

# Efikasna rekombinacija između divergentnih sekvenci: uloga $\lambda$ Red proteina

---

Rožić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2010

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:050300>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

EFIKASNA REKOMBINACIJA IZMEĐU DIVERGENTNIH  
SEKVENCI: ULOGA  $\lambda$  RED PROTEINA

**EFFICIENT RECOMBINATION BETWEEN DIVERGED  
SEQUENCES: THE ROLE OF  $\lambda$  RED PROTEIN**

SEMINARSKI RAD

Sara Rožić  
Preddiplomski studij Molekularne biologije  
Undergraduate Study of Molecular biology  
Mentor: doc.dr.sc. Ivana Ivančić Baće

Zagreb, 2010.

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD.....</b>	<b>2</b>
<b>2. EVOLUCIJA GENOMA BAKTERIOFAGA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. TEMPERIRANI BAKTERIOFAGI .....</b>	<b>7</b>
3.1. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA $\Lambda$ FAGA .....	9
3.1.1. RED PUT REKOMBINACIJE.....	11
3.1.2. UTJECAJ MMR SUSTAVA DOMAĆINSKE STANICE <i>E. COLI</i> NA RED SUSTAV FAGA $\lambda$ .....	12
3.1.3. SIMETRIČNI I NESIMETRIČNI REKOMBINACIJSKI DOGAĐAJI .....	12
3.1.4. ULOGA HOMEOLOGNE REKOMBINACIJE U EVOLUCIJI VIRUSNIH GENOMA .....	14
3.1.5. ZAKLJUČAK.....	15
<b>4. EPILOG .....</b>	<b>16</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>6. SAŽETAK.....</b>	<b>19</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>20</b>

## **1.UVOD**

„All the world is a phage“ (Hendrix i sur. 1998)

Virusi (lat. virus-otrov) su najmanji i najjednostavniji mikroorganizmi, obligatni su paraziti što znači da ne mogu živjeti bez domaćinske stanice. Otkrio ih je 1892. godine Dmitrij Josifovič Ivanovski. Ubrajaju se u žive organizme jer posjeduju nukleinsku kiselinu, bilo DNA ili RNA, dvolančanu (dl) ili jednolančanu (jl). No virusi nisu samo asocijacija nukleinske kiseline i proteina – njihova sposobnost da koriste stanični mehanizam za složene procese potrebne za njihovu reprodukciju ukazuje na visoki stupanj specijalizacije. Prema domaćinu kojeg zaposjedaju dijelimo ih na bakterijske, biljne i životinjske viruse. Bakterijski virusi su bakteriofagi ili skraćeno fagi (Tamarin, 1999).

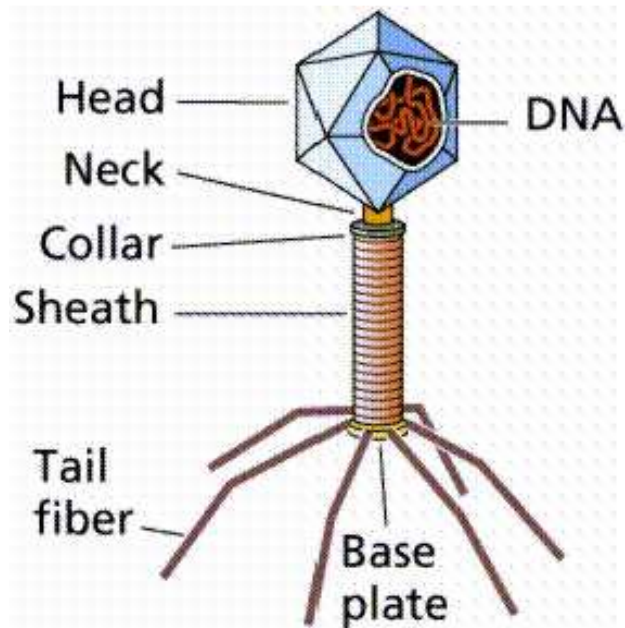
Bakteriofage su neovisno jedan o drugome 1915. otkrila 2 znanstvenika: **Félix d'Herelle** i **Frederick William Twort**, britanski bakteriolog.

*„The next morning, on opening the incubator, I experienced one of those moments of intense emotion which reward the research worker for all his pains: at the first glance I saw that the culture which the night before had been very turbid, was perfectly clear: all the bacteria had vanished, they had dissolved away like sugar in water. As for the agar spread, it was devoid of all growth and what caused my emotion was that in a flash I had understood: what caused my clear spots was in fact an invisible microbe, a filtrable virus, but a virus which is parasitic on bacteria.“ (Dr. Felix d'Herelle, *The bacteriophage*, 1949.)*

Otkriće bakteriofaga omogućilo je brzi razvoj virologije zbog nekoliko razloga: bakterije se vrlo lako uzgajaju, i postoji niz metoda koje su omogućile proučavanje bakteriofaga u bakterijama, a koje nisu postojale za animalne ili biljne viruse.

Bakteriofagi su vrlo raširena skupina virusa i mogu se podijeliti na temelju različitih osobina. Najznačajnija je podijela na VIRULENTNE I TEMPERIRANE FAGE. Virulentni fagi uvijek idu samo u litički ciklus, dakle uvijek dolazi do lize bakterijske stanice, a temperirani fagi imaju mogućnost odabira: oni mogu ići u lizogeno stanje, u kojem se ugrađuju u genom domaćina i njihove funkcije su utišane, te se kao takvi nazivaju profagi. No prilikom induktivnog signala oni mogu prijeći u litički ciklus i lizirati bakteriju. Građeni su od 3 dijela: glave, vrata i repa (Slika 1). Glava je proteinski omotač (kapsida) koja sadrži nasljednu uputu virusa (najčešće je to DNA, iako se može naći i RNA, ali rjeđe). Vrat sadrži kontraktilne filamente koji sudjeluju u ubacivanju virusne nukleinske kiseline u bakterijsku

stanicu. Na repu se nalazi bazalna ploča (sadrži proteine za prepoznavanje) sa “nožicama” koje služe za pričvršćivanje virusa za stanicu domaćina.



