

Mehanizmi popravka DNA kod arheja

Stanojević, Filipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:217:545220>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Filipa Stanojević

Mehanizmi popravka DNA kod arheja

Završni rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Filipa Stanojević

Mechanisms of DNA repair in Archaea

Bachelor thesis

Zagreb, 2024

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. dc. Ivane Ivančić Baće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Mehanizmi popravka DNA kod arheja

Filipa Stanojević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Oštećenja DNA uzrokovana endogenim i egzogenim čimbenicima utječu na vijabilnost organizama, a time i na opstanak vrste. Zahvaljujući mnogim mehanizmima popravka DNA oštećenja DNA se mogu efikasno popraviti. Arheje spadaju u treću domenu života, smatraju se precima eukariota i poznate su po mogućnosti života u ekstremnim uvjetima okoliša. Zbog problematičnog uzgoja u laboratoriju nije se mnogo znalo o načinima popravka DNA u njima. Razvojem sekvenciranja DNA i metagenomike istraživanja su znatno olakšana i otkrivene su brojne sličnosti s prokariotskim i eukariotskim genima. U ovome radu opisat ću tri mehanizma popravka DNA: popravak krivo sparenih baza, ekscizijski popravak nukleotida i popravak dvolančanih lomova DNA homolognom rekombinacijom. Ukazat ću na složenost puteva kojima se mogu odvijati različiti mehanizmi popravka, umreženosti proteina uključenih u popravak DNA te evolucijski i biotehnoški značaj istraživanja popravka DNA u arhejama.

Ključne riječi: *arheje, DNA, MMR, homologna rekombinacija, NER*
(32 stranica, 4 slike, 0 tablica, 85 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. dc. Ivana Ivančić Baće

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Mechanisms of DNA repair in Archaea

Filipa Stanojević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

DNA damage caused by endogenous and exogenous factors, if left unrepaired, can have a negative effect on organismal fitness and at last the survival of species. Multiple mechanisms of DNA repair are vital for efficient repair of damaged DNA. Archaea, which belong to the third domain of life are known for inhabiting a very broad range of extreme environments. They are believed to be eukaryotes' ancestors. However, because of the complexity of cultivating archaeal species in the laboratory, little was known about their DNA repair mechanisms. With the rapid development of DNA sequencing and metagenomics, the research of archaea has been made significantly easier resulting in the discovery of many similarities between archaeal and prokaryotic and eukaryotic genes. With research being made easier, mysteries held by the third domain of life have started to be unraveled. Throughout this thesis, I will review three DNA repair mechanisms: mismatch repair, nucleotide excision repair, and double-strand break repair dependent on homologous recombination. I will also highlight the complexity of these DNA repair mechanisms, the cooperation between proteins involved in DNA repair, and the significance of researching DNA repair pathways in archaea.

Keywords: *archaea, DNA, MMR, homologous recombination, NER*
(32 pages, 4 figures, 0 tables, 85 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. dc. Ivana Ivančić Baće

SADRŽAJ

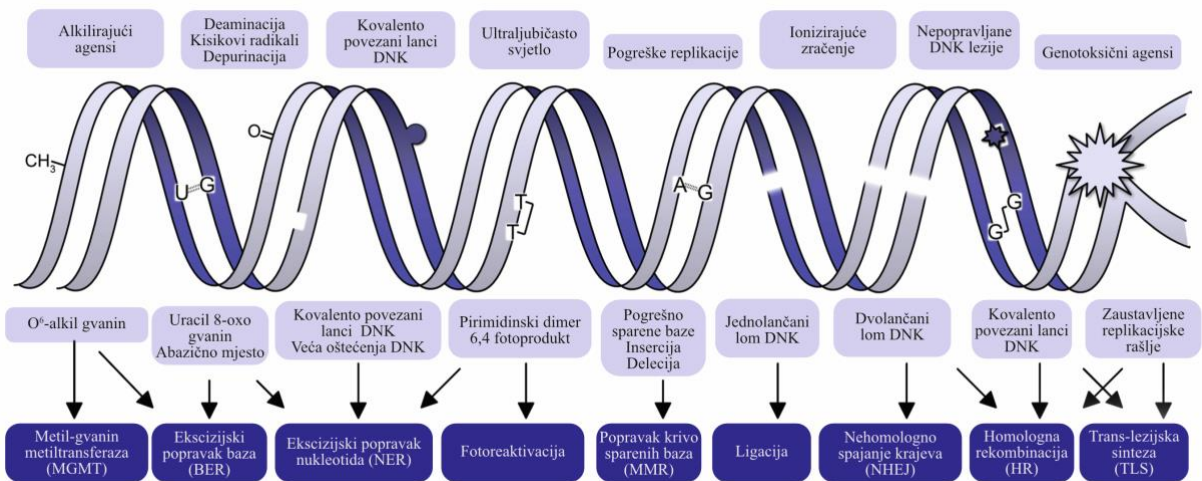
1. UVOD.....	1
2. POPRAVAK KRIVO SPARENIH BAZA.....	4
2.1. KANONSKI OBLIK MMR	4
2.2. MMR POSREDOVAN ENDOMS PROTEINOM.....	5
3. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA.....	8
3.1. PRESINAPSA.....	8
3.2. SINAPSA I POST-SINAPSA	10
3.3. BIOTEHNOLOŠKA VAŽNOST PROTEINA HOMOLOGNE REKOMBINACIJE	13
4. EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA	15
4.1. GLOBALNI EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA	15
4.2. EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA POVEZAN S TRANSKRIPCIJOM.....	20
5. ZAKLJUČAK	22
6. ŽIVOTOPIS	23
7. LITERATURA	24

1. UVOD

Arheje su prokariotski jednostanični mikroorganizmi naizgled nalik bakterijama te su se zbog toga dugo vremena svrstavale u domenu Bacteria. Woese i Fox (1977) su na temelju analize sekvenci 16S RNA predložili izdvajanje dijela “bakterija” u novu, treću domenu koju su nazvali Archaeobacteria, a kasnije je preimenovana u Archaea (Baker i sur. 2020). Arheje kao ni bakterije, nemaju stanične odjeljke te im se kružni genom nalazi slobodan u citoplazmi (Van Wolferen i sur. 2022). Također, geni su organizirani u skupine čija je ekspresija zajednički regulirana. Sličnost s bakterijama nije samo u organizaciji genoma, nego i u obliku organizama. Većina arheja je oblika karakterističnih za bakterije točnije oblika koka ili spirala. Zbog nedostatka peptidoglikana oblik arheja se lako može promijeniti pod utjecajem vanjskih uvjeta (Van Wolferen i sur. 2022). Osim sličnosti s bakterijama, arheje imaju neke zajedničke karakteristike s eukariotima. Mehanizmi kojima se odvijaju replikacija DNA, transkripcija i translacija u arhejama sličniji su onima opisanim u eukariotima. Također, arheje kao i eukarioti u genomu imaju nekodirajuće sljedove, introne. No, arheje imaju svojstva kojima se razlikuju i od bakterija i od eukariota. Naime, građa membrana arheja je jedinstvena i nije pronađena u niti jednom predstavniku preostalih dviju domena. Membrane su jednoslojne i građene od razgranatih masnih kiselina povezanih eterskom vezom za glicerol 1-fosfatnu okosnicu. Od predstavnika preostalih dvaju domena, arheje se razlikuju i prema drugačijim metaboličkim putevima poput metanogeneze kojima dobivaju energiju. Jedinstveno svojstvo arheja koje nastanjuju vodena staništa je archaellum, bič koji nije evolucijski srodan bakterijskom biču (Van Wolferen i sur. 2022). Ubrzanim razvojem DNA sekvenciranja i metagenomike, kojima je omogućeno proučavanje genoma vrsta koje je teško uzgojiti u laboratoriju, došlo je do značajnih otkrića vezanih uz filogeniju, rasprostranjenost, ekološko te biotehnoško značaje arheja i njihove evolucijske povezanosti s eukariotima. Prvotno se mislilo kako su sve arheje ekstremofili no danas je poznato da su sveprisutne u okolišu pa i ljudskom probavnom sustavu. Imaju važne uloge u ciklusima dušika i ugljika dok se značaj arheja koje nastanjuju druge organizme počinje istraživati (Van Wolferen i sur. 2022). Analizom raznolikih okolišnih uzoraka također se ispostavilo da prvotna podjela arheja na dva koljena, *Crenarchaeota* i *Euryarchaeota*, nije dovoljna za opisivanje njihove raznolikosti. Danas se arheje dijele na tri natkoljena: *Asgardarchaeota*, DPANN (akronim koljena *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanohaloarchaeota*, i *Nanoarchaeota* koja su prva uvrštena u natkoljeno) i TACK (akronim koljena *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota* i *Korarchaeota* koja su prva uvrštena u natkoljeno) te koljeno *Euryarchaeota* koje ne pripada niti jednom natkoljenu

(Baker i sur. 2020). Filogenetskom analizom *Asgardarchaeota* predloženo je da su prve eukariotske stanice nastale iz arhejskih predaka. Tvrdnju podupire pronalazak proteina karakterističnih za eukariote, homologa aktina i proteina zaduženih za međumembranski prijenos u eukariotima (Zaremba-Niedzwiedzka i sur. 2017).

Oštećenja DNA koja nastaju kao posljedice djelovanja endogenih i egzogenih faktora (**Slika 1**) mogu uzrokovati nastajanje mutacija koje štete vijabilnosti organizma i dugoročno, njihovim nakupljanjem, preživljavanje vrste. Kako bi se spriječio negativan utjecaj oštećenja, razvili su se razni mehanizmi kojima se ta oštećenja popravljaju. Raznolikost enzima koji sudjeluju u mehanizmima popravka pogreški u DNA, odražava raznolikost oštećenja koja mogu narušiti stabilnost genetičke informacije (Grogan, 2004). Kao što je spomenuto, arheje mogu živjeti u ekstremnim uvjetima koji mogu povećati broj oštećenja DNA koji nastaju zbog egzogenih faktora, primjerice velike količine UV zračenja te visoke temperature. Unatoč životu u nepogodnim uvjetima, arheje ne posjeduju njima jedinstvene mehanizme popravka DNA. Pronađeni mehanizme popravka poput fotoreaktivacije, metiltransferaznog popravka, popravka dvolančanih lomova, popravaka krivo sparenih baza (MMR od engl. *mismatch repair*), ekscizijskog popravka nukleotida (NER od engl. *nucleotide excision repair*), ekscizijskog popravka nukleotida udruženog s transkripcijskom (TC-NER od engl. *transcription coupled nucleotide excision repair*), ekscizijskog popravaka baza i ekscizijskog popravka ribonukleotida prisutni su u bakterijama i eukariotima (Marshall i Santangelo, 2020). U ovom seminarskom radu bit će detaljnije obrađena tri mehanizma popravka za koja se misli da bi mogli biti povezani (Fujikane i sur. 2010); MMR, NER i popravak dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom (HR). Bit će opisana dosadašnja saznanja o mehanizmima, evolucijska povezanost s pripadnim bakterijskim i eukariotskim mehanizmima popravka te značaj razotkrivanja nepoznanica popravaka DNA u arhejama.



