [12]. Novo razumijevanje genetike, nasljeđivanja i nasljednih bolesti, bilo je moguće nakon otkrića strukture DNA. Dvostruka spirala sastavljena od dva lanca izmjeničnih fosfatnih i šećernih skupina, učvršćena je vodikovim vezama između parova organskih baza: adenina (A) i timinom (T) te gvanina (G) i citozina (C) [12]. Pozadinu za rad četvorice znanstvenika formiralo je nekoliko znanstvenih otkrića: 1940-ih Avery, MacLeold i McCarty dokazuju da je za nasljeđe odgovorna DNA, a ne protein u kromosomima [12]; eksperimentalno otkriće Erwina Chargaffa o jednakoj količini baza adenina (A) i timina (T), te gvanina (G) i citozina (C) u DNA i otkriće Linusa Paulinga

o spiralnim oblicima određenih proteina, koje je dovelo do korištenjem atomskih modela i poznavanjem mogućeg rasporeda različitih atoma [16, 17].

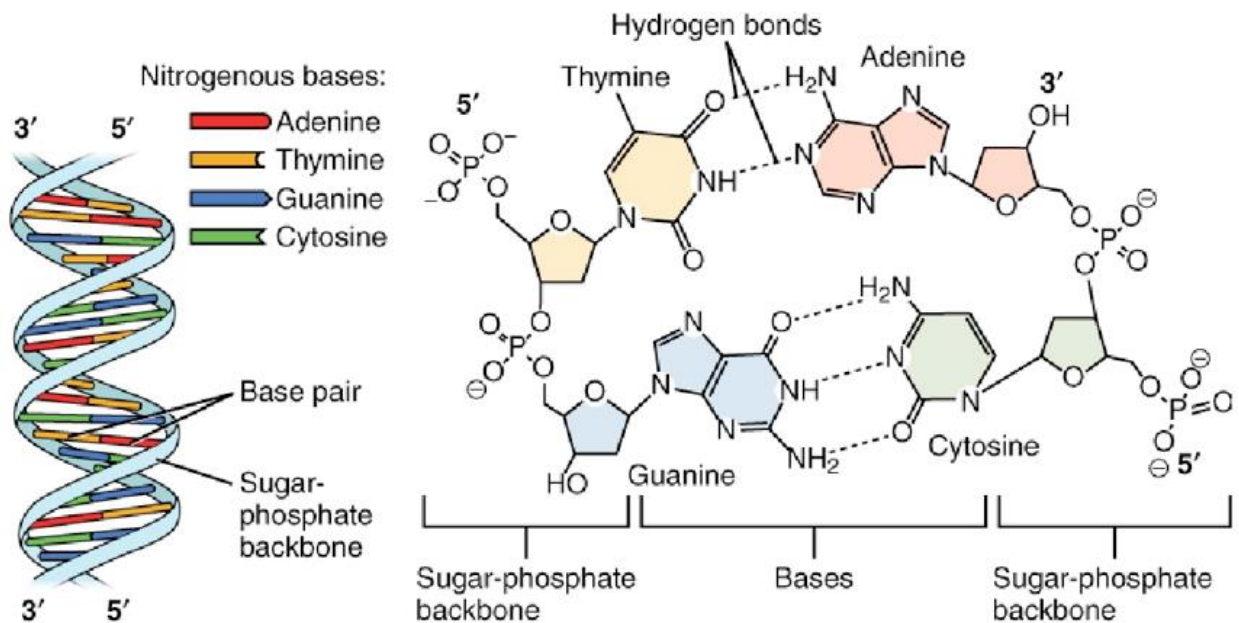
Francis Crick kao diplomirani fizičar svoju karijeru započinje u tom području, ali nedugo nakon završetka obrazovanja Crick proširuje svoje vidike u svijet molekularne biologije. Početci njegove znanstvene znatiželje leže u sferi zoologije te se poslije šire na istraživanja temeljnih procesa života i genetike [18]. U poslijeratnom vremenu Crick se pridružuje Laboratoriju Cavendish na Sveučilištu u Cambridgeu, te počinje podučavati biološke molekule korištenjem tehnika difrakcije x-zraka (rendgenska kristalografija) [18]. James Watson, mladi američki biolog koji je otišao u Dansku na postdoktorski rad kako bi proširio svoje znanje iz kemije [20]. Prilikom svog boravka upoznaje se s Wilkinsonovim radom na strukturi DNA i kristalografskim tehnikama [20]. Pobudila mu se znatiželja te se ubrzo preselio u Cavendish Laboratorij, gdje je u tijeku bilo nekoliko važnih kristalografskih projekata X-zraka [20]. Na istom radnom mjestu susreo je Cricka, čije će poznanstvo brzo prerasti u jedno od najpoznatijih partnerstva u povijesti znanosti. Crickov teoretski uvid i razumijevanje tehnike difrakcije x-zraka, s Watsonovim znanjem u genetici i molekularnoj biologiji rezultiralo je revolucionarnim otkrićem 1953. godine [18, 20]. Nadahnuti radom L. Paulinga, kemičara koji je predložio model trostruke spirale DNA [17], Crick i Watson su bili potaknuti na razmišljanje o novom modelu DNA [18, 20]. Na King's Collegeu u Londonu, Rosalind Franklin je dobila slike DNA s pomoću rendgenske kristalografije, ideje koju je prvi iznio Maurice Wilkins [19]. Upravo fotografija 51 bila je ključna, pokazala je jasnu spiralnu strukturu (Slika 1.).



Slika1. Fotografija 51, Rosalind Franklin, rendgenska difrakcijska slika DNA koja ukazuje na spiralnu strukturu (dvostruka zavojnica).

Izvor: (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f6/Experimental_setup_of_Photo_51.svg/2560px-Experimental_setup_of_Photo_51.svg.png)

Ona je bila zadnji dio slagalice koja je potvrdila teoriju dvostruke spirale James Watsona i Francis Cricka. Njihov model je pokazao da se DNA sastoji od dva lanca koja idu u suprotnim smjerovima (antiparalelni), upleteni jedan oko drugoga tvoreći spiralu [21]. Svaki lanac je sastavljen od šećerno-fosfatne okosnice s dušikovim bazama (adenin, timin, citozin, gvanin) koje su okrenute prema unutra [21]. Baze se uparuju komplementarno vodeći se Chargaffovim pravilom, adenin se sparuje s timinom a citozin s gvaninom [16]. Parovi baza se povezuju uz pomoć vodikovih veza, pri čemu A-T parovi tvoje dvije vodikove veze, a C-G tvore tri veze (Slika 2.).



Slika 2. Trodimenzionalna struktura dvostruke spirale DNA, koju su ispravno razjasnili James Watson i Francis Crick. Komplementarne baze se drže zajedno kao par vodikovim vezama. Dvije vodikove veze povezuju timin (T) s adeninom (A), a tri vodikove veze povezuju gvanin (G) s citozinom (C). Šećerno-fosfatne okosnice međusobno teku antiparalelno, zbog toga su 3' i 5'-krajevi dvaju lanaca poravnati.

Izvor: (<https://biologydictionary.net/wp-content/uploads/2016/10/DNA-Nucleotides.jpg>)

Komplementarno spajanje baza osnova je mehanizma za replikaciju DNA, gdje svaki lanac služi kao kalup za novi komplementarni lanac, osiguravajući kopiranje genetičkog materijala tijekom stanične diobe [21]. Ovo je pružilo molekularno objašnjenje za prijenos genetičkih informacija. Uz sve poznate informacije uspjeli su konstruirati fizički model, te su u trodimenzionalnoj strukturi mogli prikazati molekularnu udaljenost i kutove. Nakon otkrića strukture DNA, Crick je dao još jedan značajan doprinos biologiji; formulacija središnje dogme koja ocrtava tijek genetičkih informacija od DNA preko RNA do proteina [21]. Ovime je objasnio prepisivanje genetičke upute u glasničku RNA (mRNA) i zatim njihovo prevođenje ribosomima u proteine. Pojasnio je usmjereni tok genetičkih informacija i naglasio ulogu RNA kao glasnika koji prenosi gensku uputu od DNA u jezgri do ribosoma u citoplazmi, gdje se sintetiziraju proteini [21]. Razumijevanje genetičkog koda i mehanizama sinteze proteina otvorilo je put prema tehnologiji rekombinantne DNA, koju danas znanstvenici koriste u svrhe manipuliranja genima i umjetnu proizvodnju proteina. Otkriće strukture DNA i središnje dogme postavilo je temelje molekularne biologije kao znanstvenog polja [21]. To je dovelo do razvoja raznih tehnologija u budućnosti, kao što su sekvenciranje DNA, lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i uređivanje gena CRISPR-Cas9, te genetsko testiranje, genska terapija i personalizirana medicina koje predstavljaju veliki napredak i nadu za zdravstvo.