Slika 1. Struktura bakteriofaga

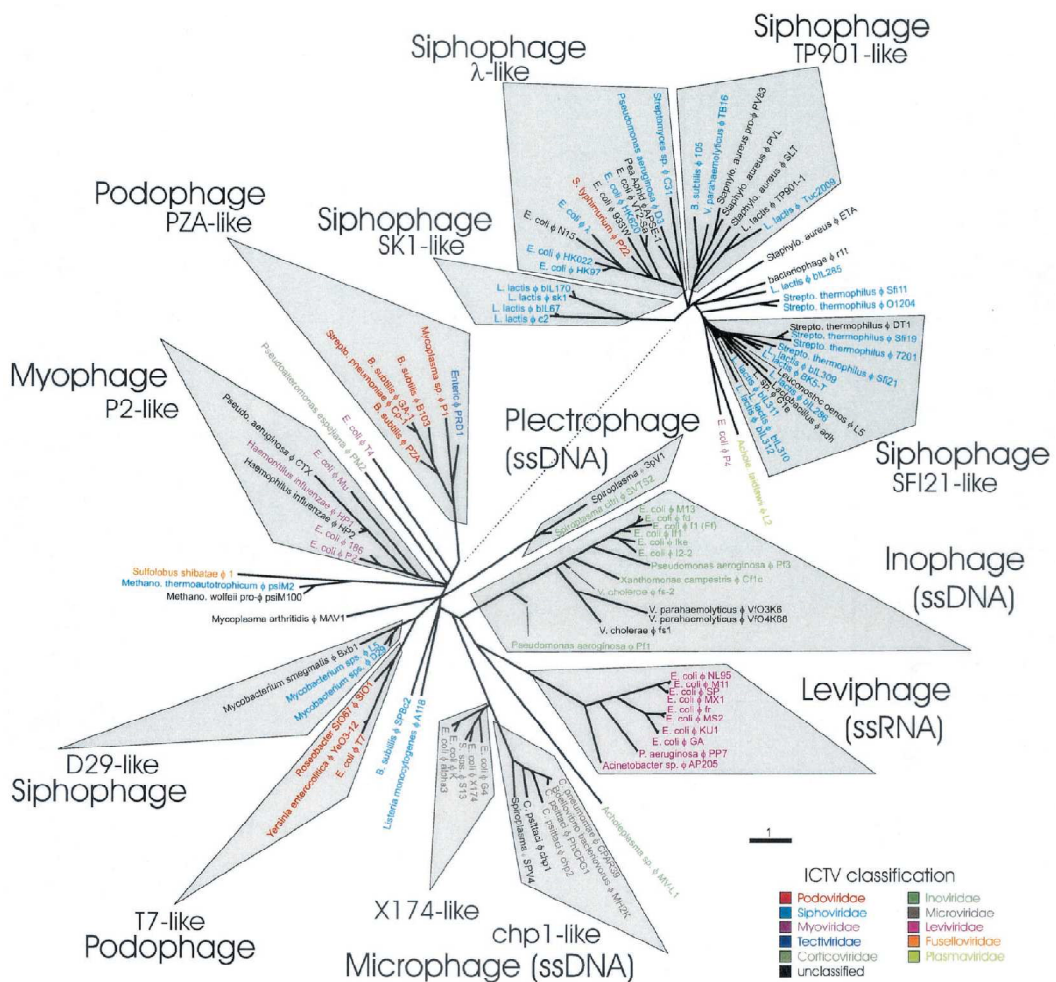
(Preuzeto iz: [www.library.thinkquest.org](http://www.library.thinkquest.org))

Bakteriofagi su obligatni paraziti. Izvan stanice domaćina, oni su inertne molekule. Kada njihov genetički materijal tj. njihova nukleinska kiselina uđe u stanicu, ona preuzima sve metaboličke funkcije i podređuje ih stvaranju, tj. sintezi svojih identičnih kopija koje će biti u mogućnosti ponovno napasti i inficirati drugu stanicu. Nakon ubacivanja virusne nukleinske kiseline (DNA ili RNA) u bakterijsku stanicu, dolazi do razgradnje bakterijskog kromosoma i do umnažanja virusne nukleinske kiseline. Sintetiziraju se sve građevne jedinice virusnih čestica (proteini za kapsidu, enzimi, nukleinske kiseline, i dr.). Formiraju se gotove virusne čestice i to 100 – 200 po jednoj bakterijskoj stanici; stanica pod pritiskom i zbog istrošenosti puca, tj. dolazi do lize bakterijske stanice pa govorimo o litičkom ciklusu (Tamarin, 1999).

Bakteriofagi su važni u genetici jer osim u litičkom, sudjeluju i u lizogenom ciklusu (ugradnja genoma bakteriofaga u bakterijski genom), transdukciji, rekombinaciji u virusa (test komplementacije, morfologija plaka...). Bakteriofagi također imaju ogroman utjecaj na biologiju Zemlje, kao i na biogeokemiju, ekologiju i evoluciju bakterijskih i arhealnih domaćina (Hendrix, 2003).

## 2. EVOLUCIJA GENOMA BAKTERIOFAGA

Tijekom ranih dana molekularne biologije, fagi su intenzivno proučavani da bi se što bolje okarakterizirali, ali i zbog toga što su vrlo jednostavni modelni organizmi. Danas smo svjedoci renesanse faga: otvorena su vrata proučavanju interakcija između domaćina i virusa. Otkrićem faga koji je krivac za toksičnost kolere, bilo je vrlo jasno da fagi imaju značajnu ulogu u evoluciji i virulenciji mnogih patogena. Zanimanje za fage dalje je raslo otkrićem da su fagi ko-produkti bakterijskog genoma; nakon sekvenciranja bakterijskog genoma, pronađeni su dijelovi koji odgovaraju genomu faga. Analiza ovih sekvenci otkrila je da fagi utječu na strukturu bakterijskog genoma (Brüssow i sur. 2004).



**Slika 2.** Jedan od načina prikaza rodoslovnog stabla bakteriofaga. Svaki genom faga obojen je bojom koja odgovara njegovoj klasifikaciji prema ICTV-u (International Committee on Taxonomy of Viruses).

(Preuzeto iz: <http://phage.sdsu.edu/research>)

Mnoge uloge bakteriofaga ovise o energiji i biosintetskim reakcijama domaćinske stanice. Ovaj obligatni način života mnoge je znanstvenike spriječio da viruse svrstaju u žive organizme. Međutim, razlika između živog i neživog biološkog materijala više je interes filozofije nego biologije. Biokemijski, virusi su sastavljeni od istog genetičkog materijala kao i njihove domaćinske stanice. Osim toga, fagi i bakterije su povezani dugom poviješću koevolucije. Ne zna se kada i kako su bakterijski virusi evoluirali: da li su oni bili preci bakterija i da li predstavljaju ostatke nekog prošlog oblika života koji je izgubio kompeticiju sa modernim oblicima staničnog života, ili su se razvili iz gena domaćinske stanice koji su se odvajali od bakterijskog genoma bilijunima godina, pobjegavši iz stanične kontrole da bi vodili sebični način života (Brüssow i sur. 2004).