Slika 1. Shematski prikaz egzogenih i endogenih čimbenika koji mogu uzrokovati oštećenja DNA, oštećenja koja nastaju djelovanjem prikazanih čimbenika te mehanizmi popravka DNA koji djeluju na pojedini tip oštećenja. Preuzeto i prilagođeno iz White i Allers (2018).

2. POPRAVAK KRIVO SPARENIH BAZA

Popravak krivo sparenih baza važan je mehanizam otklanjanja pogrešaka u DNA. Pogrešno sparivanje baza najčešće je posljedica ugradnje krivih nukleotida od strane DNA polimeraze tijekom sinteze DNA. Također, misli se da su mehanizmi uklanjanja krivo sparenih baza iz nasljedne informacije pojavili barem dvaput tijekom evolucije, na što ukazuje i postojanje barem dvaju različitih puteva popravka u arhejama (Castañeda-García i sur. 2017).

2.1. KANONSKI OBLIK MMR

Kanonski oblik popravka koji posjeduju eukarioti i bakterije vrše proteini MutS (od engl. *mutator S*) i MutL (od engl. *mutator L*), a kod nekih bakterijskih skupina i protein MutH (od engl. *mutator H*). MutS je dimer koji prepoznaje i veže se na krivo sparene baze. *In vitro* MutS iz *E. coli* pokazuje najveći afinitet prema vezanju na G/T krivo sparene baze, potom G/A i A/C dok najmanji afinitet ima prema T/C parovima (Shin-San Su i Modrich 1986). Vezanjem na pogrešku u DNA privlači MutL koji potom cijepa DNA te uklanjanja krivo sparene baze (Modrich i Lahue 1996). Aktivnost MutL regulirana je interakcijama s β hvataljkom (Kunkel i Erie 2015). Kao što je spomenuto, neke skupine bakterija kodiraju za endonukleazu MutH koju aktivira kompleks MutS: MutL. Endonukleaza MutH se nakon aktivacije veže za najbliže nemetilirane GATC sljedove te uvodi ureze u DNA 5' ili 3' od tih sljedova. Pomoću specifičnosti MutH za vezivanje na nemetilirane sljedove omogućava se razlikovanje novosintetiziranih lanaca od lanaca kalupa. Naime, novosintetizirani lanci DNA su netom nakon sinteze nemetilirani. Potom, DNA helikaza II istiskuje lanac DNA, te uklanja oštećenje. Istisnuti dijelovi lanca degradiraju se djelovanjem različitih egz nukleaza; ovisno o tome istiskuje li se lanac u 5'-3' ili 3'-5' smjeru. Posljednji koraci popravka uključuju ponovnu sintezu dijela DNA koji nedostaje, koju provodi DNA polimeraza te spajanje novosintetiziranog dijela s okolnim segmentima DNA s pomoću ligaze (Smith i Modrich 1996).

U popravku krivo sparenih baza u eukariotima ne postoji protein MutH jer se novosintetizirani lanci ne prepoznaju na temelju metilacije već je vezivanje MutS i MutL i usmjeravanje nukleazne aktivnosti MutL na novosintetizirane lance DNA regulirano interakcijama s PCNA (od engl. *proliferating cell nuclear antigen*) (Kunkel i Erie 2015). Eukarioti ne kodiraju ni za DNA helikazu II te istiskivanje i degradaciju lanca provodi DNA polimeraza specijalizirana za popravak DNA (Marshall i Santangelo 2020). Popravak krivo sparenih baza s pomoću MutS i MutL proteina rijedak je kod arheja jer gotovo ni jedna vrsta ne kodira za homologne proteine (Castañeda-García i sur. 2017). Homolozi MutS i MutL

pronađeni su u arhejama koje su temperaturni mezofili točnije halofili ili metanogeni te koljenima *Lokiarchaeum* i *Thorarchaeum* koje spadaju u natkoljeno *Asgardarchaeota* (Eme i sur. 2017). Početni koraci popravka krivo sparenih baza kod metanogenih arheja koje kodiraju za MutS i MutL slični su onima u eukariotskom mehanizmu popravka (Marshall i Santangelo 2020).

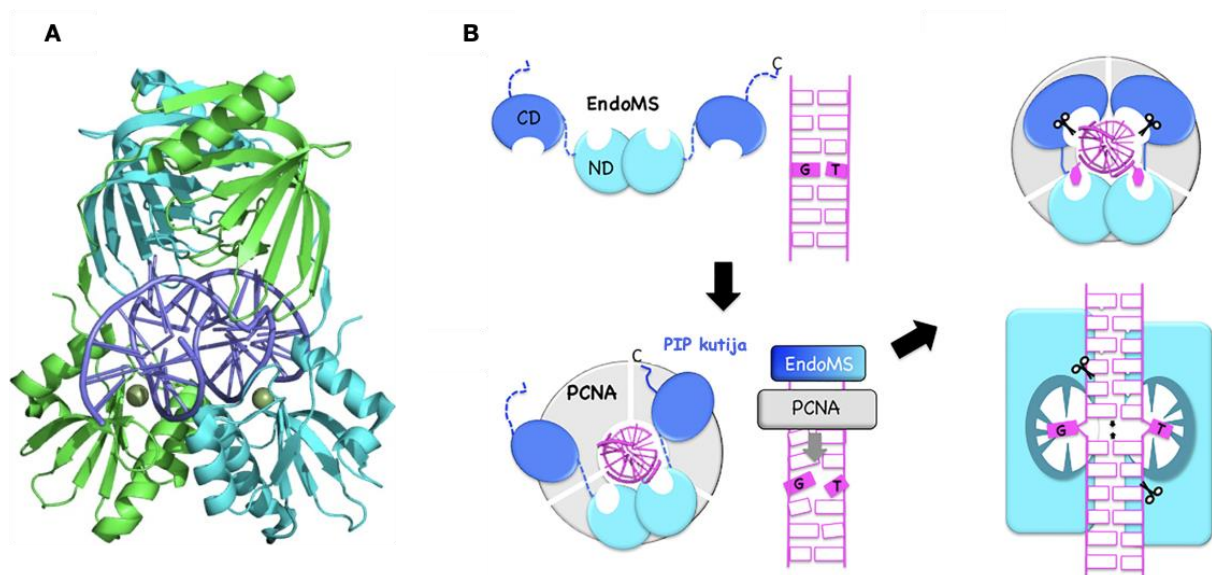
Unatoč činjenici da mali broj arheja kodira za proteine kanonskog puta popravka krivo sparenih baza, imale su važnu ulogu u evoluciji ovog oblika popravka oštećenja DNA eukariota. Kao što je navedeno, dva koljena *Asgardarchaeota*, za koje se smatra da su predci eukariota (Eme i sur. 2017; Williams i sur. 2013), kodiraju za homologe proteina kanonskog puta MMR. Eukariotski MMR sustav složeniji je nego bakterijski ili arhejski zbog velikog broja paraloga nastalih duplikacijom gena te njihovom daljnjom specijalizacijom tijekom evolucije (Lin i sur. 2007). Primjer specijalizacije proteina prvotno uključenih u popravak pogrešaka u DNA su proteini MSH4 (od engl. *MutS protein homolog 4*) i MSH5 (od engl. *MutS protein homolog 5*). Navedeni proteini su nužni za provođenje recipročne rekombinacije tijekom mejotske diobe i više ne sudjeluju na niti jedan način u popravku krivo sparenih baza (Hollingsworth i sur. 1995). Proteini MSH4 i MSH5 dva su od šest visoko konzervirana paraloga MutS proteina pronađena u eukariotima. Paralozi MutS aktivni u jezgri naslijeđeni su od arhejskog pretka u kojem je prije evolucije eukariota došlo do duplikacije MutS proteina preuzetog horizontalnih transferom gena od bakterija. Eukariotski homologe MutS aktivni u mitohondriju i kloroplastu naslijeđeni su mitohondrijskog pretka točnije alfa-proteobakterije te pretka kloroplasta, cijanobakterija. Eukarioti kodiraju za četiri MutL paraloga. Mitohondrijski MutL zamijenjen je paralogom kodiranim jezgrinim genomom, a MutL kloroplasta nije prisutan u svim fotosintetizirajućim skupinama (Hofstatter i Lahr 2021).

2.2. MMR POSREDOVAN EndoMS PROTEINOM

Unatoč činjenici da većina arheja ne sadrži homologe proteina kanonskog oblika MMR, nije primijećena povećana stopa mutacija i rekombinacija između nehomolognih regija što ukazuje na postojanje alternativnog puta popravka (Castañeda-García i sur. 2017). Ključni enzim alternativnog puta popravka je endonukleaza EndoMS (od engl. *mismatch-specific endonuclease*). Enzim je otkriven u *Pyrococcus abyssi* kada je opisana njegova nukleazna aktivnost na jednolančanoj DNA (Ren i sur. 2009). Daljnjim istraživanjima otkriveno je kako enzim ima mogućnost cijepanja razgranate DNA, krivo sparenih baza te deaminirane DNA što znači da bi mogao sudjelovati ne samo u popravku krivo sparenih baza već i ekscizijskom

popravku baza te izrezivanju lezija koje narušavaju strukturu DNA (Ishino i sur. 2016). Enzim je dimer (**Slika 2A**) čije se podjedinice sastoje od dvije domene za koje se smatra da su bile međusobno neovisne no da je tijekom evolucije došlo do njihove fuzije u arhejama (Castañeda-García i sur. 2017). N-terminalna domena enzima veže DNA dok C terminalna domena posjeduje endonukleaznu aktivnost (Ren i sur. 2009). EndoMS prepoznaje dvolančanu DNA koja ima krivo sparene G/T, G/G, T/T, T/C i A/G baze, no uspješnost uklanjanja pogrešaka, kao što je prethodno opisano i za protein MutS, nije ista za sve krivo sparene baze. Naime, enzim najbolje prepoznaje G/T, G/G i T/T parove. EndoMS ne cijepa supstrat koji sadrži C/C, A/C i A/A krivo sparene baze. Moguće je da interakcija s drugim proteinima omogućava EndoMS prepoznavanje svih krivo sparenih baza ili da postoje drugi enzimi koji prepoznaju C/C, A/C i A/A sparivanja. Suprotno mehanizmu kanonskog oblika MMR, uklanjanje pogrešaka ne ovisi o sekvencama koje omeđuju pogrešku (Ishino i sur. 2016). Vezanjem na DNA enzim poprima zatvorenu konformaciju čime se omogućava kontakt nukleaznih domena sa fosfatnom okosnicom nukleinske kiseline i izvrtanje krivo sparenih baza iz heliksa DNA (**Slika 2B**). Izvrtanje baza dovodi DNA u pogodnu konformaciju unutar katalitičkih domena enzima (Ariyoshi i Morikawa 2016). Za razliku od enzima MutL i MutH koji prepoznaju nosivac novosintetizirani lanac u kojem je potrebno uvesti rez, EndoMS nema mogućnost diskriminacije lanaca te rez uvodi u oba lanca DNA. Posljedica cijepanja je nastanak 5' stršećih krajeva. Aktivnost EndoMS regulirana je pomoću PCNA koji postavlja enzim u blizinu replikacijskih rašlji čime se omogućava popravak pogrešaka netom nakon njihova nastanka. Zbog toga što EndoMS uvodi dvolančani lom, moguće je da je popravak krivo sparenih baza udružen s homolognom rekombinacijom (Ishino i sur. 2016). Tvrdnju podupire činjenica da se rodu *Thermococcus* gen za protein EndoMS nalazi u operonu s *radA* genom koji kodira protein nužan za provođenje homologne rekombinacije (Ishino i sur. 2016; Ren i sur. 2009). Kako bi se utvrdio značaj povezanosti transkripcije navedenih gena, potrebna su daljnja istraživanja. Dvolančani lom najteži je oblik oštećenja DNA te može imati letalne posljedice što znači da ukoliko se homologna rekombinacija odvija nakon djelovanja EndoMS proteina, ona mora biti izrazito uspješna. Ključ te uspješnosti i održavanja ovakvog sustava popravka mogla bi biti prisutnost više kopija genoma u stanici, kao što je to često u arhejskim vrstama koje pripadaju koljenu *Euryarchaeota* (Ishino i sur. 2016; White i Allers 2018). Enzim EndoMS nije prisutan u svim arhejskim vrstama već kao i MutS te MutL ima složenu raspodjelu; kodiraju ga halofili, termofili iz koljena *Crenarchaeota* i *Euryarchaeota* te koljena *Thorarchaeota* koje pripada nadkoljenu *Asgardarchaeota*. Također, geni koji kodiraju za proteine kanonskog puta popravka te EndoMS puta popravka mogu biti istovremeno prisutni u arhejskim genomima. No, postoje