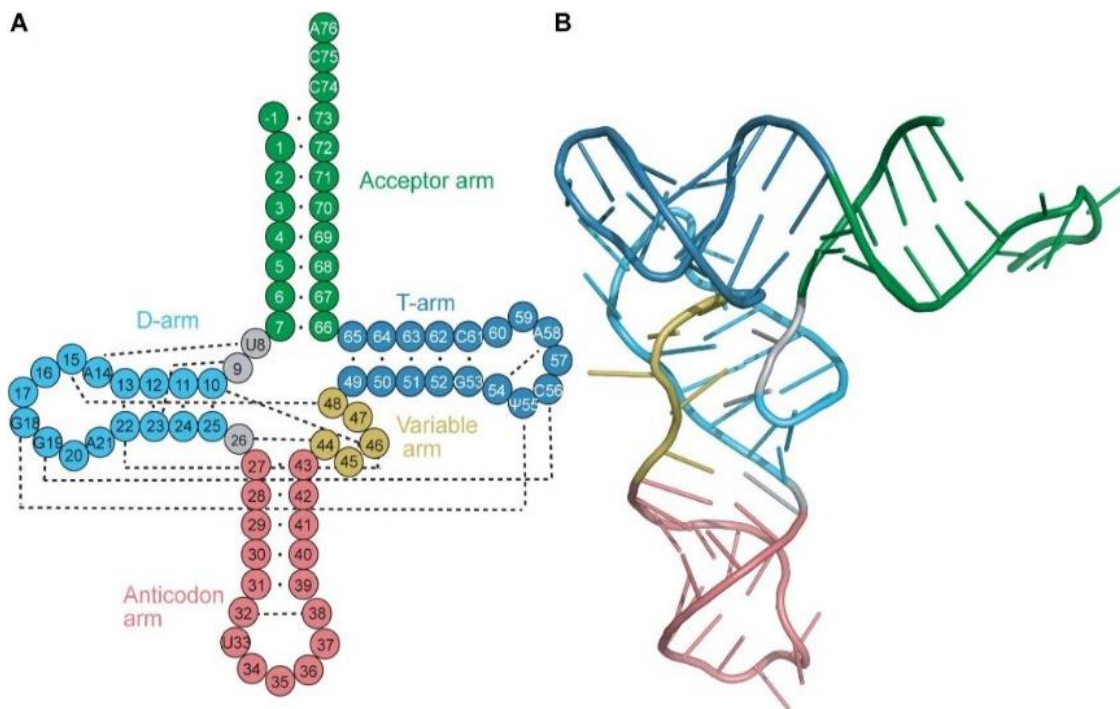
3.1.2 Dešifriranje genetičkog koda

Robert W. Holley, Har Gobind Khorana i Marshall W. Nirenberg za istraživanje kojim su protumačili genetički kod i njegovu funkciju u sintezi proteina, zajednički su dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu 1968. godine [22]. Ovo istraživanje pružilo je duboki uvid mehanizma kojim se genetičke informacije kodirane u DNA prevode u sekvencu aminokiselina proteina. Marshall W. Nirenberg, američki biokemičar koji je radio na Nacionalnom institutu za zdravlje (NIH), svoju karijeru usredotočio je na razumijevanje genetičkog koda, koji sadrži pravila po kojima sekvence nukleotida u DNA i RNA određuju aminokiseline koje tvore protein [23]. Njegov najpoznatiji eksperiment, poli-U, proveden 1961. godine u kolaboraciji s Johannom H. Matthaei pružio je jasan dokaz prevođenja sekvence DNA u aminokiseline [23]. Koristili su sintetičku RNA molekulu koja se u potpunosti sastojala od uracilnih baza (poli-U), koju su uveli u sustav bez stanica koji sadrži ribosome, prijenosnu RNA (tRNA) i druge komponente potrebne za sintezu proteina [23]. Nakon uvođenja poli-U RNA sustav je proizveo polipeptid u potpunosti sastavljen od aminokiseline fenilalanina, pokazujući da RNA sekvenca „UUU“ kodira fenilalanin [23]. Ovo istraživanje označilo je prvu identifikaciju specifičnog kodona i njegove odgovarajuće aminokiseline, dokazujući time povezanost između specifične RNA sekvence s odgovarajućom aminokiselinom. Nirenberg nakon uspjeha poli-U eksperimenta nastavlja s dekodiranjem drugih trostrukih nukleotida. Sintezom različitih sekvenci RNA i njihovih prevođenjem, njegov tim je u narednih pet godina uspio odrediti sva 64 kodona i odgovarajuće aminokiseline („AAA“ za lizin i „CCC“ za prolin) [23]. Kod je napisan s pomoću četiri baze koje se nalaze u RNA (adenin, uracil, gvanin, citozin), baze su sastavljene u kodone (triplete) i proizvode 64 kombinacije [23]. Dvadeset aminokiselina kodiraju 61 kodon, a preostala tri kodiraju signale zaustavljanja stvaranja polipeptidnog lanca (STOP kodoni). Njegovo istraživanje značajno je unaprijedilo razumijevanje genetičkog koda i njegovog prevođenja u molekule neophodne za život (proteine).

Har Gobind Khorana, rođen u Indiji, ali kasnije odlazi i radi u Sjedinjenim Državama gdje započinje svoj rad na sintezi nukleinske kiseline [24]. Njegova metoda kemijske sinteze nukleinskih kiselina uvelike je unaprijedila molekularnu biologiju. Prije njegova rada proučavanje nukleinskih kiselina predstavljalo je veliki izazov zbog nedostatka alata u laboratorijima. Koharanin laboratorij stvarao je sintetičke RNA sekvence za dešifriranje genetičkog koda poput

ponavljajuće sekvence RNA „ACACAC“ ili „UCUCUC“ za identificiranje odgovarajućih polipeptida [24]. Njegov rad je potvrdio da je genetički kod sastavljen od tripleta nukleotida, od kojih svaki specificira za jednu aminokiselinu. Također je otkrio specifične kodone koji signaliziraju prekid sinteze proteina poznati pod nazivom STOP kodoni (UAG, UAA i UGA), ključni za ispravni završetak sinteze proteina [24]. Najznačajniji rad mu je sinteza prvog umjetnog gena tRNA supresora tirozina [24]. Temeljna uloga tRNA je dekodiranje mRNA u aminokiseline tijekom sinteze proteina. Svaka tRNA je specifična za aminokiselinu i ima regiju antikodona koja se uparuje s odgovarajućim kodonom na mRNA. Tirozin supresor tRNA prepoznaje stop kodon u mRNA i umjesto njega ubacuje aminokiselinu tirozin, omogućavajući time nastavak sinteze proteina [24]. Sintetizirali su tRNA povezujući kratke sekvence nukleotida, unijeli su je u sustav i ispitali njezinu biološku aktivnost, te sposobnost prepoznavanja i zamjene stop kodona tirozinom [24]. Eksperiment je potvrdio točnost i univerzalnost genetičkog koda, te pokazao kako sintetičke tRNA mogu zamijeniti prirodne RNA. Khoran je postavio temelje genetičkog inženjeringa npr. alati za uređivanje gena poput CRISPR-Cas9, tehnologiju rekombinantne DNA i u medicinskim sferama genske dijagnostike i terapiji.

Robert W. Holley, američki biokemičar, usredotočio se na razumijevanje strukture i funkcije tRNA u sintezi proteina [25]. Najznačajnije postignuće bilo je određivanje kompletne nukleotidne sekvence tRNA, 1965. njegov tim je uspješno sekvencionirao 77 nukleotida koji čine tRNA za aminokiselinu alanin [25]. Robert W. Holley u ranim 1960-ima prvi predlaže sekundarnu strukturu alaninske tRNA, također poznata kao model lista djeteline (engl. *three-leafed clover*); molekula tRNA ima četiri petlje (engl. *hairpin loops*) ili kraka, od kojih svaki ima određenu funkciju, to su akceptorski stablo, antikodonski krak, D krak i TΨC krak (Slika3.) [25]. Antikodonska petlja sadrži specifičnu sekvencu od tri nukleotida (antikodon) koji je komplementaran specifičnom nizu od tri nukleotida u mRNA, poznatom kao kodon. Sparivanje kodona i antikodona osigurava točan prijevod genetičkog koda tijekom sinteze proteina. Akceptorska stabljika (engl. *stem*) je mjesto gdje je vezana aminokiselina (alanin, u ovom slučaju). Ovo pričvršćivanje je katalizirano enzimom aminoacil-tRNA sintetazom, koji prepoznaje tRNA i njezinu odgovarajuću aminokiselinu [25]. Holley je također raspravljao o terciarnoj strukturi tRNA, koja uključuje trodimenzionalno savijanje molekule [25]. Precizno savijanje ključno je za funkciju tRNA, jer omogućuje molekuli da stane u ribosom tijekom sinteze proteina (Slika 3.).



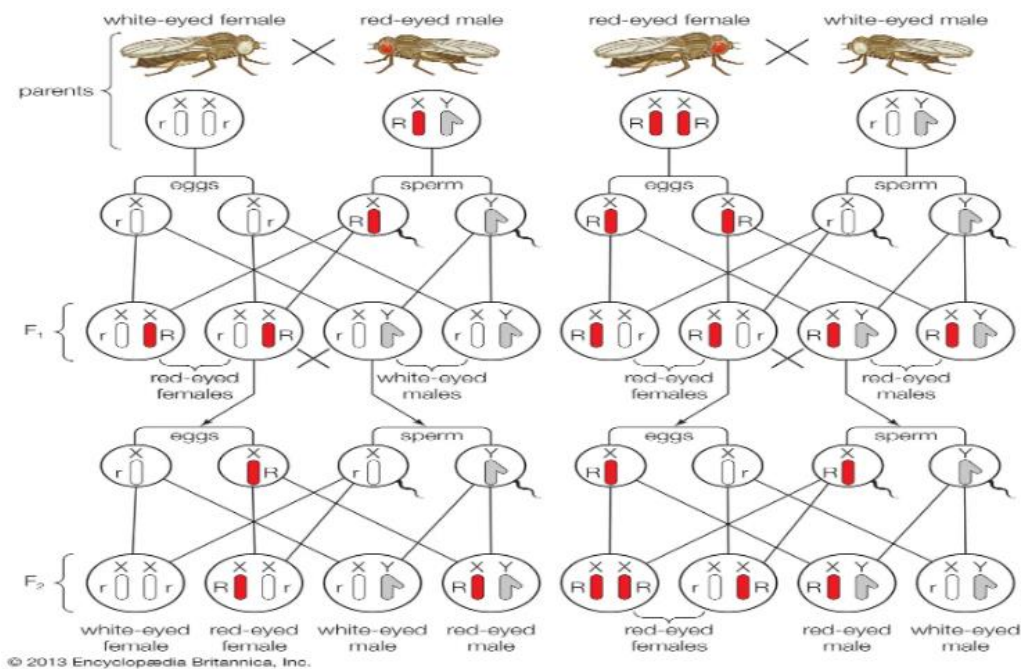
Slika 3. Model lista djeteline transportne DNA (tRNA), lijevo (A) sekundarna struktura, desno (B) trodimenzionalna struktura. Izvor: (https://www.frontiersin.org/files/Articles/596914/fmicb-11-596914-HTML/image_m/fmicb-11-596914-g001.jpg)

Dešifriranje genetičkog koda, rad Holleya, Khorana i Nirenberga pomogao je u razumijevanju funkcioniranja genetičkog koda [14,24,25]. Njihova otkrića podupiru središnju dogmu molekularne biologije te su pridonijeli širem razumijevanju molekularne osnove života [22]. Otkrili su mehanizme kojim se genetičke informacije prevode u proteine koji su esencijalni za provođenje funkcije života, što je doprinijelo u razvoju tehnologije mRNA [24,25]. Sveobuhvatno su objasnili način na koji genetičke informacije upravljaju biološkim procesima.