Fagi nemaju nikakve fosilne ostatke niti posjeduju molekularni sat. Da bi se otkrio barem dio evolucije faga, danas je jedini alat sekvenciranje DNA i usporedba sekvenci između postojećih faga. Do sada je sekvencirano oko 200 kompletnih genoma faga, no taj broj je vrlo malen u usporedbi sa brojem postojećih čestica faga, kojih ima oko  $10^{31}$ , što ih svrstava u brojčano najveći udio biološkog materijala na Zemlji. Također, ne postoji nikakav opći model evolucije faga. Predloženi su modeli vertikalne i horizontalne evolucije i kombinacija oba modela, baš kao i kod filogenije bakterija. Pokrivenost genoma faga je ekstremno malena, dok je broj faga ekstremno velik i čini se da je evolucija faga vrlo brza. Prema tome, ne čudi činjenica da su fagi, koji su do sada analizirani, pokazivali veliku varijabilnost.

Suglasno Modularnoj teoriji evolucije faga, koja je danas općeprihvaćena, nema smisla raspravljati o evolucijskoj prošlosti cijelog genoma bakteriofaga. Na primjer, genom iz lambdoidnog kolifaga se može podijeliti u 11 modula, gdje svaki predstavlja neovisnu genetičku funkcionalnu jedinicu (geni za glavu i rep, za integrazu i ekscizionazu i slično). Svaka funkcionalna jedinica se sastoji od nekoliko alela (modula). Samo moduli imaju evolucijsku prošlost koja se može pratiti. Konkretno, nasljeđene funkcije kao što su formiranje glave ili repa mogle bi imati vertikalnu evoluciju. Poredak modula na mapi genoma faga je sasvim dobro konzerviran, međutim različiti aleli modula mogu biti slobodno poredani. Ovo daje genomu faga znatnu genomsku varijabilnost. Ipak još nije razjašnjeno koliko mnogo različitih alela postoji za pojedini modul u lambdoidnim kolifagima. No usprkos svemu, genomika faga je uvelike potvrdila ovu teoriju kao teoriju evolucije faga (Brüssow i sur. 2004).

Skupina znanstvenika provela je istraživanje na bakteriji *Lactococcus lactis* kako bi utvrdila razlike između genoma virulentnih i temperiranih faga. Laktokokalni fagi dijele se u

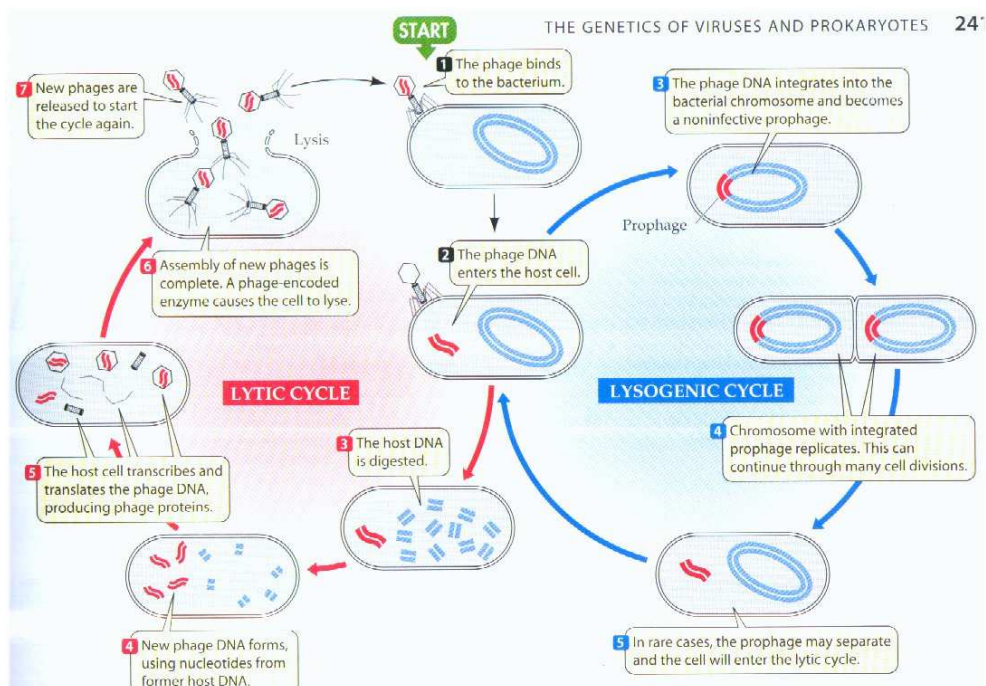
tri skupine: 2 grupe se sastoje od virulentnih faga, a 3. se sastoji od temperiranih faga. Prilikom istraživanja došli su do zaključka da postoji hipoteza koja može objasniti razlike u intenzitetu genetičke izmjene između virulentnih i temperiranih faga: naime virulentne čestice faga ne mogu dugo opstati u okolišu pa zbog toga njihovo preživljavanje ovisi o njihovom kapacitetu da omoguće česte i produktivne cikluse multiplikacije. Svi fagi iste skupine tako imaju optimalno prilagođene genome prema onome što im je neophodno i svi su oni vrlo slični. Također, uvođenje nekog vanjskog genetičkog materijala u genome virulentnih faga definitivno bi bilo kontraproduktivno. Samo geni koji nose neku selektivnu prednost, kao što su geni koji proširuju spektar domaćina, su potrebni. U suprotnosti, temperirani fagi mogu preživjeti dugi period ugrađeni u bakterijski kromosom. Stoga mogu tolerirati puno veću fleksibilnost genoma i zato imaju više evolucijskih mogućnosti. Dakle, postoje 2 oblika genetske evolucije, ovisno o načinu života faga: temperirani fagi evoluiraju horizontalnom izmjenom genetičkog materijala, a učestalost izmjene ovisi o neposrednoj taksonomskoj blizini bakterijskog domaćina. Virulentni fagi neće izmjenjivati DNA izvan svoje grupe; zbog toga se smatra da upravo ova ograničenja izmjene genetičkog materijala ukazuju na optimalnu genetsku organizaciju virulentnih faga, koji su se prilagodili na mnogo specijaliziraniji i ekstremniji oblik parazitizma od temperiranih faga (Chopin i sur. 2001). No kao što to tako biva, uvijek je zanimljivije ono što nije objašnjeno i potpuno poznato: zato se ovdje osvrćem na temperirane fage, sa fagom  $\lambda$  kao njihovim predstavnikom.

Danas je uvelike prihvaćeno da fagi evoluiraju uglavnom putem izmjene modula. Ipak, genetski mehanizam (homologna ili nehomologna rekombinacija) koji upravlja ovim procesom još uvijek je stvar rasprave (Brüssow i sur. 2004).