i vrste arheja kod kojih nisu pronađeni MutS, MutL i EndoMS proteini što ukazuje na postojanje neotkrivenih puteva popravka krivo sparenih baza. Zanimljivo je da za EndoMS kodira i skupina bakterija, *Actinomycetota* koje nemaju gene koji kodiraju MutS i MutL proteine (Castañeda-García i sur. 2017). Uloga EndoMS proteina u popravku pogrešno sparenih baza u bakterijama dokazana je istraživanjima provedenim na *Corybacterium glutamicum*. Naime, pokazano je da bakterijski oblik enzima može izrezivati G/T, G/G i T/T krivo sparene baze. Kao i kod arhejskog homologa čija je aktivnost regulirana PCNA, aktivnost bakterijskog homologa vjerojatno se regulira interakcijom s β hvataljkom (Ishino i sur. 2018).



Slika 2. A) Struktura proteina EndoMS vezanog za DNA. Tirkiznom i zelenom bojom označene su podjedinice dimera. Tamno zelene kugle prikazuju Mg²⁺ ione koji se nalaze u aktivnim mjestima. B) Shematski prikaz stvaranja homodimera EndoMS koji se potom veže na DNA i interagira s PCNA. PCNA pomaže enzimu da se veže na krivo sparene baze koje enzim potom prepoznavanje izvrtanjem pogrešno sparenih baza iz heliksa DNA. Naposljetku enzimu uvodi dvolančani lom. Slika A je preuzeta i prilagođena iz White i Allers (2018). Slika B je preuzeta i prilagođena iz Ariyoshi i Morikawa (2016).

Kao što je već spomenuto, EndoMS nastao je u arhejama fuzijom dvaju zasebnih domena. Potom je došlo do njegova prijenosa iz arheja u bakterije *Deinococcus-Thermus* i horizontalnog prijenosa gena u pretka koljena *Actinomycetota* koji nije imao gene koji kodiraju za proteine kanonskog puta popravka. Iako enzim nije pronađen u eukariotima, moguće je kako C terminalna domena EndoMS sudjeluje u izgradnji raznih eukariotskih proteina (Castañeda-García i sur. 2017).

3. HOMOLOGNA REKOMBINACIJA

Dvolančani lomovi DNA najteži su oblik oštećenja koji ako ostanu nepopravljeni mogu uzrokovati genomsku nestabilnost pa i staničnu smrt. Najčešći uzrok lomova su oksidativne reakcije uzrokovane reaktivnim kisikovim radikalima koji nastaju metabolizmom stanica. Hidroliza, deaminacija nukleotida, sparivanje pogrešnih baza ili torzijski stres DNA tijekom replikacije, rekombinacije i segregacije DNA, uzrokuju zaustavljanje te kolaps replikacijskih rašlji čime također nastaju dvolančani lomovi. Ako postoji greška u djelovanju topoizomeraza, i one su potencijalni izvor dvolančanih lomova. Osim unutrašnjih faktora koji mogu uzrokovati oštećenje DNA, vanjski faktori poput ionizirajućeg zračenja, mehaničkog oštećenja, UV zračenja, X-zraka te γ zračenja mogu putem stvaranja reaktivnih kisikovih radikala uzrokovati dvolančana oštećenja (De Falco i De Felice 2021). Razvijeno je nekoliko mehanizama koji su nužni za popravak dvolančanih lomova u arhejama; sparivanje nehomolognih krajeva, alternativno spajanje krajeva, sparivanje jednolančanih krajeva i homologna rekombinacija. Mehanizmi djeluju u različitim fazama staničnog ciklusa i/ili pri različitim karakteristikama loma. Homologna rekombinacija najbolje je istražen put popravka dvolančanih lomova u arhejama (Whie 2011). Homologna rekombinacija ujedno je i jedini točan put popravka lomova u DNA jer kao kalup za popravak koristi drugu, intaktnu molekulu DNA. Osim popravka pogrešaka, HR omogućava ponovno pokretanje replikacije nakon zaustavljanja ili kolapsa replikacijskih rašlji. HR se odvija u tri koraka; presinapsa, sinapsa te postsinapsa, čije odvijanje omogućuju specifični, pomno koordinirani proteini (De Falco i De Felice 2021).

3.1. PRESINAPSA

Kako bi se započeo proces popravka dvolančanih lomova, tijekom presinapse dolazi do prepoznavanja dvolančanog loma te stvaranja 3' stršćih krajeva. S procesiranim krajevima može interagirati protein RadA (od engl. *radiation-sensitive protein A*) čime se ulazi u korak stvaranja sinapse. U bakterijama navedeno radi kompleks RecBCD dok kod arheja navedeno obavljaju enzimi Mre11 (od engl. *meiotic recombination 11*) i Rad50 (od engl. *radiation sensitive 50*) koji tvore MR kompleks te helikaza HerA (od engl. *helicase of repair in Archaea*) i nukleaza NurA (od engl. *nuclease of repair in Archaea*). Na zajedničku ulogu proteina ukazuje i činjenica da geni koji kodiraju za proteine Mre11, Rad50, HerA i NurA čine operon (McRobbie i sur. 2009; Wang i sur. 2012). Homolozi Mre11 te Rad50 pronađeni su u svim organizmima te su u bakterijama to proteini SbcD (od engl. *nuclease SbcCD subunit D*) odnosno SbcC (od engl. *nuclease SbcCD subunit C*). U eukariotima je prisutna treća

komponenta koja sudjeluje u izgradnji Mre11/Rad50 kompleksa, protein nibrin odnosno protein Xrs2 (od engl. *DNA repair protein XRS2*) u kvascima (De Falco i De Felice, 2021; Hopkins i Paull, 2008). Eukariotski homologe HerA i NurA su proteini Dna2 (od engl. *DNA replication helicase/nuclease 2*) i Exo1 (od engl. *exonuclease 1*) odnosno Sgs1 (od engl. *slow growth suppressor 1*). Bakterijski homologe HerA i NurA pronađeni su u vrsti *Deinococcus radiodurans* (De Falco i De Felice 2021).

Biokemijskim istraživanjima okarakterizirana je 3'-5' egzonukleaznu aktivnost i nukleazna aktivnost Mre11 na jednolančanoj DNA. Protein Rad50 djeluje kao ATP-aza te ima kinazu aktivnost i mogućnost vezivanja DNA (Hopkins i Paull 2008). Aktivnost kompleksa MR regulirana je vezivanjem te potom hidrolizom ATP-a čime dolazi do konformacijske promjene (Deshpande i sur. 2014; Hogrel i sur. 2018). U otvorenoj konformaciji, kada još nema vezanog ATP-a, kompleks MR veže DNA no vezanje nije ograničeno na krajeve. Vezivanjem ATP-a kompleks prelazi u zatvorenu konformaciju u kojoj specifično veže krajeve DNA, potiče njihovu ligaciju i aktivacijom kinaza prenosi signal o oštećenju DNA. No, u ovoj konformaciji ne dolazi do procesiranja krajeva. Hidrolizom ATP-a koju vrši Rad50, kompleks prelazi u prijelazno stanje u kojem ima sposobnost procesiranja krajeva točnije stvaranja kratkih 3' stršećih krajeva te udruživanja s proteinima koji pomažu u procesu nastanka dužih 3' stršećih krajeva. Kompleks se naposljetku vraća u početnu, otvorenu konformaciju otpuštanjem vezane DNA. (Deshpande i sur. 2014). Iako PCNA ne utječe na hidrolizu ATP-a ili sposobnost vezivanja DNA, vezivanjem za kompleks MR potiče još nepoznatim mehanizmom procesiranje 5' krajeva (Hogrel i sur. 2018). Kompleks MR arheje *H. volcanii* osim što sudjeluje u popravku DNA, uzrokuje i promjenu strukture DNA čineći je kompaktnijom. Moguće je da se time ubrzava vezivanje proteina koji sudjeluju u popravku oštećenja (Delmas i sur. 2013). Također, u vrsti *Sulfolobus acidocaldarius* uočeno je kako dolazi do posttranslacijske metilacije kompleksa MR pri izlaganju γ zračenju (Kish i sur. 2016). Razlog metilacije nije poznat, no moguće je kako metilacija utječe na interakcije proteina u kompleksu ili sudjeluje u regulaciji odgovora na popravak (Gong i sur. 2020; Kish i sur. 2016; Lu i sur. 2021). Za razgradnju 5' kraja DNA nužni su Rad50, HerA i NurA dok je aktivnost Mre11 potrebna samo ako je kraj blokiran, primjerice vezanjem proteina. Iako se ne zna kako NurA i HerA interagiraju s kompleksom MR, zna se da je kompleks nužan za njihovu aktivaciju te da sva četiri proteina zajedno djeluju pri procesiranju krajeva dvolančanog loma (De Falco i De Felice 2021). NurA i HerA nužni su za stvaranje dugih 3' stršećih krajeva (Hogrel i sur. 2018; Hopkins i Paull 2008). NurA djeluje kao 5'-3' jednolančana i dvolančana egzonukleaza te jednolančana