3.2 DEŠIFRIRANJE STANIČNIH MEHANIZAMA

3.2.1 Nasljeđivanje kromosomima

Američki genetičar Thomas Hunt Morgan, nagrađen je Nobelovom nagradom za medicinu ili fiziologiju 1933. godine za svoj rad na području genetike [26]. Početkom 20. stoljeća koncept gena i nasljeđivanja bio je poznat samo iz Mendelovog rada te je Morgan potaknut i skeptičan u vezi njegovih otkrića započeo svoj eksperiment na modelu vinske mušice [27]. Njegovo istraživanje vinske mušice, *Drosophila melanogaster*, dovelo je do otkrića uloge kromosoma u nasljeđivanju i razumijevanje genetičkog nasljeđa [27]. Dokazao je da su kromosomi nositelji gena pohranjeni unutar stanične jezgre. Te da su oni linearno organizirani u dugom nizu unutar kromosoma. Odabrao je vinsku mušicu kao dobar modelni organizam zbog njenog kratkog životnog ciklusa, jeftinog uzgoja, jednostavnog genetičkog sastava, lakog održavanja i brzog reproduktivnog ciklusa uz sposobnost stvaranja velikog broja potomaka [27]. Ovaj izbor mu je omogućio provođenje opsežnih i brzih genetičkih eksperimenata, olakšavajući promatranje brojnih generacija i genetičkih varijacija. Do prvog velikog otkrića došao je 1910. godine kada je opazio mutaciju bijelih očiju kod mužjaka mušice (Slika 4.) [27].



Slika 4. Spolno nasljeđivanje viske mušice osobina bijeli i crvenih očiju

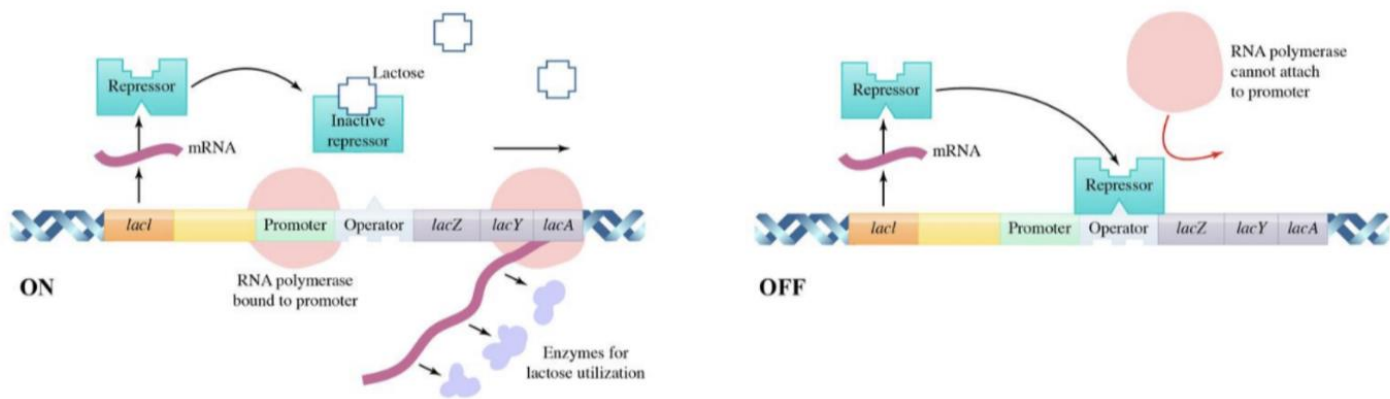
Izvor: (<https://www.britannica.com/biography/Thomas-Hunt-Morgan>)

Primijetio je da bjelooka osobina za razliku od divljeg tipa crvenih očiju, nije slijedila Mendelove omjere (nasljeđivanje osobina neovisno jedna o drugoj) već je pokazivala povezanost sa spolom muhe [27]. Primijetio je da se osobina bijelih očiju pojavljuje samo kod mužjaka, a divlji tip crvenih očiju samo kod ženki [27]. To je dovelo do hipoteze o spolno vezanom nasljeđu, gdje su određene osobine povezane s određenim kromosomima; u ovom slučaju X kromosomom (Slika 4.). Morgan i njegov tim su nastavili s provođenjem eksperimenata u kojima su identificirali brojne mutacije i pratili njihove obrasce nasljeđivanja što ih je dovelo do stvaranja "kromosomske teorije nasljeđivanja" [27]. Otkriveno je da su geni raspoređeni linearno na kromosomima, koji se odvajaju i neovisno razvrstavaju tijekom mejoze [11, 28]. Otkrili su fenomen "genetičko povezivanje", pokazujući kako se geni smješteni jedan blizu drugoga na istom kromosomu nasljeđuju zajedno [28]. Još jedno važno otkriće je bila rekombinacija ili "crossing over", izmjena genetičkog materijala između homolognih kromosoma tijekom profaze mejoze [27, 28]. Rekombinacija može prekinuti fizičke veze gena na nesestrinskim kromatidama, što dovodi do novih kombinacija svojstva i genetičke raznolikosti. Predlažući ideju o križanju, Morgan je također pretpostavio da je učestalost rekombinacija povezana s udaljenosti između gena na kromosomu [28]. Što su dva gena bliža jedna drugom na kromosomu, veća je njihova šansa da se nasljeđuju zajedno, suprotno tome što su udaljeniji veća je vjerojatnost njihovog razdvajanja tijekom rekombinacije. Proučavajući frekvencije rekombinacije između različitih gena, odredili su se relativni položaji gena na kromosomu i dokazali su da snaga veze između dva gena ovisi o udaljenosti između gena na kromosomu [28]. To je dovelo do stvaranja prvih genetičkih mapa 1913. koje su pokazale linearni raspored gena, geni locirani na istom kromosomu bit će zajedno naslijeđeni ako nije došlo do "crossing overa" [11, 28]. Rad Morgana s vrstom *Drosophila melanogaster* imao je dubok utjecaj na polju genetike te je postavio temelje molekularne genetike. Potvrdio je kromosomsku teoriju nasljeđivanja i uspostavio načela genetičkog povezivanja i rekombinacije [28]. Njegova saznanja su dovela do razvoja genetičkog mapiranja pomoću kojeg se određuje relativni položaj gena na kromosomu [28]. Genetičke karte ključni su alat za proučavanje genetike te su znatno olakšale istraživanja evolucije i populacijske genetike [28]. Morganovo shvaćanje kako su geni smješteni na kromosomu otvorilo je put prema velikom otkriću DNA kao genetičkog materijala te potpomoglo je kasnijem shvaćanju molekularnih mehanizama ekspresije i regulacije gena [28].

3.2.2 Genska regulacija i kontrola

Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu 1965. zajednički je dodijeljena Françoisu Jacobu, Andréu Lwoffu i Jacquesu Monodu za njihova otkrića genetičke kontrole sinteze enzima i replikacije virusa [29]. Njihovo istraživanje razjasnilo je regulatorne mehanizme koji upravljaju ekspresijom gena, razrješavaju model operona, te kako se geni uključuju i isključuju u bakterijama [30]. François Jacob francuski biolog, značajno je pridonio molekularnoj biologiji naročito u području regulacije gena. Poznato je da geni nose informaciju za sintezu proteina, ali mehanizmi koje stanice koriste za regulaciju ekspresije gena kao odgovor na promjene u okolišu bili su nepoznati [30]. Jacobov rad je pružio odgovore na nepoznanice i započeo put modernog polja molekularne genetike. Jacques Monode bavio se sličnim pitanjima kao Jacob. Istraživanja je provodio zajedno u suradnji s F. Jacobom, te je najznačajnije otkriće za obojicu je bila formulacija modela operon; objašnjenje kako bakterije reguliraju ekspresiju gena [30]. Njihove studije usmjerene su na lac operon bakterije *Escherichia coli*, skup gena uključen u metabolizam laktoze. Uvode koncept teleonomije (engl. *teleonomy*) koja opisuje ciljno orijentiranu i prilagodljivu prirodu bioloških procesa, te pomaže u razumijevanju složenosti bioloških sustava [30]. Monod i Jacob su predložili kako genetički kod ne sadrži samo informacije za izgradnju proteina, već i regulatorne sekvence koje kontroliraju kada i gdje se ti proteini proizvode [30]. Osiguravaju odvijanje bioloških procesa na visoko organiziran način, što dovodi do teleonomskog ponašanja [31]. Regulacija ekspresije gena temeljni je teleonomski mehanizam. Ona osigurava sintetiziranje proteina u pravo vrijeme, na pravom mjestu i u odgovarajućim količinama, omogućujući organizmu prilagodbu i napredovanje. Mehanizmi povratne sprege ključni su za održavanje homeostaze i regulaciju metaboličkih putova. Dostupnost supstrata i krajnjih proizvoda utječu na aktivnost enzima, tako osiguravajući točnu količinu odgovora i zaustavljanje procesa kad se postigne cilj. Teleonomski mehanizmi pružaju stanicama prilagodbu na promjene u njihovoj okolini, osiguravajući im preživljavanje i optimalno funkcioniranje unutar organizma [31]. Razumijevanje teleonomije pomoglo im je u shvaćanju kako stanice reguliraju ekspresiju gena u metabolizmu laktoze, odnosno razumijevanje modela operona [30]. Operon je skup funkcionalno povezanih gena (strukturni geni) kojima upravlja jedan prekidač za uključivanje ili isključivanje (kontrolni elementi) [31]. Primarni elementi operona su strukturni geni, promotor, operator, te ponekad i regulatorni gen koji se nalazi izvan operona [31]. Strukturni geni kodiraju proteine koji

obavljaju specifične funkcije, ti se geni prepisuju zajedno kao jedna glasnička RNA (mRNA) [31]. Promotor je sekvenca DNA na koju se veže RNA polimeraza kako bi se započela transkripcija operona, vodi ključnu ulogu u određivanju hoće li se geni transkribirati [31]. Između promotora i strukturalnih gena nalazi se operator, regulatorna sekvenca DNA za koju se može vezati represor (regulatorna alosterička bjelančevina) i o tome ovisi hoće li se dogoditi transkripcija genetičke informacije sa strukturalnih gena (Slika 5.) [31]. Model na kojem su otkrili strukturu i funkciju operona bio je lac operon (skup gena koji su uključeni u metabolizam laktoze) prokariota, čiji su strukturalni geni kodirali enzime potrebne za metabolizam laktoze [30, 31]. Izvan operona postoji regulacijski gen (*lacI*) koji proizvodi represorski protein, u slučaju odsutnosti laktoze on se veže na operator čime sprječava transkripciju strukturalnih gena blokiranjem RNA polimeraze [30]. Postoji još i induktor, to je u ovom slučaju laktoza koja se veže na represor, uzrokujući njegovu promjenu oblika i rezultira oslobađanjem operatora. Oslobađanjem operatora RNA polimeraza ima pristup strukturalnim genima i njihovom prepisivanju, dolazi do proizvodnje enzima potrebnih za metabolizam laktoze (Slika 5.).