### 3. TEMPERIRANI BAKTERIOFAGI

Temperirani ili umjereni fagi mogu egzistirati u litičkom i/ili u lizogenom ciklusu (Slika 3). Kada su u lizogenom ciklusu fagi ugrađuju svoj genetički materijal u genom domaćina, i takav oblik faga se naziva profag. Profag se dalje pasivno replicira kao dio bakterijskog kromosoma, te se prilikom dijeljenja prenosi zajedno s bakterijskim kromosomom na stanice kćeri. Bakterija koja nosi profag otporna je na svaku daljnju infekciju i nazivamo je lizogenom bakterijom (Tamarin, 1999). U ovakvom dormantnom stanju profagi mogu biti dulje vrijeme, sve dok ne dođe do indukcije - npr. UV svjetlom, te dođe do ekscizije virusnog genoma iz genoma domaćina i fag prelazi u litički ciklus. Postoji mnogo temperiranih faga, ali jedan od najvažnijih je fag  $\lambda$ , koji je i predmet istraživanja u ovome radu.



Slika 3. Životni ciklus bakteriofaga (Preuzeto iz: [www.prism.gatech.edu](http://www.prism.gatech.edu))

Umjereni virusi imaju karakterističnu organizaciju genoma, poznatu kao 'mozaik' – sadrže strane segmente koji vuku porijeklo od srodnih virusa. U parnom sravnjivanju između dotičnog virusa i njegovih srodnika, ukupna sličnost nukleotidnih sekvenci je oko 50 %, dok su mozaični segmenti 90 do 100 % identični. Uglavnom je nepoznato kako mozaici nastaju, ali je vjerojatno da se srodni virusi sreću u istoj bakteriji i da su podvrgnuti slučajnoj rekombinaciji, s pojavom najsnažnijih rekombinantnih virusa.

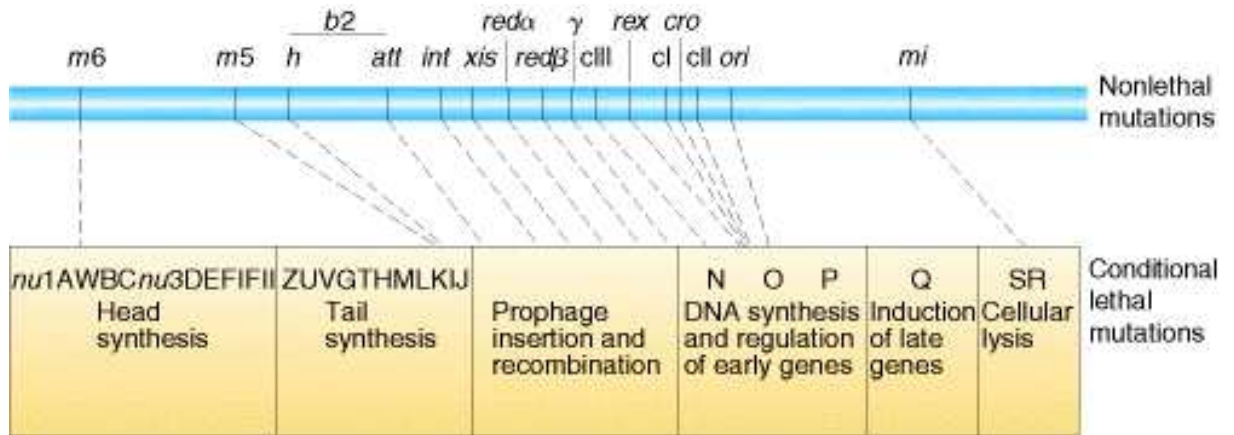
U nekim slučajevima međutim, razmjena modula nizova može se objasniti homolognom rekombinacijom koja uključuje bočne, kratke i sačuvane nizove koje dijeli skupina virusa o kojima govorimo. No moguće je i da su neka područja koja okružuju najbližnje zajedničke nizove bila podložna homeolognoj rekombinaciji, tj. rekombinaciji između povezanih ali divergiranih DNA nizova (Martinsohn i sur. 2008).

U ovom radu (Martinsohn i sur. 2008) je predloženo i pokazano da se alternativni mehanizam, kao što je homeologna rekombinacija, koristio za nastanak mozaika između sličnih ali divergiranih sekvenci. Na primjeru virusa  $\lambda$  *Escherichia coli* (*E. coli*), pokazano je da je takva homeologna rekombinacija vrlo efikasna. Otkriće ima važne posljedice na području evolucije genoma virusa, jer može objasniti visoku plastičnost virusnih genoma. Također može imati primjenu na polju biotehnologije jer otkriva viruse kao obećavajuće vektore za miješanje gena *in vivo*.

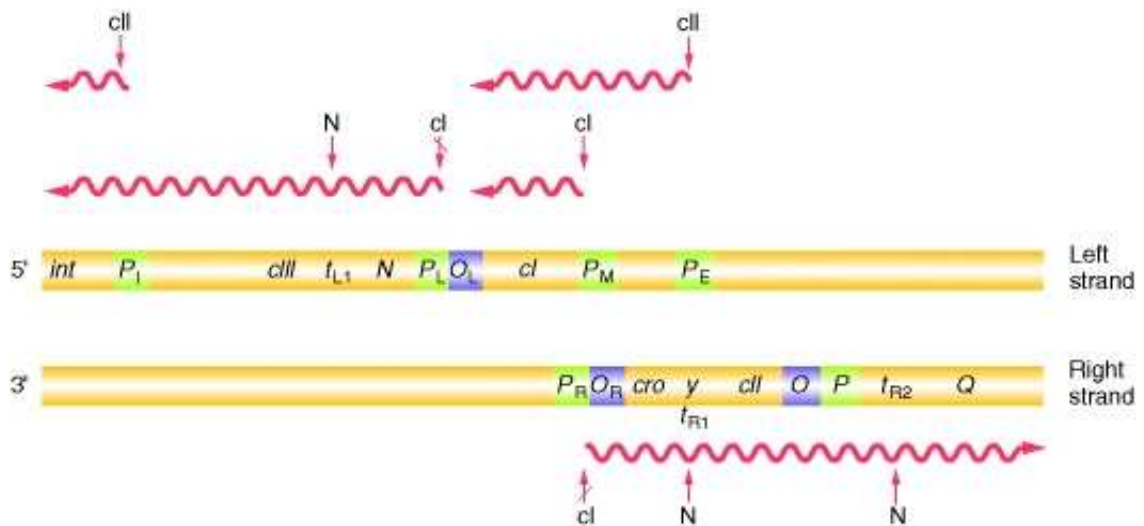
### 3.1. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA $\lambda$ FAGA