nukleaza dok je HerA helikaza i ATP-aza (Constantinesco i sur. 2002). NurA je homodimer čije podjedinice tvore kanal unutar kojeg se na suprotnim stranama nalaze dva aktivna mjesta. Unutrašnjost kanala unutar kojeg se mogu smjestiti dva lanca DNA koja nisu međusobno vezana, čine pozitivno nabijeni bočni ogranci aminokiselina koji omogućavaju interakciju s fosfatnom okosnicom DNA. Dimer NurA tvori kompleks s HerA vežući se na njegove homoheksamere. U stanici se u ravnoteži nalaze homoheptameri HerA te homoheksameri. Prijelaz u homoheksamerni oblik potiče vezivanje ATP koji je izvor energije za pokretanje kompleksa po DNA (Ahdash i sur. 2017). Naime, kao i kod NurA, unutrašnjost prstena oligomera HerA čine pozitivno nabijene aminokiseline koje ostvaruju kontakt s fosfatnom okosnicom supstrata. Hidrolizom ATP-a kompleks se pomiče po DNA, ali kako DNA izlazi iz šireg kanala HerA i ulazi u uzak kanal NurA, u koji ne može ući dvolančana DNA, dolazi do razdvajanja lanaca koji se usmjeravaju u aktivna mjesta NurA gdje dolazi do procesiranja krajeva (Rzechorzek i sur. 2014). Regulacija procesiranja krajeva i dalje je neodgovoreno pitanje. Nije poznato kako dolazi do značajnog skraćivanja samo 5' lanca. Jedna od mogućnosti je da ulaskom DNA u dimer NurA dolazi do promjene njegove konformacije te stvaranja pore kroz koju izlazi 3' jednolančana DNA ili inaktivacije jednog aktivnog mjesta (Byrne i sur. 2014). Slično je opisano u radu Blackwood i sur. (2012) u kojem je predložena mogućnost dva načina procesiranja krajeva, ovisno o njihovom tipu. Prisutnost stršećih krajeva duljih od 10 nukleotida, stimulira degradaciju samo jednog lanca dok drugi lanac ostaje intaktan i ni ne ulazi u kompleks ili izlazi nakon što DNA prođe kroz prsten HerA. Ukoliko su krajevi dvolančanog loma tupi ili kratkih stršećih krajeva veličine do 5 nukleotida, kompleks NurA:HerA degradira oba lanca DNA (Blackwood i sur. 2012). Prema istraživanju koje su proveli De Falco i sur. (2022), predložen je mehanizam regulacije egzonukleazne aktivnosti NurA proteina pomoću proteina SSB (od engl. *single-strand binding protein*) /RPA (od engl. *replication protein A*).

3.2. SINAPSA I POST-SINAPSA

Procesiranjem krajeva DNA prelazi se u središnji korak homologne rekombinacije, invazije 3' krajeva oštećene molekule DNA na drugu, intaktnu molekulu djelovanjem rekombinaze RadA. Naime, protein RadA polimerizira i veže se na jednolančanu DNA koju pritom isteže. Nastali nukleofilament veže dvolančanu DNA te pretražuje između vezane jednolančane i dvolančane DNA regiju homologije. Pronalaskom homologne regije, rekombinaza potiče stvaranje D-omče (Morrical 2015). No, kako bi se to moglo dogoditi, moraju se ukloniti proteini SSB/RPA vezani na 3' procesirane krajeve (Wardell i sur. 2017). Paralozi SSB/RPA prisutni u koljenu *Euryarchaeota* pokazuju sličnosti s eukariotskim RPA,

dok su proteini koji vežu jednolančanu DNA u koljenu *Crenarchaeota* sličniji bakterijskom proteinu SSB (White i Allers 2018).

Većina arheja kodira za dva ili više paraloga proteina RadA. RadB (od engl. *radiation-sensitive protein B*) je medijator rekombinacije; potpomaže formaciju nukleofilamenta istiskivanjem vezanih SSB/RPA (Patoli i sur. 2017; Wardell i sur. 2017). Za razliku od RadA, protein RadB ima slabu ATP-aznu aktivnost koja ne ovisi o DNA, nema mogućnost poticanja izmjene lanaca te se za DNA veže velikim afinitetom (Komori i sur. 2000). Prema novijim istraživanjima jedna od mogućih uloga paraloga RadB je da interakcijom s inaktivnim monomerima RadA uzrokuje promjenu konformacije koja aktivira monomere potičući time polimerizaciju RadA. Paralog SsoRal1 iz *S. solfataricus* također stimulira stvaranje nukleofilamenta (Wardell i sur. 2017). Suprotno djelovanju navedenih medijatora rekombinacije paralozi RadA rekombinaze, Sso2452 iz *S. solfataricus* i stRadC2 izoliran iz *S. tokodaii* onemogućuju djelovanje rekombinaze (McRobbie i sur. 2009; Wang i sur. 2012). Naime, *S. solfataricus* je termofilna arheja koja ima konstitutivno eksprimiran RadA te inhibicija njegova djelovanja možda sudjeluje u očuvanju genoma, sprečavajući pretjerano odvijanje rekombinacije koja bi mogla uvesti nestabilnosti (Wang i sur. 2012).

Protein RadA i njegovi paralozi pripadaju porodici proteina RecA (od engl. *recombinase A*) koji su izrazito konzervirani u sve tri domene života. Bakterijski homolog naziva se RecA, a u eukariotima je pronađen velik broj homologa nastalih duplikacijom gena od kojih su najpoznatiji proteini RAD51 (od engl. *radiation sensitive 51*) te DMC1 (od engl. *disrupted meiotic cDNA 1*). Arhealni protein RadA pokazuje veliku sličnost s eukariotskim proteinom RAD51 (Patoli i sur. 2017), a prema modelu Lin i sur. (2006) eukariotski geni *recA/rad51* nastali su duplikacijama iz dvaju porodica koje su nastale duplikacijom gena *recA* u arhejama, prije nastanka eukariota.

Nastanak D-omče svojevrsna je kontrolna točka homologne rekombinacije u kojem se određuje daljnji smjer odvijanja popravka dvolančanog loma. Naime, ukoliko samo jedan 3' kraj dvolančanog loma tvori D-omču, dolazi do sintezom ovisnog sparivanja lanaca (SDSA od engl. *synthesis-dependent strand annealing*). U SDSA, 3' kraj dvolančanog loma služi kao početnica za sintezu nedostajućeg slijeda s intaktnim lancem DNA kao kalupom (Marshall i Santangelo 2020). SDSA nikada ne rezultira rekombinacijom. Enzim koji je vjerojatno zadužen za destabilizaciju D-omče nakon sinteze nedostajućeg slijeda u SDSA je helikaza Hel308a (od engl. *ATP-dependent DNA helicase Hel308*) koji djeluje kao 3'-5' translokaza (Guy i Bolt 2005). Protein Hel308a izoliran iz *Sulfolobus tokodaii* pokazuje 3'-5' i 5'-3' helikaznu

aktivnost te tvori kompleks s PCNA i endonukleazom Hjc (od engl. *Holliday junction cleavage*) koja razrješuje Hollidayeve veze (Li i sur. 2008) zbog čega je predloženo da enzim sudjeluje u širenju Hollidayevih veza, koraku homologne rekombinacije koji slijedi nakon sinapse te posreduje razrješenju i nastanku rekombinantnih produkata. Širenje Hollidayeve veze se može dogoditi spontano ili biti katalizirano enzimima (Kvaratskhelia i sur. 2001). Zbog te moguće uloge, Hel308a se još naziva i Hjm točnije na engleskom jeziku "*Holliday junction migrase*". Zanimljivo je kako helikaza Hel308a nema afinitet za vezivanje na Hollidayeve veze kao što to ima kompleks RuvABC koji je zadužen za širenje Hollidayevih veza u bakterijama (Guy i Bolt 2005). Provedena istraživanja ukazuju i na moguću ulogu u popravku zaustavljenih replikacijskih rašlji te uklanjanja proteina vezanih na 3' kraj (Guy i Bolt 2005; Richards i sur. 2008). Uz Hel308a, postoje još tri enzima koja bi mogla imati ulogu u širenju Hollidayeve veze: PINA (od engl. *helicase PilT N-terminal-(PIN)-domain-containing ATPase*), aLhr2 te aLhr1 (Suzuki i sur. 2022). Proteini aLhr2, aLhr1 te Hel308a imaju zajedničkog pretka i djeluju na sličan način pa je moguće kako aLhr1 i aLhr2 mogu sudjelovati u popravku zaustavljenih replikacijskih rašlji (Suzuki i sur. 2022). Protein Hel308a visoko je konzerviran među arhejama (Fujikane i sur. 2005). Ortolozi Hel308a prisutni su u Metazoa (Richards i sur. 2008), no nisu pronađeni u bakterijama i kvascima (Fujikane i sur. 2005). Homolog prisutan u ljudima djeluje kao i arhejski ortolog, točnije kao 3'-5' helikaza (Richards i sur. 2008). Prema istraživanju na termofilnoj arheji *Sulfolobus acidocaldarius* pokazano je da je Hel308a nužan za popravak kolabriranih replikacijskih rašlji dok je njegova uloga u širenju Hollidayevih veza upitna (Matsuda i sur. 2022).

PINA je enzim koji tvori heksamerni prsten, ima ATP-aznu aktivnost (Zhai i sur. 2017) te izgledom nalikuje na helikazu RuvB (od engl. *Holliday junction branch migration complex subunit RuvB*) iz bakterija (Matsuda i sur. 2022). Prema istraživanju na *S. islandicus* koje su proveli Zhai i sur. (2017), PINA s Hel308a i Hjc sudjeluje u pokretanju zaustavljenih replikacijskih rašlji i širenju Hollidayevih veza. Zbog oprečnih rezultata dobivenih proučavanjem homologne rekombinacije u različitim vrstama arheja potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo koji proteini sudjeluju u posljednjim koracima homologne rekombinacije i kako interagiraju. Naime, važnost proteina Hel308a i PINA razlikuje se među različitim vrstama arheja te su u nekim oni nužni za vijabilnost stanica dok u nekima nisu, što upućuje na postojanje drugih proteina koji obavljaju iste uloge (Matsuda i sur. 2022).