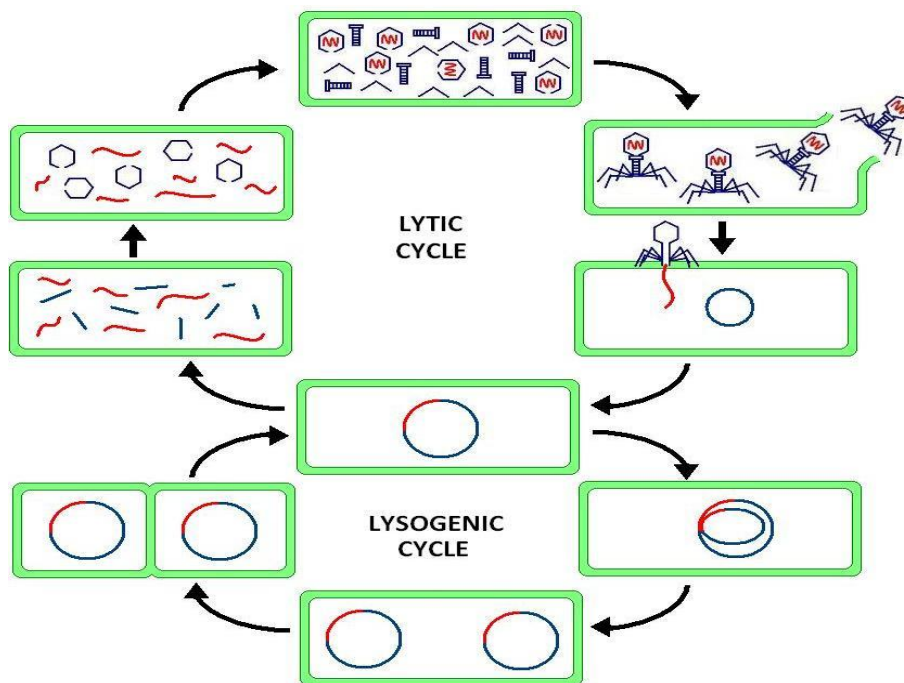


Slika 5. Model lac operona. Lijeva slika - represor je aktivan i vezan za operator, onemogućuje vezanje RNA-polimeraze za promotor, nema transkripcije strukturalnih gena (*lacZ*, *lacY*, *lacA*). Desna slika - inaktivacija represora laktozom (induktor), RNA-polimeraza veže se za promotor što rezultira transkripcijom strukturalnih gena i proizvodnjom enzima potrebnih u metabolizmu laktoze.

Izvor: (<https://media.cheggcdn.com/media/1cf/1cf7cb5d-26d3-4063-99cd-b8680b70d334/php5wrqv8>)

Razjašnjavajući mehanizme regulacije gena, model operona objasnio je kako se stanice mogu prilagoditi promjenama okoliša kontroliranjem proizvodnje enzima i drugih proteina [31]. Andre Lwoff francuski mikrobiolog, značajno pridonio razumijevanju replikacije virusa i regulaciji ekspresije gena u bakterijama [32]. Fokus istraživanja je bio na bakteriofagima, virusi koji inficiraju bakterije, te njihovim interakcijama sa stanicom domaćina. Lwoffovo istraživanje 1953. pružilo je uvide u virusne mehanizme i time postavilo temelje modernoj virologiji i molekularnoj genetici [32].

Ključni pronalasci virusnih mehanizama je lizogenija, temeljni rad Lwoffa. Lizogenija je proces kojem bakteriofag (virus) integrira svoj genetički materija, poznat kao profag, u bakterijski genom domaćina [32]. U tom stanju mirovanja, profagi se zajedno recipliraju s genomom domaćina tijekom stanične diobe, bez izazivanja lize ili smrti stanice [32]. Za razliku od lizogenije, litički ciklus je vrijeme kada se bakteriofag aktivno razmnožava, što na kraju dovodi do uništenja bakterijske stanice i otpuštanja većeg broja bakteriofaga [32]. Prebacivanje između lizogenih i litičkih ciklusa strogo je regulirano različitim genetičkim elementima i čimbenicima okoliša (Slika 6.).



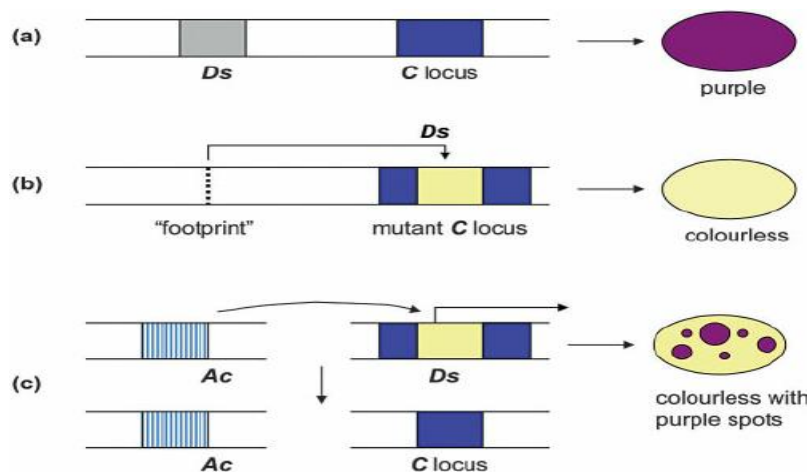
Slika 6. Lizogeni i litički ciklus bakteriofaga λ . Gore- litički ciklus, proizvodnja novih virusnih čestica i uništenje stanice domaćina (smrt), otpuštanje većeg broja bakteriofaga. Dolje- lizogeni ciklus, virusna DNA u stanju profaga, zajedno se replicira s DNA domaćina bez nanošenja štete, stanje mirovanja. Izvor: (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5040662>)

U stanju profaga, specifični represorski proteini, koje kodira fag, vežu se na virusnu DNA i inhibiraju transkripciju gena potrebnih za litički ciklus [32]. Okidači iz okoliša kao što su UV zračenje, kemijski mutageni ili stanični stres mogu potaknuti profage da se izluče iz bakterijskog genoma i uđu u litički ciklus, što dovodi do proizvodnje novih faga i lize stanice domaćina (Slika 6.). Otkriće lizogenije objasnilo je latenciju virusa u složenijim organizmima, uključujući čovjeka. Mnogi virusi, kao što su herpes i retrovirusi, mogu ući u latentno stanje slično bakterijskoj lizogeniji, gdje ostaju neaktivni unutar stanica domaćina dulje vrijeme [32]. Razumijevanje okidača i mehanizama za reaktivaciju virusa bilo je ključno za razvoj tretmana za latentne virusne infekcije. Zajednički napor Françoisa Jacoba, Andréa Lwoffa i Jacquesa Monoda predstavljali su prijelomni trenutak u povijesti molekularne biologije postavljajući temeljna načela regulacije gena, dovodeći do dubljeg razumijevanja temeljnih procesa života.

3.2.3 Mobilni genetički elementi i dinamika genoma

Mnoge karakteristike organizma određene su nasljeđem, to jest njihovim genima koji su pohranjeni u kromosomima unutar jezgre njihovih stanica. Barbara McClintock proučavala je nasljedne karakteristike kukuruza, posvećujući pažnju različitoj boji zrna. Dokazala je da genetički elementi ponekad mogu promijeniti svoj položaj na kromosomu, te da to uzrokuje aktivnost ili neaktivnost obližnjih gena [33]. Za svoje otkriće mobilnih genetičkih elemenata, također poznatih kao „skakući geni“ u kukuruza, dobila je 1983. godine Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu [33]. Njezin rani rad uključivao je detaljne mikroskopske analize kromosoma tijekom stanične diobe. Razvila je tehniku bojanja kromosoma, kako bi bili vidljivi pod mikroskopom omogućavajući time promatranje i identificiranje različitih kromosomskih struktura i abnormalnosti [34]. Njen vrlo važan rad je bio na genetičkoj rekombinaciji, na modelu crossing over-a. 1930-ih je dokazala da se genetički materijal može razmjenjivati između homolognih kromosoma tijekom mejoze, što rezultira novim kombinacijama gena i genskoj raznolikosti [34].

Najpoznatije otkriće McClintock bilo je 1950-ih kada je identificirala prenosive lokuse u kukuruza koji su pokazivali visoku stopu mutacije [34]. Lokusi su bili povezani s kromosomskim lomom i ponovnim spajanjem, što je dovelo do promjena u ekspresiji gena i fenotipskih varijacija u zrnu kukuruza [34]. Sustavom Ac-Ds identificirala je dvije ključne vrste prijenosnih elemenata u kukuruza: aktivatorske (Ac) i disocijacijske (Ds) elemente [34]. Aktivator (Ac) je autonomni prijenosni element, što znači da se može sam transportirati jer kodira enzim transpozazu [34]. Disocijacijski element (Ds) je neautonomni prijenosni element, za njegov transport potrebna je prisutnost aktivatora (Ac) koji može aktivirati kretanje Ds elementa (Slika 7.). Enzim transpozaza prepoznaje specifične sekvence na krajevima elemenata Ac i Ds, omogućavajući im rezanje i umetanje u nova mjesta unutar genoma [35]. Kada je Ac element aktivan, može uzrokovati pomicanje elemenata Ds koje često rezultira lomom kromosoma i ponovnim spajanjem, izazivajući genske nestabilnosti (mutacije gena i varijacije) [35]. Takve transpozicije često rezultiraju fenotipskim promjenama u kukuruza, kao na primjer promjena boje u zrnu.