Temperirani bakteriofag  $\lambda$ , osim što posjeduje sustav za mjesno-specifičnu rekombinaciju, također posjeduje enzime i za homolognu rekombinaciju. U odsutstvu proteina RecA domaćina *E.coli* i sustava rekombinacije koji ovisi o proteinu RecA, bakteriofag  $\lambda$  razvio je alternativni put za homolognu rekombinaciju. Red put rekombinacije faga  $\lambda$  kodiraju geni za 3 proteina: egzonukleazu (gen *exo* ili *reda*), protein  $\beta$  (gen *bet* ili *red $\beta$* ) i protein  $\gamma$  (gen *gam*). Egzonukleaza, 24-kDa (kilodaltona) velik protein, degradira dl DNA s 5' kraja i otpušta 5' mononukleotide. Enzim ne može potaknuti reakciju u mjestu ureza na dl DNA niti može razgraditi jl DNA, ali zato velikom brzinom cijepa nukleotide. Protein  $\beta$ , 29-kDa velik protein, se veže na jl DNA i potiče ponovno sparivanje komplementarnih lanaca te interreagira sa  $\lambda$  egzonukelazom. Supstrat proteina  $\beta$  je linearna jl molekula DNA (Zengru i sur. 2006). Homologna rekombinacija započinje ili na mjestima dvolančanog loma, ili na preklapajućim krajevima linearnog kromosoma faga  $\lambda$ . 16-kDa velik protein  $\gamma$  se veže na enzim RecBCD domaćina te inhibira njegovo nukleazno djelovanje, da bi zaštitio krajeve linearnog genoma od degradacije. Ova tri proteina zajedno promoviraju rekombinacijske događaje koji povećavaju mogućnost replikacije i popravka DNA faga  $\lambda$  unutar domaćinske stanice.

Geni *reda*, *red $\beta$*  i  $\gamma$  (Martinsohn i sur. 2008) pripadaju  $O_L$  operonu (Slika 4 i 5): promotor  $P_L$  eksprimira rekombinacijske gene te antiterminator N, koji uzrokuje da se nastavi ekspresija preko transkripcijskih terminatora, i protein CIII, koji je uključen u regulaciju lizogenog ciklusa. Na operator  $O_L$  se može vezati ili protein Cro (antirepresor) ili CI (represor) što ukazuje da ovaj operator sudjeluje u regulaciji bilo litičkog ili lizogenog ciklusa.



**Slika 4.** Genetička mapa faga lambda. Prikazan je položaj *red $\alpha$* , *red $\beta$*  i  $\gamma$  proteina. (Preuzeto iz: A. Campbell, *The Episomes*. Harper & Row, 1969)



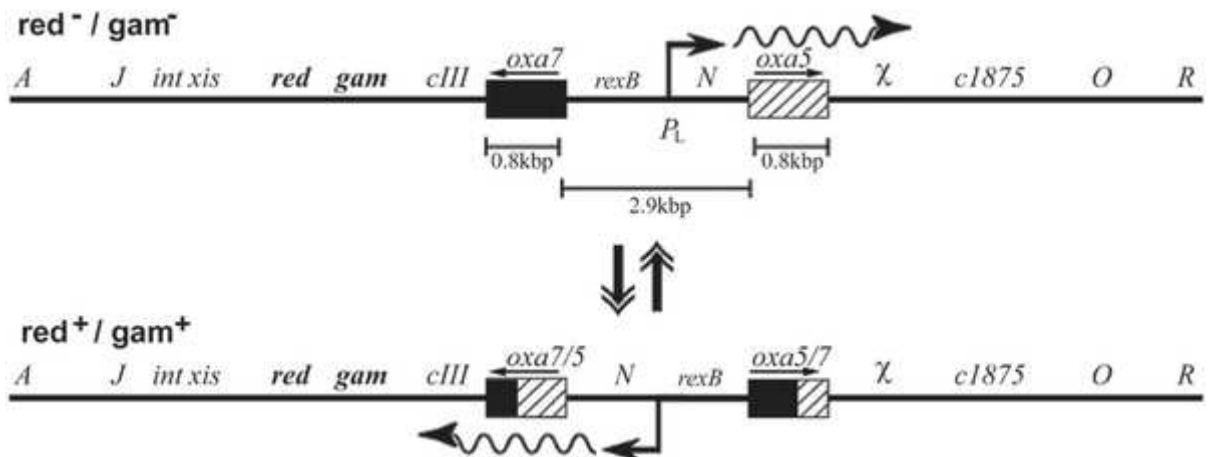
**Slika 5.** Parcijalna genetička mapa lambda faga. Prikazan je položaj *O<sub>L</sub>* operona. (Preuzeto iz: D. Wulff and M. Rosenberg, in R. W. Hendrix et al., eds., *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983)

Nin regija bakteriofaga  $\lambda$  velika 3 kb (kilobaza) smještena je između gena *p* i *q*, te sadrži transkripcijske terminacijske signale kao i 10 otvorenih okvira čitanja (Cheng i sur. 1995). Unutar ove regije nalaze se i 2 gena koja sudjeluju u Red posredovanoj rekombinaciji: produkt gena *orf* može zamijeniti tri proteina RecFOR koji su uključeni u RecF put rekombinacije u *E. coli*, i gena *rap* koji kodira za rezolvazu. Unutarstanična lambda DNA je supstrat za rekombinaciju kako virusa tako i *E.coli*, tj. fag  $\lambda$  dobro rekombinira u *recA* stanici domaćina, a isto tako i u *rec<sup>+</sup> red gam* stanici ako sadrži Chi mjesto (to je mjesto koje stimulira rekombinaciju i regulira aktivnost enzima RecBCD) koje se može oduprijeti degradaciji enzimom RecBCD. U oba slučaja, većina događaja je nrecipročna, što znači da postoji prijenos genetičkog materijala između kromosoma *E. coli* i kromosoma faga  $\lambda$ . I za

RecA ovisnu rekombinaciju i za Red ovisnu rekombinaciju, najmanja potrebna homologija iznosi oko 30 parova baza (pb) (Martinsohn i sur. 2008)

### 3.1.1. RED PUT REKOMBINACIJE

Da bi testirali učinkovitost homeologne rekombinacije, znanstvenici su u ovome radu proučavali rekombinaciju između parova sekvenci različitih gena *oxa* (geni koji kodiraju za različite beta-laktamaze), tako da su ubacili ove sekvence u  $\lambda$  genom umjesto IS10 (insercijski sljedovi) sekvenci (Martinsohn i sur. 2008). Sekvence IS10 su identične ali invertno orijentirane i okružuju promotor  $P_L$ . Rekombinacijom između invertnih ponavljanja (IS10) može doći do inverzije ovog promotora, što dovodi do fenotipske promjene, odnosno, do inaktiviranja ili aktiviranja određenih gena ovisno o orijentaciji promotora. Ako se  $P_L$  promotor nalazi u normalnoj orijentaciji, dakle ulijevo, prepisat (transkribirat) će se geni *red* i *gam* što znači da će fag  $\lambda$  biti vijabilan u stanici domaćina koja je mutirana u genu *recA*, ali neće biti vijabilan u stanici domaćina koja ima ugrađen profag P2 u svojem genomu. Ako je  $P_L$  promotor u obrnutoj orijentaciji, dakle udesno, neće doći do transkripcije gena *red* i *gam* i fag  $\lambda$  će biti vijabilan u stanici domaćina s P2 profagom, ali neće biti vijabilan u stanici koja je *recA* mutant (Slika 6).