Na kraju, kao što je već spomenuto dolazi do razrješenja Hollidayevih veza djelovanjem endonukleaze Hjc koja je prisutna u svim arhejskim vrstama (Komori i sur. 1999; Kvaratskhelia

i sur. 2000). Hjc je dimer s domenom za vezanje bivalentnih kationa, Mn^{2+} ili Mg^{2+} (Nishino i sur. 2001) o kojima i ovisi endonukleazna aktivnost enzima (Kvaratskhelia i sur. 2000). Bazični ogranci enzima važni su za prepoznavanje križne strukture DNA na koje se enzim veže. Vezivanjem se mijenja konformacija DNA i uvode se urezi u dvolančanu regiju DNA udaljenu 3 parova baza od Hollidayeve veze. Aktivnost rezolvaze u arheji *Sulfolobus islandicus* inhibirana je fosforilacijom što je analogno regulaciji eukariotskih rezolvaza GEN1 (od engl. *flap endonuclease GEN homolog 1*) i Yen1 (od engl. *Holliday junction resolvase YEN1*) (Huang i sur. 2019). Zanimljiva je i mogućnost da je fosforilacija rezolvaze Hjc ovisna o staničnom ciklusu čime se omogućuju interakcije s različitim proteinima kao što su spomenuti Hjm ili PINA, kako bi se razriješila Hollidayeva veza. (Huang i sur. 2019). Prema istraživanju Komori i sur. (2000) provedenom na *Pyrococcus furiosus* pokazano je da je aktivnost Hjc regulirana interakcijama s proteinom RadB. Uz Hjc u pojedinim arhejama pronađene su još dvije rezolvaze, Hje (od engl. *Holliday junction endonuclease*) i Hjr (od engl. *Holliday junction resolvases*) koje se međusobno ali i u odnosu na Hjc razlikuju s obzirom na mjesto uvođenja ureza (Kvaratskhelia i sur. 2001). U organizmima koji kodiraju i za Hjc i za Hje, enzimi imaju redundantnu ulogu no inaktivacija oba gena je letalna (Matsuda i sur. 2022). Nedostatak Hjc i Hef (od engl. *helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA*) u pripadnicima koljena *Euryarchaeota* također se ispostavila letalnom te je protein Hef u *H. volcanii* nužan za vijabilnost stanica kada je Hjc rezolvaza nefunkcionalna (Lestini i sur. 2013; Matsuda i sur. 2022). Protein Hef djeluje kao endonukleaza i helikaza te pripada XPF/MUS81 porodici proteina (Lestini i sur. 2010). Hef je specifičan za pripadnike koljena *Euryarchaeota* dok pripadnici koljena *Crenarchaeota* kodiraju za skraćenu verziju XPF proteina koja nema helikaznu domenu, (Creze i sur. 2012). Protein Hef sudjeluje u ponovnom uspostavljanje replikacijskih rašlji nakon njihova kolapsa, pružajući alternativan put za popravak neovisan o Hjc (Lestini i sur. 2013). Otkriveno je kako enzim tvori kompleks s PCNA i EndoMS, proteinom koji sudjeluje u popravku krivo sparenih baza, te je moguće kako PCNA regulira aktivnost oba proteina (Creze i sur. 2012; Lestini i sur. 2013).

3.3. BIOTEHNOLOŠKA VAŽNOST PROTEINA HOMOLOGNE REKOMBINACIJE

Saznanja prikupljena istraživanjem procesa homologne rekombinacije u arhejama imaju i značajne praktične primjene. Poticanjem homologne rekombinacije među pojedinim regijama arhealnog genoma i plazmida moguće je deletirati ili mutirati gene (White i Allers 2018). Tako je pripremljen velik broj mutanata raznih vrsta arheja koje se koriste kao modelni organizmi; *P. furiosus*, *S. islandicus* i *H. volcanii* (Leigh i sur. 2011; White i Allers 2018). RadA izoliran

iz termofilnih arheja, može se koristiti za povećanje kvalitete rezultata PCR reakcija, smanjujući pozadinske šumove (Stefanska i sur. 2016). Istraživanja kinetike i mehanizma djelovanja Hel308a enzima važna su za unaprjeđenje Nanopore sekvenciranja. Glavni problem NGS metode sekvenciranja je pretjerano brzo prolaženje DNA kroz poru zbog čega ne dolazi do točnog očitavanja baze te se istraživanjem proteina koji bi regulirali brzinu prolaska DNA kroz poru nastoji se povećati točnost metode (Craig i sur. 2017).

4. EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA

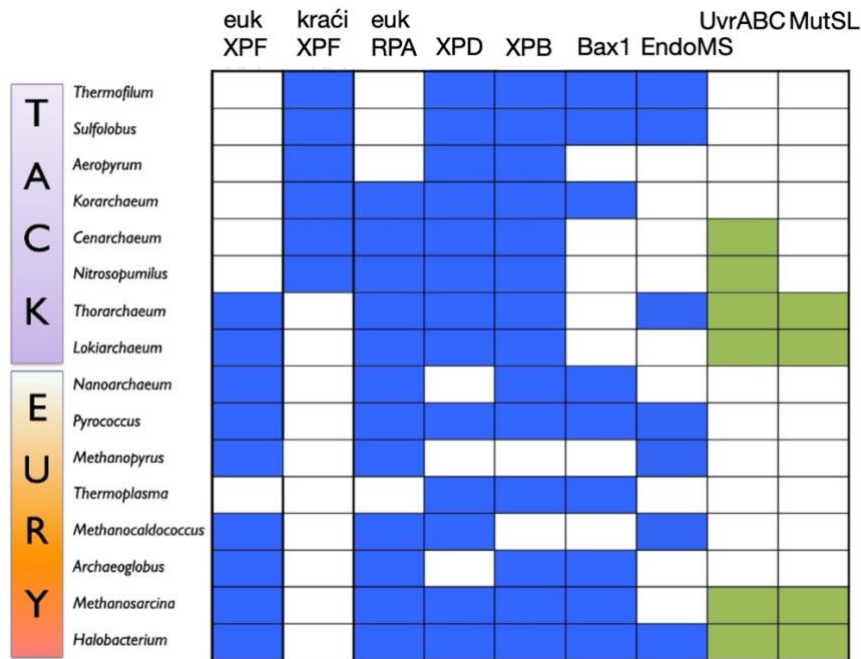
Ekscizijskim popravkom nukleotida uklanjaju se oštećenja koja remete strukturu DNA kao što su na primjer oštećenja nastala djelovanjem UV zračenja. NER se kao i homologna rekombinacija može podijeliti u nekoliko koraka: pronalaženje oštećenja, “odmatanje” DNA te naposljetku izrezivanje oligonukleotida koji sadrži oštećenje (Rouillon i White 2011). Ekscizijski popravak nukleotida dijeli se na globalni kojim se popravljaju pronađena oštećenja u cijelom genomu i ekscizijski popravak nukleotida povezan s transkripcijom kojim se uklanjaju oštećenja prepoznata tijekom transkripcije (Fan i sur. 2006). Bakterijski i eukariotski mehanizmi popravka dobro su poznati, no način na koji se popravak odvija u arhejama nije još poznat. Većina istraživanja vezana uz ekscizijski popravak nukleotida u arhejama usmjerena je na određivanje biokemijskih karakteristika proteina koji bi mogli sudjelovati u popravku, a ne rekonstrukciji mehanizma.

4.1. GLOBALNI EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA

Prvi korak globalnog ekscizijskog popravka, pronalaženje oštećenja, u bakterijama obavlja heterotrimer, UvrA₂B koji potom disocira na UvrB (od engl. *UvrABC system protein B*) koji ostaje vezan za neoštećen lanac DNA. Potom se nukleaza UvrC (od engl. *UvrABC system protein C*) veže na UvrB te uvodi dva ureza, 5' i 3' od oštećenja. (Ogrunc i sur. 1998; Rouillon i White 2011). DNA helikaza II istiskuje oštećeni slijed dug 11-12 nukleotida te omogućuje ponovnu sintezu istisnutog slijeda djelovanjem DNA polimeraze. Povezivanje novosintetiziranog slijeda s ostatkom DNA obavlja DNA ligaza (Kemp i sur. 2012). Konvergentnom evolucijom u eukariotima je nastao ekscizijski popravak nukleotida koji se odvija na sličan način kao i bakterijski (Kemp i sur. 2012). XPC (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group C*) prepoznaje moguće oštećenje, te XPA (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group A*) zatim provjerava je li XPC zapravo vezan za oštećenje. Potom helikaze XPB (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group B*) i XPD (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group D*) uzrokuju odmatanje DNA. Helikaze tvore s podjedinicama p63, p52, p44, p34 i p8 srž kompleksa TFIIH (od engl. *transcription factor II H*) koji je očuvan među eukariotima i sudjeluje u transkripciji, regulaciji staničnog ciklusa te NER-u (Rimel i Taatjes 2018). Nukleaze XPG (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group G*) te XPF (od engl. *Xeroderma pigmentosum complementation group F*) uvode 3' i 5' ureze u oštećeni lanac DNA. TFIIH otklanja oligonukleotid s oštećenjem. Nakon otklanjanja slijeda od 30-ak nukleotida, DNA polimeraze

δ ili ϵ ponovno sintetiziraju dio DNA koji nedostaje i ligaza povezuje novosintetizirani dio s ostatkom molekule DNA (Marshall i Santangelo 2020). Aktivnost XPD podjedinice TFIIH potrebna je samo za odvijanje NER-a dok je XPB podjedinica potrebna i za djelovanje TFIIH u transkripciji (Coin i sur. 2007). Mutacije XPD i XPB onemogućuju pravilnu aktivnost TFIIH u popravku oštećenja i transkripciji zbog čega nastaju teške bolesti poput Xeroderma pigmentosum, Cockayneov sindrom i tihotiodistrofija. Navedene recesivne bolesti dijele određene karakteristike kao što je osjetljivost na UV zračenje i poremećaj pojedinaca u razvoju bilo to mentalnom ili fizičkom. Prema kliničkim podacima bolesti su češće uzrokovane mutacijama u podjedinici XPD kompleksa TFIIH nego mutacijama u podjedinici XPB (Rimel i Taatjes 2018) vjerojatno zbog toga što su mutacije XPB letalne jer je enzim potreban za transkripciju (Rouillon i Whites 2010).

Istraživanjem provedenom na *M. thermoautotrophicum*, metanogenoj arheji, pokazano je da kodira za homologe *uvrA*, *uvrB* i *uvrC* gena te da se izrezivanje nukleotida odvija na isti način kao i kod bakterija (Ogrunc i sur. 1998). Ipak, većina arheja sadrži homologe proteina koji sudjeluju u ekscizijskom popravku nukleotida u eukariotima te samo manji broj arhejskih vrsta ima gene *uvr* (**Slika 3**). No, zbog toga što ti proteini imaju uloge u različitim staničnim funkcijama, kao što je opisano za TFIIH kompleks, njihova prisutnost u arhejama ne ukazuje nužno na postojane NER-a (Rouillon i White 2011). U nastavku će, kako je mehanizam ovog popravka ali i njegovo postojanje u arhejama još nepoznanica, biti opisani homolozi proteina koji obavljaju NER u eukariotima.



Slika 3. Raspodjela proteina koji sudjeluju u popravku DNA u pripadnicima natkoljena TACK i koljena *Euryarchaeota*. Obojena polja ukazuju na prisutnost proteina u navedenim koljenima. Zeleno obojena polja predstavljaju proteine koji su vjerojatno preuzeti horizontalnim transferom gena od bakterija. Preuzeto i prilagođeno iz White i Allers (2018).