Slika 7. Sustav Ac-Ds, prenosivi elementi: aktivatorski (Ac) i disocijacijski (Ds) elementi. Promjena boje u zrnu kukuruza transpozicijom. A) normalni gen C, ljubičasta boja kukuruza B) element Ac aktivira kretanje elementa Ds, Ds se može transponirati u gen C, dobije se mutirani gen C žute boje C) Ac aktivira izbacivanje Ds-a iz gena C, gen C se obnavlja, promjena boje u žuto-ljubičastu. Izvor: (https://www.researchgate.net/figure/An-unusual-kernel-turning-up-in-a-crossing-experiment-involving-4-000-kernels_fig14_255989394)

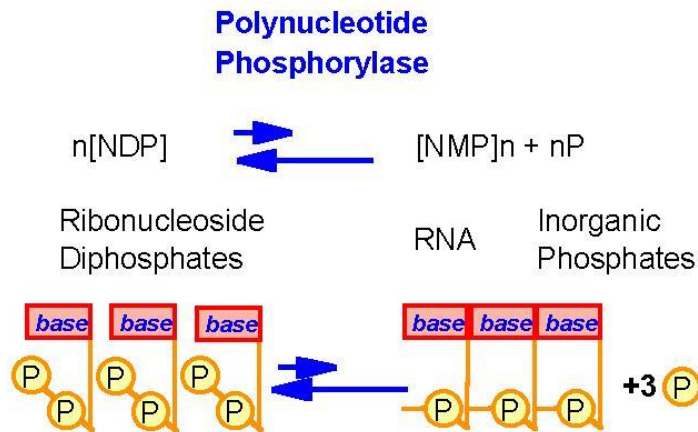
Prenosivi elementi ključnu ulogu imaju i u kontroli ekspresije gena, kada se element umetne u blizini ili unutar gena, može doći do aktiviranja ili deaktiviranja obližnjeg gena što dovodi do promjene u fenotipu [35]. Danas su ti elementi poznati kao DNA transpozoni, "izreži i zalijepi" (engl. *cut and paste*, izrezivanje i umetanje u nova mjesta genoma), te RNA transpozoni ili retrotranspozoni, koji koriste RNA intermedijer (obrnuta transkripcija RNA u DNA prije umetanja u genom). Otkriće prijenosnih elemenata Barbare McClintock revolucioniralo je polje genetike, također je dalo duboko razumijevanje plastičnosti genoma i sposobnosti genoma da se prilagodi promjenjivim okruženjima [35].

3.3 MANIPULIRANJE GENOMOM

3.3.1 Mehanizmi sinteze DNA i RNA

Veliki preokret u znanosti nakon otkrića strukture DNA bio je rad Severo Ochoa i Arthura Kornberga opisujući mehanizme biološke sinteze RNA i DNA. Za ta otkrića im je dodijeljena Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu 1959. godine [36]. Ključno otkriće na temelju kojeg se postavila teorija središnje dogme molekularne biologije, koja opisuje protok informacija gena od DNA do RNA do proteina [36]. Veliku su ulogu imali u napretku biotehnologije, uključujući tehniku PCR (lančana reakcija polimeraze), sekvenciranje DNA i tehnologiju rekombinantne DNA. Molekula RNA sastavljena je od jednog lanca nukleotida, od kojih svaki sadrži šećer ribozu, fosfatnu skupinu i jednu od četiri baze (adenin, uracil, citozin i gvanin) [37]. Odgovorna je za prijenos genetičkih informacija od DNA do proteina, kroz svoje različite oblike od kojih svaki ima svoju funkciju. Glasnička RNA (mRNA) bitna za prijenos genetičkih informacija od DNA do ribosoma, transfer RNA (tRNA) prevodi genetički kod u aminokiseline (građevni blokovi proteina), ribosomska RNA (rRNA) čini jezgru strukture ribosoma i pomaže u sastavljanju proteina [37]. Nezamjenjiva molekula koja pokreće ekspresiju gena i regulira stanične funkcije. Biokemičar Severo Ochoa i njegov tim usredotočili su svoje istraživanje na biokemijske procese metabolizma nukleinskih kiselina. Tijekom tih istraživanja naišli su na enzim u bakteriji *Azotobacter vinelandii* koji je mogao katalizirati sintezu RNA [37]. Riječ je o dvofunkcijskom enzimu polinukleotid fosforilaza (PNPaza), za razliku od RNA polimeraze kojoj je potreban DNA kalup za sintezu molekule RNA, PNPaza može sintetizirati RNA neovisno o kalupu, koristeći ribonukleozid difosfate (NDP) kao supstrate [37]. NDP uključuje adenzin difosfat (ADP), gvanozin difosfat (GDP), citidin difosfat (CDP) i uridin difosfat (UDP). Polinukleotidna fosforilaza je velik, multimerni enzim s više počinaca, te veznim mjestima RNA i NDP (aktivno mjesto) [37]. Iako enzim može povezati nukleotide zajedno ta reakcija je reverzibilna. Uspostavilo se kasnije da je predominantna funkcija PNPase u bakterijama i eukariotima razgradnja molekule RNA, a ne njezina sinteza [37]. Sinteza se odvija u smjeru 5' prema 3', tako što 3' hidroksilna skupina rastućeg

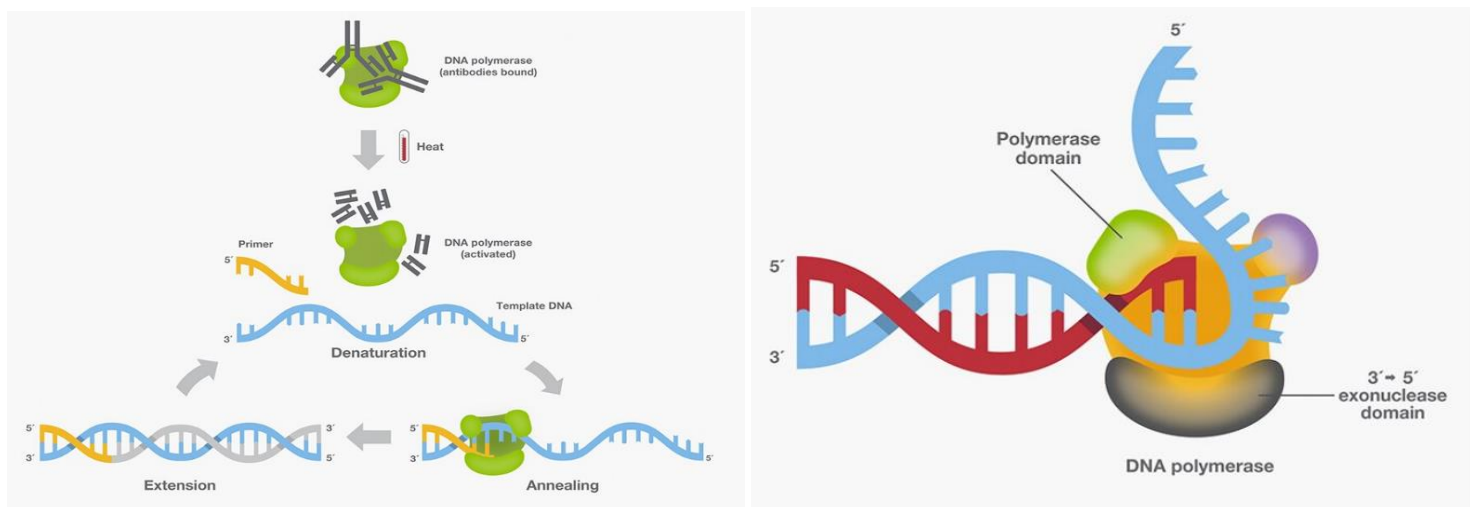
lanca RNA izvodi nukleofilni napad na α -fosfat nadolazećeg NDP-a, stvarajući fosfodietersku vezu i otpuštajući anorganski fosfat (Pi) (Slika 8).



Slika 8. PNPaza katalizira reverzibilnu polimerizaciju ribonukleotida, djelujući kao RNA polimeraza i RNA egzonukleaza ; $(\text{RNA})_n + \text{NDP} \leftrightarrow (\text{RNA})_{n+1} + \text{Pi}$

Izvor: (<https://www.cas.miamioh.edu/~wilsonkg/old/gene2005/images/Pnp.jpg>)

Kada je lanac produljen on se otpušta, te enzim može vezati drugi NDP na svoje aktivno mjesto i nastaviti proces [37]. Aktivnost PNPase ovisi o koncentraciji anorganskog fosfata (Pi) i ribonukleozid difosfat, povišeni Pi rezultira razgradnjom RNA u NDP, a visoka koncentracija NDP-a rezultira sintezom RNA [37]. Ochoa je koristio razne tehnike za proučavanje polinukleotidne fosforilaze, kao što su pročišćavanje enzima, *in vitro* testovi i označavanje nukleotida radioaktivnim tragovima za praćenje tijekom ugradnje u RNA [37]. Arthur Kornberg zajedno sa svojim kolegama 1956. godine je izolirao i identificirao enzim u bakterije *Escherichia coli* koji je imao sposobnost sintetizirati DNA *in vitro* [38]. Enzim su nazvali DNA polimeraza I ključan za replikaciju DNA iz deoksiribonukleotida. Ima očuvanu strukturu koja nalikuje desnoj ruci s tri domene: dlan, prsti i palac. Domena dlana sadrži aktivno mjesto za katalizu, odgovorna za vezanje predloška DNA i dNTP-a i stvara fosfodietersku vezu [38]. Domena prstiju veže dolazne dNTP-ove i točno ih postavlja na aktivno mjesto. Domena palca održava stabilnost kompleksa i pomaže u održavanju položaja DNA supstrata (Slika 9).



Slika 9. Struktura DNA polimeraze, nalik desnoj ruci s tri domene: dlan, prsti i palac. Lijevo- Sinteza DNA enzimom DNA polimerazom, za početak sinteze potrebna je početnica sa slobodnim hidroksilnim krajem za vezivanje novih nukleotida.