**Slika 6.** Rekombinacija između dvije homeologne *oxa* sekvence koje okružuju  $P_L$  promotor. Ovisno o orijentaciji promotora dolazi do aktivacije ili inaktivacije gena *red gam*. (Preuzeto iz: [www.plosgenetics.org](http://www.plosgenetics.org))

Dakle, konstrukt koji ima obrnutu orijentaciju promotora  $P_L$  i koji sadrži invertne IS10 sekvence rekombiniran je sa 800 pb gena *oxa*, koji imaju različite stupnjeve divergencije. Također je uvedeno i Chi mjesto da bi se stimulirao RecBCD put rekombinacije. Kad je

promotor  $P_L$  u obrnutoj orijentaciji, Red put faga  $\lambda$  je inhibiran, a aktivan je samo RecBCD put rekombinacije. Kada je pak promotor  $P_L$  u normalnoj orijentaciji, aktivan je samo Red put rekombinacije jer je gen *recA* mutiran, a RecBCD je inhibiran proteinom Gam. Rezultati su dobiveni mjerenjem učestalosti rekombinacije u *recA* mutantu, odnosno soju C600 P2 bakterije *E. coli*. Pokazano je da je učestalost rekombinacije Red putem mnogo veća od RecBCD puta, naročito kod 22% divergiranih sekvenci. Nije bilo rekombinanata između 52% divergiranih sekvenci pomoću Red puta rekombinacije (Martinsohn i sur. 2008).

### 3.1.2. UTJECAJ MMR SUSTAVA DOMAĆINSKE STANICE *E. COLI* NA RED SUSTAV FAGA $\lambda$

Na učestalost nehomolognih sekvenci velik utjecaj imaju metil dirigitirani popravak krivo sparenih baza (MMR), helikaza UvrD koja ima antirekombinacijski efekt (Veaute i sur. 2005) i helikaza RecQ koja sprečava ilegitimnu rekombinaciju (Martinsohn i sur. 2008). Naime, protein RecA *E. coli* je selektivan za identitet sekvenci samo prilikom početka rekombinacijskih događaja: potrebna je identičnost u 23-27 pb za inicijaciju izmjene lanaca pomoću RecA. Jednom kad se potakne izmjena lanaca, ona se nastavlja bez obzira na mnogobrojna kriva sparivanja i velika mjesta heterologije. U ovom trenutku, rekombinaciju kontrolira MMR. On sudjeluje u inhibiciji homeologne rekombinacije jer zaustavlja izmjenu DNA između različitih i ponovljenih sekvenci kromosoma, ili između cijelih genoma srodnih vrsta (Constantino, 2003). Dakle, ako bi se MMR inaktivirao, potaknula bi se RecA ovisna rekombinacija između neidentičnih sekvenci DNA.

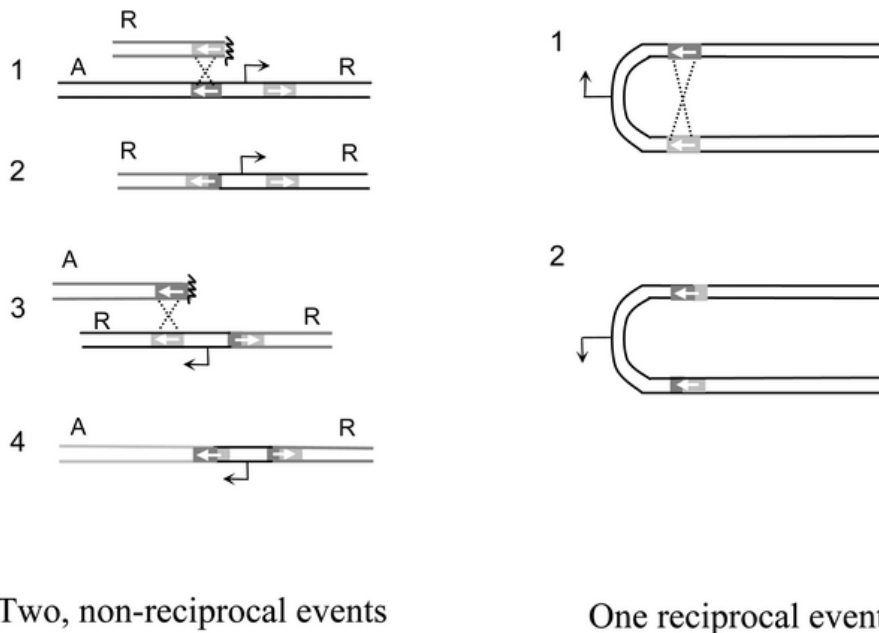
Inhibicija proteina MutS dovela je do 8 puta češće rekombinacije RecBCD puta između 4% divergentnih sekvenci, dok je kod 22% divergentnih sekvenci rekombinacija bila samo 2 puta češća. No međutim, uopće nije bilo stimulativnog učinka mutacije *mutS* na rekombinaciju koja ide Red putem. Prema tome, MMR sustav igra određenu ulogu u točnosti bakterijskog RecBCD puta, ali uopće ne djeluje na Red sustav faga  $\lambda$ . Također, *uvrD* ne vrši značajnu funkciju antirekombinaze na  $\lambda$  supstrate, a niti helikaza RecQ nije spriječila rekombinaciju u nijednom od proučavanih supstrata (Martinsohn i sur. 2008).

### 3.1.3 SIMETRIČNI I NESIMETRIČNI REKOMBINACIJSKI DOGAĐAJI

Setovi gena koji su izabrani za  $\lambda$  konstrukte su divergirane sekvence parova gena *oxa*. Kao što je već prije bilo rečeno, geni *oxa* kodiraju za različite beta-laktamaze. Očekivano je

bilo da nastanu različite genske kombinacije budući da treba doći do rekombinacije. Pronađena je hibridna DNA sekvenciranjem 304 gena *oxa*, što ukazuje da je unutar 800 pb parcijalne homologije došlo do rekombinacije. Rekombinacijski događaji podijeljeni su u 2 glavne skupine: nesimetrični događaji u kojima se 2 spoja javljaju u različitim intervalima, te simetrični događaji, u kojima se 2 spoja javljaju u istim intervalima (Martinsohn i sur. 2008).