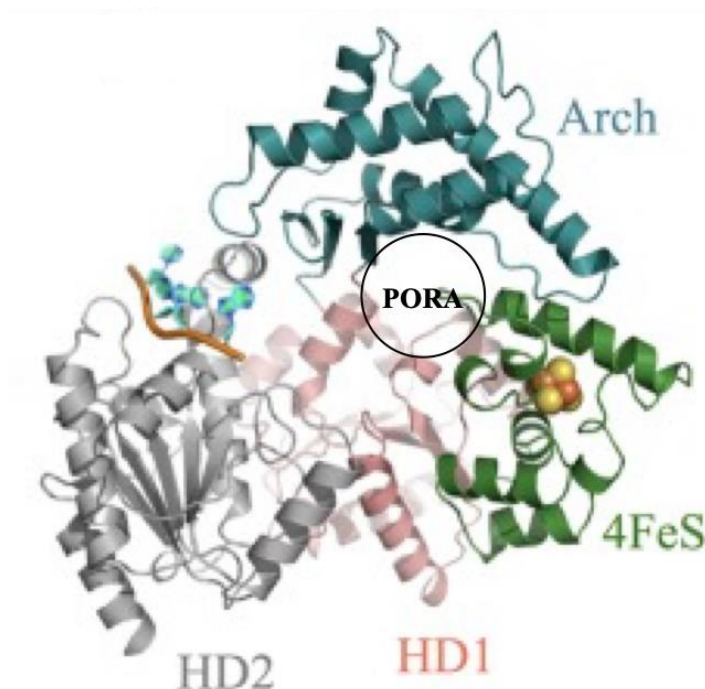
Kao što je prethodno opisano, pronalaženje oštećenja DNA u eukariotskim organizmima obavljaju proteini XPC i XPA. Homolozi navedenih proteina nisu pronađeni u arhejama no moguće je kako su njihovu ulogu preuzeli SSB /RPA (Rouillon i White 2011; White i Allers 2018). Sljedeći korak popravka uključuje odmatanje DNA u blizini oštećenja kako bi se omogućio pristup nukleazama. Geni koji kodiraju za homologe XPB i XPD koji obavljaju ovaj korak u eukariotima, pronađeni su u arhejskim genomima iako one ne sadrže kompleks TFIIH (Roth i sur. 2009). Iako se ne zna sa sigurnošću koji enzim djeluje prvi ni u arheja ni u eukariotima, pretpostavka je da bi to mogao biti XPB jer je za helikaznu aktivnost XPD potreban jednolančani kraj DNA (Duprez i sur. 2020). XPB je enzim koji ima slabu 3'-5' helikaznu aktivnost u prisustvu ATP-a i konzerviran je od arheja do ljudi (Duprez i sur. 2020; Fan i sur. 2006; Rouillon i White 2011). Arhealni XPB zapravo je srž svih homologa XPB koji u strukturi mogu sadržavati dodatne, razne modifikacije N i C terminalne domene kojima se postiže specifičnost regulacije transkripcije i/ili NER-a u pojedinim organizmima (Fan i sur. 2006; Rouillon i White 2010). Mutacije u srži XPB-a su letalne. XPB se na oštećeni lanac DNA veže analogno domeni za prepoznavanje krivo sparenih baza MutS, no kako ne može prepoznavati krivo sparene baze veže se na oštećenja koja uzrokuju promjenu strukture DNA (Fan i sur. 2006). U arhejama je XPB povezan s Mg^{2+} ovisnom nukleazom Bax1 (Roth i sur.

2009; Rouillon i White 2010) koja s proteinom XPB tvori heterodimer. Povezanost s nukleazom upućuje da je prvotna uloga XPB bila u popravku DNA (Rouillon i White 2010). Pripadnici koljena *Crenarchaeota* kodiraju za dva homologa XPB, XPBI i XPBII od kojih samo XPBII tvori kompleks s Bax1 (od engl. *binds archeal XPB*). Helikaza i nukleaza zajedno djeluju u koraku odmatanja DNA. XPB odmata DNA na dijelu koji sadrži oštećenje uvođenjem superzavoja.

Vezivanjem Bax1 za XPB *Euryarchaeota* dolazi do smanjenja ATP-azne aktivnosti, a u koljenu *Crenarchaeota* stvaranjem kompleksa dolazi do suprotnog efekta. Negativni efekt opažen u *Euryarchaeota* je nadjačan vezivanjem kompleksa za supstrat, točnije DNA oblika slova Y te DNA čiji lanci nisu spareni na određenom segmentu. Bax1 arhealne vrste *A. fulgidus* ima dvije nukleazne domene. Jedna od domena se inaktivira vezivanjem za XPB čime se pojačava nukleazna aktivnost druge domene. Također, opaženo je kako se stvaranjem kompleksa mijenja obrazac uvođenja ureza. Jednostavno objašnjenje promjene obrasca urezivanja je da inaktivirana domena ima 5' nukleaznu aktivnost a domena koja ostaje aktivna 3' nukleaznu aktivnost koju dodatno pojačava nastali XPB:Bax1 kompleks odgovoran za odmatanje DNA i uvođenje ureza 3' od oštećenja. 5' urez u pripadnicima koljena *Euryarchaeota* uvodi monomer Bax1. Suprotno tome, u pripadnici koljena *Crenarchaeota* homolog XPF proteina je zadužen za uvođenje ureza 5' zbog čega se, kao što je spomenuto, slobodan Bax1 nalazi u obliku homodimera čime se suprimira njegova aktivnost (Duprez i sur. 2020). Za razliku od arhealnih homologa XPF i XPG koji uvode ureze u blizini prijelaza dvolančane DNA u jednolančanu, Bax1 cijepa isključivo jednolančanu DNA (Roth i sur. 2009).

Nakon otvaranja DNA na mjestu oštećenja enzimima XPB i Bax1, XPD 5'-3' helikaznom aktivnosti odvija veći segment DNA čime se omoguće prostor za vezivanje drugih proteina potrebnih za uklanjanje oštećenja (Roth i sur. 2009). XPD se veže na jednolančanu DNA te DNA čiji lanci nisu spareni na određenom segmentu, a nemaju slobodan kraj (Constantinescu-Aruxandei i sur. 2016; Rudolf i sur. 2010). Arhealni XPD se sastoji od 4 domene; HD1 (od engl. *histone deacetylase 1*) i HD2 (od engl. *histone deacetylase 2*) koje pokreću enzim te 4FeS domenu i "Arch" domenu koje se nalaze u sklopu HD1 s kojom tvore poru (**Slika 4**). Domena HD2 prva ostvaruje kontakt s jednolančanom DNA dok je pora u zatvorenoj konformaciji. Za helikaznu aktivnost nužna je domena FeS u kojoj je klaster 4FeS koordiniran s 4 cisteina od kojih su 3 nužna za funkciju enzima te njihovim mutacijama dolazi do gubitka helikazne aktivnosti (Rudolf i sur. 2006). Moguće je da klaster sudjeluje u prepoznavanju oštećenja prijenosom elektrona na DNA, a time i promjenu konformacije enzima točnije razdvajanje

bliskih domena Arch i 4FeS koje tvore poru kroz koju prolazi DNA (Constantinescu-Aruxandei i sur. 2016; Rudolf i sur. 2010). No, kako je FeS domena prisutna u velikom broju helikaza, vjerojatnije je da ima strukturnu ulogu (Honda i sur. 2009). Domene Arch i 4FeS su nužne za helikaznu aktivnost enzima te onemogućavanjem njihovih interakcija dolazi do smanjenja ATP-azne aktivnosti i onemogućavanja helikazne aktivnosti, no afinitet enzima prema DNA ostaje nepromijenjen (Constantinescu-Aruxandei i sur. 2016). Za razliku od arhealnog XPD koji za aktivnost ne zahtijeva protein: protein interakcije, eukariotski XPD je aktivan samo u kompleksu TFIIH (Liu i sur. 2008). Istraživanjem strukture i mehanizma djelovanja arhealnog XPD, razrješavaju se nepoznanice djelovanja eukariotskog homologa te se produbljuje razumijevanje bolesti, spomenutih na početku poglavlja, koje nastaju kao posljedica mutacije proteina.



Slika 4. Struktura proteina XPD iz *T. acidophilum* vezanog na DNA. Tirkiznom bojom označena je domena “Arch”, zelenom bojom domena 4FeS, svjetlo ružičastom HD1 te sivom bojom domena HD2. Žute i narančaste kuglice predstavljaju klaster 4FeS, a tirkizno-plave kuglice DNA. Crnim krugom označena je pora kroz koju prolazi DNA. Slika je preuzeta i prilagođena iz Constantinescu-Aruxandei i sur. (2016).

Kao što je spomenuto u poglavlju o homolognoj rekombinaciji, arhealni homolog ljudskog proteina XPF je protein Hef koji primarno sudjeluje u popravku zaustavljenih replikacijskih rašlji. U otopini se protein nalazi u obliku homodimera koji sadrži tri domene: nukleaznu, helikaznu i HhH (od engl. *helix-hairpin-helix*) (Nishino i sur. 2005). Domena HhH bitna je za

vezanje proteina na supstrat jer prepoznaje fosfatnu okosnicu DNA (Nishino i sur. 2005). Helikazna i nukleazna domena djeluju kooperativno (Nishino, Komori, Tsuchiya, i sur. 2005) te je njihova aktivnost pospješena hidrolizom ATP-a (Komori i sur. 2004). Pripadnici koljena *Euryarchaeota* kodiraju za duži oblik Hef koji ima nukleaznu i helikaznu funkcionalnu domenu dok pripadnici koljena *Crenarchaeota* kodiraju za skraćeni oblik proteina Hef koji sadrži samo nukleaznu funkcionalnu domenu. Skraćeni oblik proteina Hef za razliku od dužeg ima domenu za interakciju s PCNA (Nishino, Komori, Ishino, i sur. 2005). Pojedine arheje kodiraju endonukleazu HAN (od engl. *Hef-associated nuclease*) koja interagira s proteinom Hef. Uloga endonukleaze je vjerojatno degradacija 3' stršećih krajeva ili rašljaste dvolančane DNA koji su mogući intermedijeri tijekom popravka zaustavljenih replikacijskih rašlji (Feng i sur. 2018). Smatra se kako je prvotna uloga eukariotskog XPF nije bila u mehanizmu popravka izrezivanjem nukleotida kao što ni arhejski homolog Hef ne sudjeluje u NER-u. Također, kraći oblik Hef pronađen u koljenu *Crenarchaeota* vjerojatno je predak ostalih proteina koji je u eukariotima evoluirao u velik broj paraloga koji sudjeluju u različitim putevima popravka (Rouillon i White 2011).