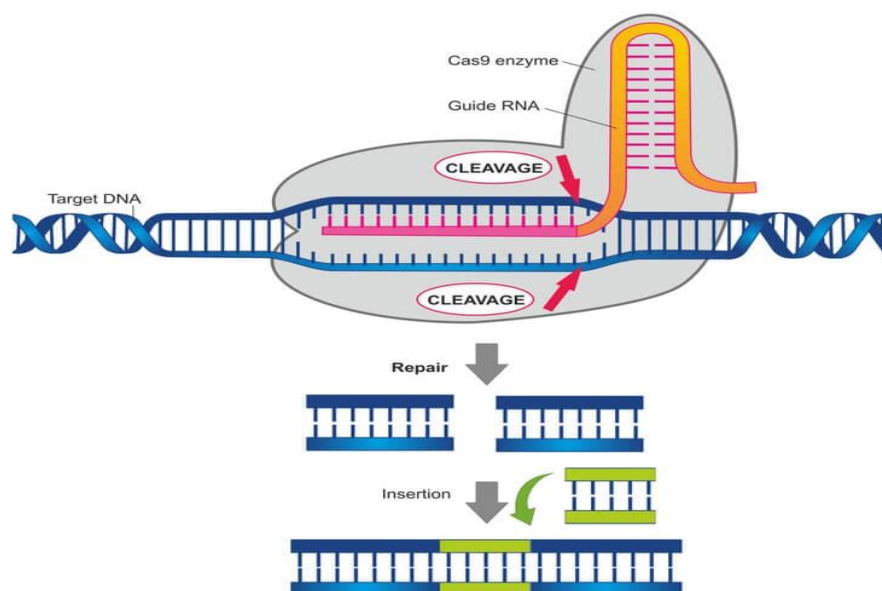
Izvor: (<https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/dna-polymerase-characteristics.html>)

DNA polimeraza I katalizira stvaranje DNA dodavanjem deoksinukleotid trifosfata (dNTP) na 3' kraj rastućega lanca početnice, koji je komplementaran lancu predloška [38]. DNA polimeraza ne može započeti sintezu *de novo* već zahtijeva početnicu, kratki RNA ili DNA lanac koji osigurava slobodnu 3' hidroksilnu skupinu za vezivanje novog dNTP (Slika 9). Enzim odabire točan nukleotid ovisno o komplementarnosti s matičnim lancem. Stvara se fosfodieterska veza između 3' hidroksilne skupine rastućeg lanca DNA i 5' fosfatne skupine pridošlog dNTP-a uz otpuštanje anorganskog pirofosfata (PPi) [38]. Nakon toga enzim se premješta na sljedeću poziciju na lancu. Osim sposobnosti sinteze DNA polimeraza ima 3' do 5' egzonukleaznu aktivnost, koja joj omogućava popravak DNA uklanjanjem pogrešno ugrađenih nukleotida [39]. Osim toga uključena je u uklanjanje RNA početnice i popunjavanje praznina tijekom replikacije DNA. Razumijevanje mehanizama sinteze RNA i DNA bilo je ključno za razbijanje genetičkog koda, te za razvoj temeljnih alata u genetičkim istraživanjima. Njihovo istraživanje je također pridonijelo u razumijevanju genskih bolesti i kako mutacije u DNA mogu dovesti do njih.

3.3.2 Genetički inženjering i uređivanje genoma

Tehnologija koja je omogućila znanstvenicima izvođenje vrlo preciznih modifikacija DNA živih organizama, te otvorila nove mogućnosti u medicini, poljoprivredi i biološkim istraživanjima je CRISPR-Cas9. Ovaj revolucionarni rad čini jednu od novijih Nobelovih nagrada za kemiju, dodijeljenju 2020. godine Emmanuelle Charpentier i Jennifer A. Doudna [40]. U sedam desetljeća otkrića dvostruke zavojnice DNA, tehnologije za analizu, manipulaciju i sintezu DNA omogućila su značajan napredak u biološkim istraživanjima. Modificiranje genoma je ipak specifična tehnologija koja je dugo ostala nepoznanica. Prije tehnike CRISPR-Cas9 postojali su alati za uređenje genoma kao što su nukleaza cinkovog prstena (ZFN) i efektorske nukleaze slične aktivatoru transkripcije (engl. *Transcription activator-like effector nucleases*, TALEN). Imali su isti cilj uređivanja gena, ali njihov ograničen kapacitet ciljanja i komplicirani dizajn otežali su uporabu. CRISPR-Cas9 je prva tehnika koja je imala veliku uspješnost zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti. CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) je skraćenica za grupirana pravilno raspoređena kratka palindromska ponavljanja [40]. To su ponavljajuće sekvence DNA koje se nalaze u genomima bakterija i arheja, CRISPR-Cas9 sustav omogućuje mikroorganizmima obranu od virusnih infekcija [40]. Ovaj obrambeni mehanizam prepoznaje i ugrađuje fragmente virusne DNA u genom domaćina kao razmaknice unutar CRISPR niza stvarajući genetički zapis infekcija, koji je prenosiv na „potomke“ i osiguravajući imunost narednim generacijama [40]. Cas9 je protein, DNA endonukleaza koja inducira dvolančane prekide (DSB) u DNA na određenim mjestima [40]. Dobiva se iz bakterija i služi kao par „molekularnih škara“. Emmanuelle Charpentier tijekom istraživanja bakterije *Streptococcus pyogenes* otkrila je tracrRNA (trans-aktivirajuća CRISPR RNA), koja je neophodna za sazrijevanje crRNA (CRISPR RNA) i normalno funkcioniranje CRISPR-Cas9 sustava [41]. Jennifer Doudna proučavala je molekulu RNA i njezinu ulogu u biološkim procesima. Stupile su u suradnju 2011. i zajednički prilagodile sustav CRISPR-Cas9 za uređivanje genoma u eukariotskim stanicama [41]. Važna molekula tracrRNA je ključna komponenta koja vodi protein Cas9 do ciljane DNA, ova molekula se uparuje s crRNA kako bi se formirala dvolančana RNA potrebna za aktivnost Cas9 [41].

Kako bi pojednostavnili sustav napravili su vodeću RNA (engl. *single guide RNA*, sgRNA), sintetičku molekulu RNA sastavljena od dva dijela: CRISPR RNA (crRNA) i tracrRNA (engl. *trans-activating*) [41]. Sastoji se od sekvence od dvadeset nukleotida komplementarne ciljnoj DNA koja je programirana za prepoznavanje i vezanje na specifičnu sekvencu unutar genoma, te sekvence skele (engl. *scaffold tracrRNA sequence*), dvolančana struktura koja se veže na Cas9 [41]. Kada se vodeća sgRNA veže za komplementarnu ciljnu DNA sekvencu, Cas9 prolazi kroz konformacijsku promjenu dovodeći katalitičke domene proteina u položaj za cijepanje DNA [41]. Reže DNA inducirajući pritom dvolančani prekid u ciljno definiranoj poziciji DNA (Slika 10).



Slika 10. CRISPR-Cas9 mehanizam, kompleks sgRNA i Cas9 enzim režu ciljnu sekvencu molekule DNA stvarajući lančani lom, zbog toga će se uključiti popravci DNA: NHEJ i HDR

Izvor: (<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTuJD8KCANLdLrv4mQ-7Kbm2CDd3hTN9FuQMw&w>)

Nakon dvolančanog loma DNA (engl. *double strand break*, DSB) aktiviraju se dva prirodna mehanizma popravka stanice: nehomologno spajanje krajeva (engl. *Non-homologous end joining*, NHEJ) i popravak usmjeren homologijom (HDR) [41]. NHEJ je put popravka sklon pogreškama koji ponovno spaja polomljene krajeve DNA, može dovesti do umetanja ili brisanja nukleotida (indeli) na mjestu cijepanja tj. pomaka okvira čitanja koji rezultira točkastim mutacijama [41]. HDR je precizan put popravka koji koristi kalup molekule DNA za sigurnije usmjeravanje

popravka DSB-a, omogućava preciznije brisanje, umetanje ili zamjenu sekvence DNA [41]. Mehanizmi NHEJ i HDR ključni su za određivanje ishoda uređivanja genoma. Tehnika CRISPR-Cas9 omogućava ciljnu modifikaciju gena ne samo u mikroorganizmima i nižim eukariotima, već je moguće i kod biljnih i ljudskih stanica [41]. Ispravljanjem mutacija izravno u molekulama DNA pogođenih stanica, CRISPR-Cas9 može ponuditi lijekove za bolesti kao što su anemija srpastih stanica, cistična fibroza i mišićna distrofija [41]. Osim toga ova tehnika se koristi u proučavanjima raka stvaranjem modela ljudskih tumora i uređivanjem imunoloških stanica, te ima veliki potencijal za primjenu u borbi protiv virusnih infekcija kao što je HIV [41]. Unatoč njezinom velikom potencijalu u poljima medicine, nailazi na etičku i regulatornu prepreku. Naročito u pitanju uređivanja zametne linije, zbog vrlo ozbiljnih posljedica koje mogu kulminirati nakon upotrebe tehnike [42]. Budući da ima ograničenja, tehnika se najčešće koristi u poljoprivredi i modelnim organizmima u svrhu istraživanja i unapređenja njezinog korištenja [43].