Bakteriofag  $\lambda$  uglavnom rekombinira na nerekipročni način, no samo rekombinante koje su preživjele u ovom istraživanju nastale su recipročnim načinom. Nerekipročna izmjena genetičkog materijala znači da se rekombinacija događa bez crossing overa, odnosno da dolazi do promjene sekvence u jednoj molekuli DNA, ali ne i u drugoj. Nerekipročna izmjena je zapravo genska konverzija. No ipak, do recipročnosti se može doći i kombinacijom dvaju nerekipročnih događaja, što pripada u skupinu nesimetričnog događaja (Slika 7).



**Slika 7.** Stvaranje inverzije između *oxa* sekvenci. Na lijevoj slici prikazano je stvaranje vijabilnog produkta pomoću 2 nerekipročna događaja, u kojem su sekvence invertne a geni *oxa* su hibridni. Na desnoj slici potreban je samo jedan korak, korak crossing overa između *oxa* sekvenci i stvara se invertna konfiguracija.

([www.plosgenetics.org](http://www.plosgenetics.org))

Rezultati su pokazali da su događaji nastali rekombinacijom RecBCD putem uglavnom nesimetrični, kao i oni nastali Red putem rekombinacije (Tablica 1). Mali postotak događaja je bio simetričan. Da bi se ispitalo da li su ovi simetrični događaji, kojih je najviše bilo rekombinacijom između 22% divergiranih sekvenci, nastali uslijed aktivnosti enzima RuvABC, izmjerena je frekvencija rekombinacije u mutantu *ruvABC*. Rezultat je pokazao da se učestalost rekombinacije smanjila ako je bio aktivan RecBCD put rekombinacije. Dakle,

većina događaja između 22% divergiranih sekvenci u RecBCD putu se razrješuje pomoću enzima Ruv.

**Tablica 1.** Tipologija rekombinantnih produkata za 4% i 22% divergirane sekvence nastalih RecBCD putem ili Red putem (Preuzeto iz: [www.plosgenetics.org](http://www.plosgenetics.org))

	RecABCD pathway				Red pathway	
	4% divergence		22% divergence		22% divergence	
	%	(number)	%	(number)	%	(number)
non-symmetrical	81	(44)	40	(15)	81	(34)
symmetrical	17	(9)	55	(21)	17	(7)
complex	2	(1)	5	(2)	2	(1)
total	100	(54)	100	(38)	100	(42)

doi:10.1371/journal.pgen.1000065.t002

Zatim se željelo utvrditi postoje li određena vruća mjesta (eng. hot spot) na kojima dolazi do rekombinacije između 4% i 22% divergiranih sekvenci (dakle između sekvenci koje nisu 100% homologne). Utvrđeno je da postoje 2 hot spota za RecBCD put rekombinacije *E. coli*: jedno hot spot mjesto je dugo 16 nukleotida i sadrži 2 mjesta za urez enzima RuvC, po jedan na svakom lancu. Drugo hot spot mjesto je dugo 17 nukleotida i nema RuvC mjesta, ali je bogato GC parovima baza, vjerojatno za stabilizaciju rekombinantnog intermedijera. Za Red put rekombinacije faga  $\lambda$  takva hot spot mjesta ne postoje.

Sve u svemu, dobivene karakteristike homologne rekombinacije koju omogućuje Red put faga  $\lambda$ , sugeriraju da bi takav fag mogao biti idealan vektor za miješanje gena *in vivo* (Martinsohn i sur. 2008).

### 3.1.4. ULOGA HOMEOLOGNE REKOMBINACIJE U EVOLUCIJI VIRUSNIH GENOMA

Za otkrivanje potencijalne uloge homeologne rekombinacije u evoluciji virusnih genoma, upotrijebljena je komparativna bioinformatička metoda detekcije „ramena“, koja analizira i uspoređuje obilježja homeologne rekombinacije različitih virusnih genoma. „Sholuder“ tj. rame, označava 2 regije koje su identične u određenom postotku. „Hit“ ili događaj označava područje koje okružuje rame i također se izražava u postotku identičnosti. Analiza je rađena na 10 lambdoidnih bakteriofaga iz enterobakterija. Rezultati su pokazali da



83 „hita“ dijeli više od 90% sličnosti između bilo koja dva člana obitelji; 6 „hita“ je okruživalo 2 ramena, a 35 ih je okruživalo samo jedno rame. Za preostala 42 „hita“ nije bilo detektirajućeg signala. Da bi se dodatno proširo broj analiziranih bakteriofaga, ista analiza je provedena na 15 lambdoidnih faga mliječno-kiselih bakterija i 20 lambdoidnih faga *Staphylococcus aureus*. Ponovno su rezultati pokazali postojanje ramena u oko 50% svih „hitova“, i to sa značajno većom učestalošću nego što se očekuje pri slučajnom događaju (Martinsohn i sur. 2008).

### **3.1.5. ZAKLJUČAK**

Mozaicizam genoma faga vjerojatno je povezan s posebnim tipovima enzima homologne rekombinacije koji su kodirani od strane genoma faga. Ovakav sustav bio bi prikladan u kratkom vremenu stvoriti velike setove gena, a to upućuje na izvanrednu metodu evolucije, koja se opisuje sposobnošću stvaranja dovoljno povoljnih varijacija da bi se mogla dogoditi adaptivna evolucija. Adaptivna evolucija označava prilagodbu organizma okolišu koji ga okružuje. Budući da bakteriofagi imaju toliko brze evolucijske procese, moramo se zapitati koliki je utjecaj ovih sićušnih organizama, koji se nalaze na granici živog i neživog, na svijet koji nas okružuje.

## **4. EPILOG**

*„Therefore, the around 200 phage and 200 prophage sequences available in the current database are nothing but a snapshot documenting only a few of the possible combinations and configurations. The dynamics of these processes, their function in the evolution of bacterial pathogens, and their impact on animal evolution are just beginning to be explored. Integrative approaches are required to understand how phages, bacterial pathogens, and animal populations interact and coevolve. Microbes will, over the next decade, be perceived as members of a given environment, and after the first phase of sequencing of individual genomes and the laboratory analysis of single strains, we will see interacting genomes and microbes in the complex fabric of their natural environment. This will pose new analytical challenges that will probably again transform microbiology as genomics did over the last decade.“ (Brüssow i sur. 2004.)*



**Slika 8.** 3D struktura bakteriofaga. (Preuzeto iz: [www.animate4.com/science](http://www.animate4.com/science))

## **5. LITERATURA**

**Barlow** M, Hall BG (2002) Phylogenetic analysis shows that the OXA betalactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol* **55**: 314–321.