4.2. EKSCIZIJSKI POPRAVAK NUKLEOTIDA POVEZAN S TRANSKRIPCIJOM

Drugi oblik ekscizijskog popravaka nukleotida, TC-NER omogućuje popravak oštećenja DNA koja usporavaju RNA polimerazu. Zaustavljen transkripcijski elongacijski kompleks (TEC) u eukariotima prepoznaje TRFC (od engl. *transcription repair coupling factor*) koji potiče vezivanje kompleksa TFIIF i enzima koji sudjeluju u ekscizijskom popravku na mjesto oštećenja dok u bakterijama vezivanje Uvr enzima na oštećenje potiče terminacijski faktor Mfd (od engl. *mutation frequency decline protein*). Iako ovakva vrsta popravka nije još opisana u arhejama postoji sve više dokaza kako on postoji u nekim skupinama, posebice onima koji pripadaju koljenu *Euryarchaeota* (Marshall i Santangelo 2020). Primjerice RNA polimeraza *Thermococcus kodakarensis* prepoznaje razna oštećenja DNA te se na njima zaustavlja tako da su zarobljena u transkripcijskom elongacijskom kompleksu ukazujući na postojanje ekscizijskog popravka povezanog s transkripcijom u nekim arhejama (Gehring i Santangelo 2017). Walker i sur. (2017) opisali su prvi arhealni terminacijski faktor Eta (od engl. *Euryarchaeal termination activity*) koji otpušta zaustavljeni ili sporo djelujući elongacijski kompleks i novosintetizirani lanac RNA. Enzim Eta je konzerviran u većini arheja. Za djelovanje helikaze Eta kao i terminacijskih faktora drugih domena potreban je ATP. Eta i Mfd vjerojatno djeluju na sličan način. Vežu se uzvodno od transkripcijskog elongacijskog kompleksa te se energijom oslobođenom hidrolizom ATP kreću po DNA gurajući RNA

polimerazu što na kraju uzrokuje disocijaciju transkripcijskog elongacijskog kompleksa i otpuštanje sintetizirane RNA (Walker i sur. 2017). No, kako helikaza Eta nije nužna za vijabilnost stanica i ne djeluje na aktivnu RNA polimerazu, vjerojatnije je da je Eta ipak samo jedna komponentna odgovora na oštećenja DNA slična Mfd faktoru nego transkripcijski terminacijski faktor (Fouqueau i sur. 2018).

5. ZAKLJUČAK

Iako dosad nisu pronađeni putevi popravka DNA jedinstveni za arheje te su opisani putevi popravka prisutni i u preostale dvije domene života, oni arhejama pružaju dostatnu zaštitu nasljedne tvari. Načini popravka DNA arheja i dalje kriju brojne nepoznanice, no iz dosad poznatih podataka posebice o HR, MMR i NER-u, koji su opisani u radu, vidi se kompleksnost sustava te umreženosti proteina koji u njima sudjeluju. Također, sva tri mehanizma popravka DNA mogu se odviti na više načina od kojih neki dijele veće sličnosti s mehanizmima popravaka poznatim u bakterijama, a neki mehanizmima popravka DNA u eukariotima. Proučavanjem popravka DNA u arhejama otkriva se evolucija popravaka DNA prisutnih u eukariotima. Također, istraživanja provedena na arhejama pružaju dodatna saznanja o mehanizmima kojima se ti popravci odvijaju u eukariotima te strukturi eukariotskih proteina koji u njima sudjeluju. Naime, zbog sličnosti u strukturi mnogih arhealnih i eukariotskih proteina te termostabilnosti arhealnih proteina, oni se često koriste umjesto eukariotskih homologa u kristalografskim analizama proteinskih struktura. Također, arhealni proteini mogli bi biti izrazito važni u biotehnologiji i medicini, posebice razvoju molekularnih terapija (Han i sur. 2014) i razumijevanju ljudskih bolesti na molekularnoj razini.

6. ŽIVOTOPIS

Filipa Stanojević rođena je 12. ožujka 2003. godine u Puli. Po završetku osnovne škole u Puli 2017. godine upisuje prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Pula. Godine 2021. upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biologija. Od 2022. godine aktivan je član udruge BIUS te sudjeluje na projektima Speleobacilli i Noćni letači Tounja 2024. Sudjeluje u projektu popularizacije znanosti, Dan i noć PMF-a. U sklopu izbornog kolegija Stručna praksa 2023. godine obavlja praksu na Zavodu za molekularni biologiju pod mentorstvom prof.dr.sc Ivane Ivančić Baće. Godine 2024. završila je radionicu “Phylogeny and Evolution” pod voditeljstvom prof. dr. Holger Herlyn na Sveučilištu u Mainzu, Njemačka.

7. LITERATURA

1. Ahdash, Z., Lau, A. M., Byrne, R. T., Lammens, K., Stüetzer, A., Urlaub, H., Booth, P. J., Reading, E., Hopfner, K. P., & Politis, A. (2017). Mechanistic insight into the assembly of the HerA–NurA helicase–nuclease DNA end resection complex. *Nucleic Acids Research*, 45: 12025–12038.
2. Ariyoshi, M., & Morikawa, K. (2016). A Dual Base Flipping Mechanism for Archaeal Mismatch Repair. *Structure*, 24: 1859–1861.
3. Baker, B. J., De Anda, V., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Santoro, A. E., & Lloyd, K. G. (2020). Diversity, ecology and evolution of Archaea. *Nature Microbiology*, 5: 887–900:
4. Blackwood, J. K., Rzechorzek, N. J., Abrams, A. S., Maman, J. D., Pellegrini, L., & Robinson, N. P. (2012). Structural and functional insights into DNA-end processing by the archaeal HerA helicase-NurA nuclease complex. *Nucleic Acids Research*, 40: 3183–3196.
5. Byrne, R. T., Schuller, J. M., Unverdorben, P., Förster, F., & Hopfner, K. P. (2014). Molecular architecture of the HerA-NurA DNA double-strand break resection complex. *FEBS Letters*, 588: 4637–4644.
6. Castañeda-García, A., Prieto, A. I., Rodríguez-Beltrán, J., Alonso, N., Cantillon, D., Costas, C., Pérez-Lago, L., Zegeye, E. D., Herranz, M., Płociński, P., Tonjum, T., García De Viedma, D., Paget, M., Waddell, S. J., Rojas, A. M., Doherty, A. J., & Blázquez, J. (2017). A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes. *Nature Communications*, 8: 14246.
7. Coin, F., Oksenysh, V., & Egly, J. M. (2007). Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Molecular Cell*, 26: 245–256.
8. Constantinesco, F., Forterre, P., & Elie, C. (2002). NurA, a novel 5'-3' nuclease gene linked to rad50 and mre11 homologs of thermophilic Archaea. *EMBO Reports*, 3: 537–542.
9. Constantinesco, F., Forterre, P., Koonin, E. V., Aravind, L., & Elie, C. (2004). A bipolar DNA helicase gene, herA, clusters with rad50, mre11 and nurA genes in thermophilic archaea. *Nucleic Acids Research*, 32: 1439–1447.

10. Constantinescu-Aruxandei, D., Petrovic-Stojanovska, B., Penedo, J. C., White, M. F., & Naismith, J. H. (2016). Mechanism of DNA loading by the DNA repair helicase XPD. *Nucleic Acids Research*, 44: 2806-2815.
11. Craig, J. M., Laszlo, A. H., Brinkerhoff, H., Derrington, I. M., Noakes, M. T., Nova, I. C., Tickman, B. I., Doering, K., De Leeuw, N. F., & Gundlach, J. H. (2017). Revealing dynamics of helicase translocation on single-stranded DNA using high-resolution nanopore tweezers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: 11932–11937.
12. Creze, C., Ligabue, A., Laurent, S., Lestini, R., Laptanok, S. P., Khun, J., Vos, M. H., Czjzek, M., Myllykallio, H., & Flament, D. (2012). Modulation of the *Pyrococcus abyssi* NucS Endonuclease Activity by Replication Clamp at Functional and Structural Levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 287: 15648-15660.
13. De Falco, M., & De Felice, M. (2021). Take a Break to Repair: A Dip in the World of Double-Strand Break Repair Mechanisms Pointing the Gaze on Archaea. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 13296.
14. De Falco, M., Porritiello, A., Rota, F., Scognamiglio, V., Antonacci, A., Del Monaco, G., & De Felice, M. (2022). The Finely Coordinated Action of SSB and NurA/HerA Complex Strictly Regulates the DNA End Resection Process in *Saccharolobus solfataricus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 2582.
15. Delmas, S., Duggin, I. G., & Allers, T. (2013). DNA damage induces nucleoid compaction via the Mre11-Rad50 complex in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular Microbiology*, 87: 168–179.
16. Deshpande, R. A., Williams, G. J., Limbo, O., Williams, R. S., Kuhnlein, J., Lee, J. H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J. A., & Paull, T. T. (2014). ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *The EMBO Journal*, 33: 482-500.
17. Duprez, K., He, F., Chen, Z., Hilario, E., & Fan, L. (2020). Structural basis of the XPB–Bax1 complex as a dynamic helicase–nuclease machinery for DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 48: 6326–6339.
18. Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W., & Ettema, T. J. G. (2017). Archaea and the origin of eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 15: 711–723.

19. Fan, L., Arvai, A. S., Cooper, P. K., Iwai, S., Hanaoka, F., & Tainer, J. A. (2006). Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Molecular Cell*, 22: 27–37.
20. Feng, L., Chang, C. C., Song, D., Jiang, C., Song, Y., Wang, C. F., Deng, W., Zou, Y. J., Chen, H. F., Xiao, X., Wang, F. P., & Liu, X. P. (2018). The trimeric Hef-associated nuclease HAN is a 3'→5' exonuclease and is probably involved in DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 46: 9027–9043.
21. Fouqueau, T., Blombach, F., Cackett, G., Carty, A. E., Matelska, D. M., Ofer, S., Pilotto, S., Phung, D. K., & Werner, F. (2018). The cutting edge of archaeal transcription. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2: 517–533.
22. Fujikane, R., Ishino, S., Ishino, Y., & Forterre, P. (2010). Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Genes & Genetic Systems*, 85: 243–257.
23. Fujikane, R., Komori, K., Shinagawa, H., & Ishino, Y. (2005). Identification of a Novel Helicase Activity Unwinding Branched DNAs from the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 12351–12358.
24. Gehring, A. M., & Santangelo, T. J. (2017). Archaeal RNA polymerase arrests transcription at DNA lesions. *Transcription*, 8: 288–296.
25. Gong, P., Lei, P., Wang, S., Zeng, A., & Lou, H. (2020). Post-Translational Modifications Aid Archaeal Survival. *Biomolecules*, 10: 584.
26. Grogan, D. W. (2004). Stability and Repair of DNA in Hyperthermophilic Archaea. *Current Issues in Molecular Biology*, 6: 137–144.
27. Guy, C. P., & Bolt, E. L. (2005). Archaeal Hel308 helicase targets replication forks in vivo and in vitro and unwinds lagging strands. *Nucleic Acids Research*, 33: 3678–3690.
28. Han, W., Shen, Y., & She, Q. (2014). Nanobiomotors of archaeal DNA repair machineries: Current research status and application potential. *Cell and Bioscience*, 4: 1–12.
29. Hofstatter, P. G., & Lahr, D. J. G. (2021). Complex Evolution of the Mismatch Repair System in Eukaryotes is Illuminated by Novel Archaeal Genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 89: 12–18.