3.4 UTJECAJ OTKRIĆA NA ZNANOST I MEDICINU

Otkrića u biologiji i kemiji nagrađena Nobelovom nagradom imala su značajan utjecaj na znanost i medicinu, proširujući vidike razumijevanja života i omogućavajući nove tretmane bolesti. Razotkrivanje DNA i RNA označio je veliki korak u znanosti, F. Crick i J. Watson razjasnili su strukturu dvostruke zavojnice i otkrili kako se genetičke informacije pohranjuju i repliciraju [19]. Postavili su temelje molekularnoj biologiji, modernoj genetici te tehnikama sekvenciranja i manipuliranja molekulom DNA [19]. Uz pomoć saznanja iz područja genetike i molekularne biologije, bio je moguć razvitak kompleksnih laboratorijskih tehnika poput genskog testiranja; dijagnoza genskih bolesti, identifikacija nositelja i rizika od bolesti, te genske terapije (tehnikе za popravak mutiranih gena). Marshal Nirenberg objasnio je dešifriranje genetičkog koda kao procesa prevođenja informacija od DNA do RNA do proteina [14]. Razumijevanje molekule RNA, njezinih struktura i funkcija dovelo je do stvaranja mRNA cjepiva, cjepivo koje se koristi u borbi protiv zaraznih bolesti kao što je bio COVID-19 [37], kao i za razvoj tehnologija poput PCR-a, koji koristi RNA početnice za detekciju patogena i genskih mutacija, te terapije RNA interferencije, koja cilja i utišava specifične gene u tretmanima kao što je terapija raka. Istraživanje DNA i RNA kulminiralo je Projektom ljudskog genoma (mapirani svi ljudski geni), dovelo je do stvaranja genetičkih modificiranih organizama (GMO) i značajnijeg napretka u istraživanju raka [16]. Poznavanje nositelja gena postavilo je temelje za sva istraživanja, rad T.H. Morgana objašnjava kromosomsku teoriju nasljeđa, vezne gene i osobine povezane sa spolom [27]. Postavio je temelje moderne genetike, razjasnio kako su geni organizirani i kako se prenose iz generacije u generaciju. Morganova otkrića razvijaju medicinsku genetiku, pomažući u razumijevanju genetičkih poremećaja i njihova nasljeđa, te modernu biotehnologiju i genomiku (identifikacija gena i mapiranje) [27]. Najmlađe otkriće uređivanja genoma s pomoću tehnologije CRISPR-Cas9, revolucionarno je polje genetike i biomedicinskih istraživanja [40]. Primjena u genskoj terapiji, omogućuje modifikaciju genskog materijala i ispravljanje mutacija kao što su cistična fibroza, anemija srpastih stanica i mišićna distrofija [43]. Genska terapija može biti *in vivo* uređivanje gena izravno unutar tijela, te *ex vivo* uređivanje izvan tijela u izoliranim stanicama koje se potom vraćaju [41]. Ciljna terapija se koristi u liječenju raka; inženjering imunoloških stanica (T-stanice), te u liječenju Alzheimerove i Huntingtonove bolesti [42]. Koristi se još u borbi protiv virusnih infekcija HIV-a i hepatitisa B. Iako vrlo obećavajuća, ova tehnika je još uvijek u razvitku te time nosi visoku

stopu pogrešaka u primjeni na živim organizmima. Samim time, nameću se razna etička pitanja i problemi prilikom njenog korištenja u svrhu tretiranja ljudi. Zanimljiv je slučaj Dr. He Jiankui iz 2018. koji je nedozvoljeno upotrijebio CRISPR-Cas9 tehniku za uređivanje genoma dviju novorođenih djevojčica blizanki [43]. Cilj mu je bio stvoriti otpornost na HIV onesposobljavanjem gena CCR5, koji kodira za protein koji HIV koristi za ulazak u stanice [43]. Bio je uspješan, ali to je izazvalo veliku kontroverzu. Korištenje tehnike može dovesti do nepoznatih i potencijalno štetnih posljedica (cijepanje izvan cilja), do mozaicizma (mješavina uređenih i neuređenih stanica), te neizvjesnost o sigurnosti i učinkovitosti uređenih zametnih linija u budućim generacijama [44]. Svjetska znanstvena i etička zajednica reagirala je šokirano i osuđujuće, mnogi znanstvenici su kritizirali eksperiment kao preuranjen, neetičan i nepromišljen. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Nacionalni institut za zdravlje (NH) pozvale su strože propise i nadzor tehnologije za uređenje gena [44]. Iako su se složili kako tehnika ima golem potencijal, njegova upotreba u uređivanju ljudske zametne linije još nije spremna za medicinsku primjenu. Osim u medicini koristi se u poljoprivredi stvarajući otpornost na bolesti, povećavajući nutritivni sadržaj prehrambenih proizvoda i razvoj sojeva otpornih na vremenske nepogode [45]. Također radi na poboljšavanju domaćih životinja (otpornost na bolesti) i razvoju sintetičke biologije; genetsko modifikacije mikroorganizama za olakšanu proizvodnju bioloških molekula. CRISPR-Cas9 ima ogroman potencijal za rješavanje izazova našeg vremena, međutim nužno je razmotriti etička i regulatorna pitanja kako bi se osigurala sigurna primjena ove tehnologije.

3.5 NOBELOVE NAGRADE

Kronološki je prikazan pregled Nobelovih nagrada za medicinu, fiziologiju i kemiju dodijeljenih za istraživanje strukture molekula DNA i RNA, mehanizama njihova nasljeđivanja, replikacije i ekspresije gena, popravka oštećenja na tim molekulama, funkcija u staničnim mehanizmima, mehanizmima ugradnje u genom domaćina, mehanizmima editiranja rekombinantnom tehnologijom, te tehnikama umnožavanja sekvenci i sekvenciranja nukleinskih kiselina DNA i RNA te vizualizacije i detekcije.

Nobelove nagrade za fiziologiju i medicinu:

1910. Albrecht Kossel je nagrađen za svoj rad na kemiji nukleinskih kiselina i proteina [46].

1933. Thomas Hunt Morgan je nagrađen za otkriće uloge kromosoma u nasljeđivanju [46].

1946. Hermann J. Muller je odlikovan za izazivanje mutacija zračenjem X-zrakama [46].

1958. George Wells Beadle i Edward Lawrie Tatum dijele nagradu s Joshuom Lederbergom. Beadle i Tatum dobili su priznanje za otkriće kako geni reguliraju određene kemijske procese, a Lederbergu za otkrića genetske rekombinacije i organizacija genetskog materijala bakterija [46].

1959. Severo Ochoa i Arthur Kornberg su podijelili nagradu za otkriće mehanizama u biološkoj sintezi RNA i DNA [46].

1962. Francis Harry Compton Crick, James Dewey Watson i Maurice Hugh Frederick Wilkins su podijelili nagradu za otkrića molekularne strukture nukleinskih kiselina i njezinog značaja za prijenos informacija u živim bićima [46].

1965. François Jacob, André Lwoff i Jacques Monod dijele nagradu za otkriće mehanizma genske kontrole sinteze enzima i replikacije virusa [46].

1968. Robert W. Holley, Har Gobind Khorana i Marshall W. Nirenberg su nagrađeni za tumačenje genetičkog koda i njegove funkcije u sintezi proteina [46].

1969. Max Delbrück, Alfred D. Hershey i Salvador E. Luria su nagrađeni za otkriće mehanizma replikacije i genetske strukture virusa [46].

1975. David Baltimore, Renato Dulbecco i Howard Martin Temin dijele nagradu za otkriće interakcije između tumorskih virusa i genetskog materijala stanice [46].

1978. Werner Arber, Daniel Nathans i Hamilton O. Smith su nagrađeni za otkriće restriksijskih enzima i njihovu primjenu na polju molekularne genetike [46].

1980. Baruj Benacerraf, Jean Dausset i George D. Snell dijele nagradu za otkriće genetički određenih struktura na površini stanice koje reguliraju imunološke reakcije [46].

1983. Barbara McClintock je nagrađena za otkriće mobilnih genetičkih elemenata u kukuruzu [46].

1987. Susumu Tonegawa je nagrađen za otkriće genetičkog principa nastanka raznolikosti antitijela [46].

1993. Richard J. Roberts i Phillip A. Sharp dijele nagradu za otkrića podijeljenih gena (engl. *split genes*) i prekrajanja RNA [46].

1995. Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard i Eric F. Wieschaus dijele nagradu za otkriće genetske kontrole ranog embrionalnog razvoja i tjelesnog ustroja (engl. *pattern formation*) [46].

2001. Leland H. Hartwell, Tim Hunt i Sir Paul M. Nurse dijele nagradu za otkriće ključnih regulatora staničnog ciklusa [46].

2002. Sydney Brenner, H. Robert Horvitz i John E. Sulston dijele nagradu za otkriće genetske regulacije razvoja organa i programirane stanične smrti [46].

2003. Paul L. Modrich, Aziz Sancar i Tomas Lindahl su nagrađeni za otkrića mehanizama popravka DNA [46].

2006. Andrew Z. Fire i Craig C. Mello nominirani su za otkriće RNA interferencije [46].

2007. Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans i Oliver Smithies su nagrađeni za princip uvođenja specifičnih modifikacija gena kod miševa korištenjem embrionalnih matičnih stanica [46].

2009. Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider i Jack W. Szostak su nominirani za otkriće telomera i enzima telomeraze [46].

2012. Sir John B. Gurdon i Shinya Yamanaka su podijelili nagradu za otkriće kako se zrele stanice mogu reprogramirati u pluripotentne [46].

2017. Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash i Michael W. Young su nagrađeni za otkrića molekularnih mehanizama koji kontroliraju cirkadijalni ritam [46].

Nobelove nagrade iz kemije:

1948. Arne Tiselius je nagrađen za elektroforezu i otkriće strukture bjelančevina krvnoga seruma [47].

1957. Lord (Alexander R.) Todd je nagrađen za rad na nukleotidima i nukleotidnim koenzimima [47].

1958. Frederick Sanger je nominiran za rad na strukturi proteina, posebno inzulina [47].

1972. nagrada je dodijeljena Christianu B. Anfinsenu za njegov rad na ribonukleazi, te Stanfordu Mooreu i Williamu H. Stein za razumijevanju odnosa kemijske strukture i katalitičke aktivnosti aktivnog centra molekule ribonukleaze [47].

1980. Paul Berg, Walter Gilbert i Frederick Sanger su podijelili nagradu, Berg za temeljna istraživanja biokemije nukleinskih kiselina. Gilbert i Sanger dobili su priznanje za svoj doprinos u određivanju slijeda baza u nukleinskim kiselinama [47].

1982. Aaron Klug je nominiran za razvoj kristalografske elektronske mikroskopije i tumačenje strukture biološki važnih kompleksa nukleinske kiseline i proteina [47].

1989. Sidney Altman i Thomas R. Cech nagrađeni su za otkriće katalitičkih svojstava RNA [47].

1993. Kary B. Mullis i Michael Smith su podijelili nagradu. Mullis je dobio priznanje za razvoj metode lančane reakcije polimerazom (PCR), a Smith za uvođenje mjesno- usmjerene mutageneze primjenom oligonukleotida (engl. *oligonucleotide-based, site-directed mutagenesis*) i proučavanje proteina [47].