**Brüssow** H, Canchaya C, Hardt W-D (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 560–602.

**Cheng** CS, Courtt DL and Friedman DI (1995) Transcription Termination Signals in the *nin* Region of Bacteriophage Lambda: Identification of Rho-Dependent Termination Regions. *Genetics* **140**: 875-887

**Chopin** A, Bolotin A, Sorokin A, Ehrlich SD, Chopin M (2001) Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res* **29**: 644–651.

**Costantino** N, Court DL (2003) Enhanced levels of  $\lambda$  Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15748–15753.

**Hendrix** RW (2003) Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 506–511.

**Hendrix** RW, Smith MC, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2192–2197.

**Juhala** RJ, Ford ME, Duda RL, Youlton A, Hatfull GF, et al. (2000) Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: Pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. *J Mol Biol* **299**: 27–51.

**Junop** MS, Yang W, Funchain P, Clendenin W, Miller JH (2003) In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair* **2**: 387–405.

**Martinsohn** JT, Radman M, Petit M-A (2008) The  $\lambda$  Red Proteins Promote Efficient Recombination between Diverged Sequences: Implications for Bacteriophage Genome Mosaicism. *PLoS Genet* **4(5)**: e1000065. doi:10.1371/journal.pgen.1000065.

**Muyers** JP, Zhang Y, Buchholz F, Stewart AF (2000) RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev* **14**: 1971–1982.

**Pedulla** ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, et al. (2003) Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**: 171–182.

**Rohwer** F and Edwards R (2002) The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy

for Phage. *J Bacteriol* **184**, p. 4529–4535.

**Tamarin**, R.H. (1999.): Principles of genetics. The McGraw-Hill Companies, str. 148.- 176.

**Veaute** X, Delmas S, Selva M, Jeusset J, Le Cam E, et al. (2005) UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J* **24**: 180–189.

**Weil** J (1969) Reciprocal and non-reciprocal recombination in bacteriophage lambda. *J Mol Biol* **43**: 351–355.

**Zengru** Wu, Xing X, Bohl CE, Wisler JW, Dalton JT, and Bell CE (2006) Domain Structure and DNA Binding Regions of  $\beta$  Protein from Bacteriophage  $\lambda$ . *J Biochem* **281**, NO. 35, pp. 25205–25214

[www.animate4.com/science/image/Bacteriophage.jpg](http://www.animate4.com/science/image/Bacteriophage.jpg)

[www.biol.pmf.hr/uploads/media/virologija\\_1\\_02.pdf](http://www.biol.pmf.hr/uploads/media/virologija_1_02.pdf)

[www.biol.pmf.unizg.hr/uploads/media/Genetika\\_bakterija\\_i\\_virusa.pdf](http://www.biol.pmf.unizg.hr/uploads/media/Genetika_bakterija_i_virusa.pdf)

[www.bioloji.net/upload/Virusi.pdf](http://www.bioloji.net/upload/Virusi.pdf)

[www.dodaj.rs/f/30/lm/1xALd0Yd/05-homologa-rekombinacij.pdf](http://www.dodaj.rs/f/30/lm/1xALd0Yd/05-homologa-rekombinacij.pdf)

[www.encyclopedia.thefreedictionary.com/evolvability](http://www.encyclopedia.thefreedictionary.com/evolvability)

[www.library.thinkquest.org/C0123260/basic%20knowledge/images/basic%20knowledge/DNA/structure%20of%20bacteriophage.jpg](http://www.library.thinkquest.org/C0123260/basic%20knowledge/images/basic%20knowledge/DNA/structure%20of%20bacteriophage.jpg)

[www.mcb.uct.ac.za/tutorial/rollingcircle.jpg](http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/rollingcircle.jpg)

[www.medri.uniri.hr/katedre/Biologija/dsi/biologija/GENETICKA%20REKOMBINACIJA.pdf](http://www.medri.uniri.hr/katedre/Biologija/dsi/biologija/GENETICKA%20REKOMBINACIJA.pdf)

[www.mun.ca/biochem/courses/3107/Lectures/Topics/dHerelle.html](http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Lectures/Topics/dHerelle.html)

[www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000065](http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000065)

[www.prism.gatech.edu/~gh19/b1510/8lytic.jpg](http://www.prism.gatech.edu/~gh19/b1510/8lytic.jpg)

[www.upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/ImageBacteriophage\\_lambda\\_genome.png](http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/ImageBacteriophage_lambda_genome.png)

## **6. SAŽETAK**

Bakteriofagi su bakterijski virusi koji nastanjuju i najmanje kutke naše planete. Svrstavanje ovih organizama u skupine zadavalo je muke, a zadaje i danas mnogim znanstvenicima i istraživačima. Temperirani bakteriofagi pokazuju izraziti genomski mozaicizam, i upravo zbog toga ih je nemoguće evolucijski odrediti.

U ovome radu pokušalo se odgonetnuti da li Red put homologne rekombinacije između divergentnih sekvenci utječe na genomski mozaicizam temperiranih bakteriofaga, sa naglaskom na fag  $\lambda$ . Znanstvenici su došli do vrlo zanimljivog otkrića: mnogi lambdoidni fagi (temperirani) imaju rekombinaze koje potječu iz iste obitelji rekombinaza kao što je Red $\beta$ , a virulentni fagi posjeduju rekombinaze slične bakterijskom proteinu RecA. Virulentni fagi uopće ne pokazuju mozaicizam genoma, što je dodatna potvrda da bi Red sustav bakteriofaga  $\lambda$  mogao imati utjecaj na stvaranje genomskog mozaicizma i na evoluciju temperiranih bakteriofaga.

## **7. SUMMARY**

Bacteriophages are bacterial viruses that inhabit even the remotest corners of our planet. The classification of these organisms into groups has always been very difficult and still poses a problem to many scientists and researchers. Temperate bacteriophages show a strong genomic mosaicism, and it is therefore impossible to determine their evolution.

This study attempted to decipher whether the fact that Red proteins promote homologous recombination between diverged sequences affects genomic mosaicism of temperate bacteriophages, with emphasis on phage  $\lambda$ . Scientists have come up with a very interesting discovery: many lambdoid phages (temperate) have recombinases originating from the same family as recombinase Red $\beta$ , and virulent phages possess recombinases similar to the bacterial protein RecA. Virulent phages do not show mosaicism of their genome, which is further evidence that the bacteriophage  $\lambda$  Red system could have an impact on the creation of genomic mosaicism, and the evolution of temperate bacteriophages.