30. Hogrel, G., Lu, Y., Laurent, S., Henry, E., Etienne, C., Phung, D. K., Dulermo, R., Bossé, A., Pluchon, P. F., Clouet-D'Orval, B., & Flament, D. (2018). Physical and functional interplay between PCNA DNA clamp and Mre11–Rad50 complex from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Research*, 46: 5651–5663.
31. Hollingsworth, N. M., Ponte, L., & Halsey, C. (1995). MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes & Development*, 9: 1728–1739.
32. Honda, M., Park, J., Pugh, R. A., Ha, T., & Spies, M. (2009). Single-molecule analysis reveals differential effect of ssDNA-binding proteins on DNA translocation by XPD helicase. *Molecular Cell*, 35: 694–703.
33. Hopkins, B. B., & Paull, T. T. (2008). The *P. furiosus* Mre11/Rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell*, 135: 250–260.
34. Huang, Q., Mayaka, J. B., Zhong, Q., Zhang, C., Hou, G., Ni, J., & Shen, Y. (2019). Phosphorylation of the archaeal holliday junction resolvase *hjc* inhibits its catalytic activity and facilitates DNA repair in *Sulfolobus islandicus* REY15A. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1214.
35. Ishino, S., Nishi, Y., Oda, S., Uemori, T., Sagara, T., Takatsu, N., Yamagami, T., Shirai, T., & Ishino, Y. (2016). Identification of a mismatch-specific endonuclease in hyperthermophilic Archaea. *Nucleic Acids Research*, 44: 2977–2986.
36. Ishino, S., Skouloubris, S., Kudo, H., L'Hermitte-Stead, C., Es-Sadik, A., Lambry, J. C., Ishino, Y., & Myllykallio, H. (2018). Activation of the mismatch-specific endonuclease EndoMS/NucS by the replication clamp is required for high fidelity DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 46 (12): 6206–6217.
37. Kemp, M. G., Reardon, J. T., Lindsey-Boltz, L. A., & Sancar, A. (2012). Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 22889–22899.
38. Kish, A., Gaillard, J. C., Armengaud, J., & Elie, C. (2016). Post-translational methylations of the archaeal Mre11:Rad50 complex throughout the DNA damage response. *Molecular Microbiology*, 100: 362–378.
39. Komori, K., Hidaka, M., Horiuchi, T., Fujikane, R., Shinagawa, H., & Ishino, Y. (2004). Cooperation of the N-terminal Helicase and C-terminal Endonuclease Activities of Archaeal Hef Protein in Processing Stalled Replication Forks. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (51): 53175–53185.

40. Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I. K. O., Mayanagi, K., Shinagawa, H., & Ishino, Y. (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 33782–33790.
41. Komori, K., Sakae, S., Shinagawa, H., Morikawa, K., & Ishino, Y. (1999). A holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: Functional similarity to *Escherichia coli* RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 8873–8878.
42. Kunkel, T. A., & Erie, D. A. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annual Review of Genetics*, 49: 291–313.
43. Kvaratskhelia, M., Wardleworth, B. N., Norman, D. G., & White, M. F. (2000). A conserved nuclease domain in the archaeal Holliday junction resolving enzyme Hjc. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 25540–25546.
44. Kvaratskhelia, M., Wardleworth, B. N., & White, M. F. (2001). Multiple Holliday junction resolving enzyme activities in the Crenarchaeota and Euryarchaeota. *FEBS Letters*, 491: 243–246.
45. Leigh, J. A., Albers, S. V., Atomi, H., & Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiology Reviews*, 35: 577–608.
46. Lestini, R., Duan, Z., & Allers, T. (2010). The archaeal Xpf/Mus81/FANCM homolog Hef and the Holliday junction resolvase Hjc define alternative pathways that are essential for cell viability in *Haloferax volcanii*. *DNA Repair*, 9: 994–1002.
47. Lestini, R., Laptanok, S. P., Kühn, J., Hink, M. A., Schanne-Klein, M. C., Lieb, U., & Myllykallio, H. (2013). Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication. *Nucleic Acids Research*, 41: 10358–10370.
48. Li, Z., Lu, S., Hou, G., Ma, X., Sheng, D., Ni, J., & Shen, Y. (2008). Hjm/Hel308a DNA Helicase from *Sulfolobus tokodaii* promotes replication fork regression and interacts with Hjc endonuclease in vitro. *Journal of Bacteriology*, 190: 3006–3017.
49. Lin, Z., Kong, H., Nei, M., & Ma, H. (2006). Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 10328–10333.

50. Lin, Z., Nei, M., & Ma, H. (2007). The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes—multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Research*, 35: 7591–7603 .
51. Liu, H., Rudolf, J., Johnson, K. A., McMahon, S. A., Oke, M., Carter, L., McRobbie, A. M., Brown, S. E., Naismith, J. H., & White, M. F. (2008). Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell*, 133: 801–812.
52. Lu, R., Zhang, H., Jiang, Y., Wang, Z., Sun, L., & Zhou, Z. (2021). Post-Translational Modification of MRE11: Its Implication in DDR and Diseases. *Genes*, 12: 1158.
53. Marshall, C. J., & Santangelo, T. J. (2020). Archaeal DNA Repair Mechanisms. *Biomolecules*, 10: 1472.
54. Matsuda, R., Suzuki, S., & Kurosawa, N. (2022). Genetic Study of Four Candidate Holliday Junction Processing Proteins in the Thermophilic Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 707.
55. McRobbie, A. M., Carter, L. G., Kerou, M., Liu, H., McMahon, S. A., Johnson, K. A., Oke, M., Naismith, J. H., & White, M. F. (2009). Structural and Functional Characterisation of a Conserved Archaeal RadA Paralog with Antirecombinase Activity. *Journal of Molecular Biology*, 389: 661–673.
56. Modrich, P., & Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. *Annual review of biochemistry*, 65: 101-133.
57. Morrical, S. W. (2015). DNA-pairing and annealing processes in homologous recombination and homology-directed repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7.
58. Nishino, T., Komori, K., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2005). Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms. *Structure (London, England : 1993)*, 13:1183–1192.
59. Nishino, T., Komori, K., Tsuchiya, D., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2001). Crystal structure of the archaeal Holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition. *Structure*, 9: 197–204.
60. Nishino, T., Komori, K., Tsuchiya, D., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2005). Crystal structure and functional implications of *Pyrococcus furiosus* hef helicase domain

- involved in branched DNA processing. *Structure (London, England : 1993)*, 13: 143–153.
61. Ogrunc, M., Becker, D. F., Ragsdale, S. W., & Sancar, A. (1998). Nucleotide excision repair in the third kingdom. *Journal of Bacteriology*, 180: 5796–5798.
62. Patoli, B. B., Winter, J. A., Patoli, A. A., Delahay, R. M., & Bunting, K. A. (2017). Co-expression and purification of the RadA recombinase with the RadB paralog from *Haloferax volcanii* yields heteromeric ring-like structures. *Microbiology (United Kingdom)*, 163: 1802–1811.
63. Ren, B., Kühn, J., Meslet-Cladiere, L., Briffotiaux, J., Norais, C., Lavigne, R., Flament, D., Ladenstein, R., & Myllykallio, H. (2009). Structure and function of a novel endonuclease acting on branched DNA substrates. *EMBO Journal*, 28: 2479–2489.
64. Richards, J. D., Johnson, K. A., Liu, H., McRobbie, A. M., McMahon, S., Oke, M., Carter, L., Naismith, J. H., & White, M. F. (2008). Structure of the DNA repair helicase Hel308 reveals DNA binding and autoinhibitory domains. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 5118–5126.
65. Rimel, J. K., & Taatjes, D. J. (2018). The essential and multifunctional TFIIF complex. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 27: 1018–1037.
66. Roth, H. M., Tessmer, I., Van Houten, B., & Kisker, C. (2009). Bax1 is a novel endonuclease: Implications for archaeal nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 32272–32278.
67. Rouillon, C., & White, M. F. (2010). The XBP-Bax1 helicase-nuclease complex unwinds and cleaves DNA: implications for eukaryal and archaeal nucleotide excision repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 11013.
68. Rouillon, C., & White, M. F. (2011). The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins. *Research in Microbiology*, 162: 19–26.
69. Rudolf, J., Makrantonis, V., Inglede, W. J., Stark, M. J. R., & White, M. F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Molecular Cell*, 23: 801–808.
70. Rudolf, J., Rouillon, C., Schwarz-Linek, U., & White, M. F. (2010). The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway. *Nucleic Acids Research*, 38: 931–941.

71. Rzechorzek, N. J., Blackwood, J. K., Bray, S. M., Maman, J. D., Pellegrini, L., & Robinson, N. P. (2014). Structure of the hexameric HerA ATPase reveals a mechanism of translocation-coupled DNA-end processing in archaea. *Nature Communications*, 5: 5506.
72. Shin-San Su, & Modrich, P. (1986). Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 5057–5061.
73. Smith, J., & Modrich, P. (1996). Mutation detection with MutH, MutL, and MutS mismatch repair proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 4374–4379.
74. Stefanska, A., Gaffke, L., Kaczorowska, A. K., Plotka, M., Dabrowski, S., & Kaczorowski, T. (2016). Highly thermostable RadA protein from the archaeon Pyrococcus woesei enhances specificity of simplex and multiplex PCR assays. *Journal of Applied Genetics*, 57: 239–249.
75. Suzuki, S., Kurosawa, N., Yamagami, T., Matsumoto, S., Numata, T., Ishino, S., & Ishino, Y. (2022). Genetic and biochemical characterizations of aLhr1 helicase in the thermophilic crenarchaeon sulfolobus acidocaldarius. *Catalysts*, 12: 34.
76. Takemoto, N., Numata, I., Su'Etsugu, M., & Miyoshi-Akiyama, T. (2018). Bacterial EndoMS/NucS acts as a clamp-mediated mismatch endonuclease to prevent asymmetric accumulation of replication errors. *Nucleic Acids Research*, 46: 6152–6165.
77. Van Wolferen, M., Pulschen, A., Baum, B., Gribaldo, S., & Albers, S.-V. (2022). The Cell Biology of Archaea. *Nature Microbiology*, 7: 1744–1755
78. Walker, J. E., Luyties, O., & Santangelo, T. J. (2017). Factor-dependent archaeal transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114: E6767–E6773.
79. Wang, L., Sheng, D. H., Han, W. Y., Huang, B., Zhu, S. S., Ni, J. F., Li, J., & Shen, Y. L. (2012). Sulfolobus tokodaii RadA paralog, stRadC2, is involved in DNA recombination via interaction with RadA and Hjc. *Science China Life Sciences*, 55: 261–267.
80. Wardell, K., Haldenby, S., Jones, N., Liddell, S., Ngo, G. H. P., & Allers, T. (2017). RadB acts in homologous recombination in the archaeon Haloferax volcanii, consistent with a role as recombination mediator. *DNA Repair*, 55: 7–16.

81. White, M. F., & Allers, T. (2018). DNA repair in the archaea-an emerging picture. *FEMS microbiology reviews*, 42:514–526.
82. Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J., & Embley, T. M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 504: 231–236.
83. Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5088–5090.
84. Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, Di., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A., & Ettema, T. J. G. (2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541: 353–358.
85. Zhai, B., DuPrez, K., Doukov, T. I., Li, H., Huang, M., Shang, G., Ni, J., Gu, L., Shen, Y., & Fan, L. (2017). Structure and Function of a Novel ATPase that Interacts with Holliday Junction Resolvase Hjc and Promotes Branch Migration. *Journal of Molecular Biology*, 429: 1009–1029.