2004. Aaron Ciechanover, Avram Hershko i Irwin Rose su nagrađeni za otkriće razgradnje proteina posredovane ubikvitinom [47].

2006. Roger D. Kornberg - nominiran za svoje studije o molekularnoj osnovi eukariotske transkripcije [47].

2008. Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien su nagrađeni za otkriće zelenog fluorescentnog proteina (engl. *green fluorescent protein, GFP*) i njegove primjene u fluorescencijskoj mikroskopiji [47].

2009. Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz i Ada E. Yonath su nagrađeni za proučavanja strukture i funkcije ribosoma [47].

2015. Tomas Lindahl, Paul L. Modrich i Aziz Sanchar su nominirani za istraživanja mehanizama popravka DNA [47].

2018. Frances H. Arnold je nagrađena za usmjerenu evoluciju enzima [47].

2018. George P. Smith i Sir Gregory P. Winter nominirani su razvoj laboratorijske tehnike koja uključuje korištenje bakteriofaga (engl. *phage display*) za proučavanje interakcija proteina. Metoda se bazira na ugradnji stranog gena u DNA bakteriofaga, što rezultira ekspresijom peptida ili

proteina na površini faga. Stvaranjem velikih biblioteka različitih peptida ili proteina (engl. *library of peptides or proteins*) moguće je identificirati proteine koji se specifično vežu na druge molekule (poput antitijela ili receptora).[47].

2020. Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna su nagrađene za razvoj tehnologije za uređivanje gena CRISPR-Cas9 [47].

4. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja nagrađenih Nobelovom nagradom, počevši s otkrićem dvostruke zavojnice do razvoja naprednih tehnika genetičkog inženjeringa, značajno unapređuju razumijevanje znanosti i medicine. Nakon otkrića molekularne strukture nukleinskih kiselina i njihove važnosti u prijenosu informacija u živim bićima, postavljeni su temelji molekularne biologije koji su utjecali na mnoga kasnija istraživanja i primjene. Znanstvenici poput F. Cricka, J. Watsona, S. Ochoa, A. Kornberga, R. W. Holleya, M. Nirenberga, G. Khorana itd. svojim su otkrićima unaprijedili različite grane znanosti. Objasnili su strukturu DNA, enzime sinteze RNA i DNA, transkripciju genetičkih informacija iz DNA u protein, pravila nasljeđivanja, dinamičku prirodu genoma, genetsku regulaciju i nestabilnost, itd. Razrješavajući strukturu DNA Watson i Crick objasnili su kako se genetičke informacije pohranjuju i kopiraju. Dok dešifriranjem genetičkog koda Holley, Khoran i Nirenberg predložili su skup pravila prema kojima se informacije kodirane u DNA prevode u proteine. Ova dva rada uvjetovali su veliki napredak u molekularnoj biologiji, genetici i medicini, potaknuvši razvoj tehnologije mRNA, genetičkog inženjeringa i razumijevanje genetičkih poremećaja. Tehnologija mRNA u kontekstu cjepiva predstavlja revolucionarni napredak u medicini; koristila se kao glavni resurs u borbi protiv pandemije COVID-19 i kao genska terapija u liječenju cistične fibroze i određenih metaboličkih poremećaja. Osim ovih radova, važna su bila i Ochoina i Kornbergova otkrića enzima polinukleotidne fosforilaze i DNA polimeraze. Poznavanjem ovih enzima daje laboratorijima alate za proučavanje i manipuliranje nukleinskih kiselina, što dovodi do razvoja tehnologije PCR, cjepiva, genske terapije i personalizirane medicine. Njihova su otkrića među otkrićima koji su potaknuli razvoj ciljne terapije lijekovima, poput onih za kroničnu mijeloičnu leukemiju (CML). Oslanjajući se na proučavanje principa replikacije i transkripcije DNA, razvijena je tehnologija za uređivanje gena CRISPR-Cas9, za koju su E. Charpentier i J. A. Doudna dobile Nobelovu nagradu. Ova tehnologija otvara mogućnosti liječenja i prevencije mnogih bolesti, pa čak i genetičkih mutacija. Iako ima golemi potencijal za poboljšavanje zdravlja ljudi i napretka znanosti, suočava se s etičkim i regulatornim izazovima s kojima treba pažljivo upravljati. Radovi ovih dobitnika Nobelove nagrade zajednički su produbili razumijevanje molekularne biologije, genetike i biotehnologije. Integrirana ostavština njihovih otkrića transformirala je medicinu i znanost te i danas potiče inovacije i napredak u tim područjima.

5. LITERATURA

1. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., (2001). Erratum: Initial sequencing and analysis of the human genome: International Human Genome Sequencing Consortium (Nature (2001) 409(860-921)). *Nature*, 412(6846). <https://doi.org/10.1038/35087627>
2. Crocker, J. (1995). Concepts of Genetics. *Molecular Pathology*, 48(4), <https://doi.org/10.1136/mp.48.4.m220-b>
3. Schwarzbach, E., Smýkal, P., Dostál, O., Jarkovská, M., & Valová, S. (2014). Gregor J. Mendel - Genetics founding father. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 50(2), <https://doi.org/10.17221/54/2014-cjgpb>
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). Molecular Biology of the Cell. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1201/9781315735368>
5. Lichtman, M. A. (2017). Alfred Nobel and His Prizes: From Dynamite to DNA. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 8(3), <https://doi.org/10.5041/rmmj.10311>
6. Moss, A. J. (2007). Introductory Note to Alfred Nobel's Will. *Annals of noninvasive electrocardiology: the official journal of the International Society for Holter and Non invasive Electrocardiology*, 12(1), <https://doi.org/10.1111/j.1542-474X.2007.00141.x>
7. Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: Structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* 63(4). <https://doi.org/10.1042/EBC20180038>
8. Lamm, E., Harman, O., & Veigl, S. J. (2020). Before watson and crick in 1953 came friedrich miescher in 1869. *Genetics*, 215(2). <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303195>
9. O'Connor, C. (2008). Discovery of DNA as the hereditary material using *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Education*, 1(1).
10. Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2). <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
11. Morgan, T. H. (1910). Chromosomes and Heredity. *The American Naturalist*, 44(524). <https://doi.org/10.1086/279163>
12. Klug, A. (1968). Rosalind Franklin and the discovery of the structure of DNA. *Nature*, 219(5156). <https://doi.org/10.1038/219808a0>
13. Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356). <https://doi.org/10.1038/171737a0>
14. Berg, P., & Mertz, J. E. (2010). Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology. *Genetics* 184(1). <https://doi.org/10.1534/genetics.109.112144>

15. Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Geer, L. Y., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Ostell, J., Miller, V., ... Yaschenko, E. (2007). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1031>
16. Manchester, K. L. (2008). Historical Opinion: Erwin Chargaff and his “rules” for the base composition of DNA: why did he fail to see the possibility of complementarity? *Trends in Biochemical Sciences*, 33(2). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.009>
17. PAULING, L., COREY, R. B., & BRANSON, H. R. (1951). The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.37.4.205>
18. Crick, F. H. C. (1968). The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology*, 38(3). [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90392-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90392-6)
19. Franklin, R. E., & Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356). <https://doi.org/10.1038/171740a0>
20. Leslie A. Pray, Ph. D. (2008). Discovery of DNA Double Helix: Watson and Crick. *Nature Education*. [https://doi.org/10.1016/S1571-0661\(05\)82577-0](https://doi.org/10.1016/S1571-0661(05)82577-0)
21. Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258). <https://doi.org/10.1038/227561a0>
22. Nobel Prize. (1968). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1968. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1968/summary/>
23. Nirenberg, M., & Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.10.1588>
24. Khorana, H. G., Agarwal, K. L., Besmer, P., Büchi, H., Caruthers, M. H., Cashion, P. J., Fridkin, M., Jay, E., Kleppe, K., Kleppe, R., Kumar, A., Loewen, P. C., Miller, R. C., Minamoto, K., Panet, A., RajBhandary, U. L., Ramamoorthy, B., Sekiya, T., Takeya, T., & van de Sande, J. H. (1976). Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *Escherichia coli*. I. General introduction. *Journal of Biological Chemistry*, 251(3). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33826-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33826-7)
25. Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science*, 147(3664). <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>
26. Nobel Prize. (1933). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1933. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1933/morgan/article/>
27. Morgan, T. H. (1910). Sex limited inheritance in *drosophila*. *Science*, 32(812). <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>

28. Sturtevant, A. H. (1913). The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14(1). <https://doi.org/10.1002/jez.1400140104>
29. Nobel Prize. (1965). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1965. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1965/summary/>
30. Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3(3). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
31. Monod, J., Changeux, J. P., & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of Molecular Biology*, 6(4). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80091-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80091-1)
32. LWOFF, A. (1953). Lysogeny. *Bacteriological Reviews*, 17(4). <https://doi.org/10.1128/membr.17.4.269-337.1953>
33. Nobel Prize. (1983). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1983. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1983/summary/>
34. McCLINTOCK, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
35. McCLINTOCK, B. (1956). Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21. <https://doi.org/10.1101/SQB.1956.021.01.017>
36. Nobel Prize. (1959). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1959. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1959/summary/>
37. Tan, S. Y., & Pettigrew, K. (2018). Severo Ochoa (1905–1993): The man behind RNA. *Singapore Medical Journal*, 59(1). <https://doi.org/10.11622/smedj.2018003>
38. Lasken, R. S., & Kornberg, A. (1988). The primosomal protein n' of *Escherichia coli* is a DNA helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(12). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)60594-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)60594-0)
39. Draper, D. E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *RNA*, 10(3). <https://doi.org/10.1261/rna.5205404>
40. Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
41. Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal* 281(23). <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
42. Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.001>
43. Khoshandam, M., Soltaninejad, H., Mousazadeh, M., Hamidieh, A. A., & Hosseinkhani, S. (2024). Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes and Diseases*, 11(1). <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.02.027>

44. Greely, H. T. (2019). CRISPR'd babies: Human germline genome editing in the "He Jiankui affair." *Journal of Law and the Biosciences*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/jlb/lasz010>
45. Kim, D., Alptekin, B., & Budak, H. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
46. All Nobel Prizes in Physiology or Medicine. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-laureates-in-physiology-or-medicine/>
47. All Nobel Prizes in Chemistry. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes-in-chemistry/>