

# Učinkovitost popravka DNA u mutantu *ssb-1* bakterije *Escherichia coli*

---

Perković, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2009

*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:217:044578>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-15**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Sanja Perković

Učinkovitost popravka DNA u mutantu  
*ssb-1* bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2009. godina

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za mikrobijalnu genetiku Zavoda za molekularnu biologiju Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Ivančić Baće, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvaljujem se mojoj mentorici, doc. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na ukazanom povjerenju, stručnom vodstvu, pomoći i razumijevanju. Kroz mnoge zanimljive rasprave prenijela je na mene dio svog entuzijazma i znanja o temi ovog diplomskog rada.

Ignaciji Vlašić, dipl. ing. i doc. dr. sc. Krunoslavu Brčić-Kostiću zahvaljujem na brojnim korisnim savjetima i zainteresiranosti za moj rad.

Na tehničkoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada zahvaljujem se Mirjani Filipović i Mireli Kosinjski.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINKOVITOST POPRAVKA DNA U MUTANTU *ssb-1* BAKTERIJE *Escherichia coli*

**Sanja Perković**

Institut Ruđer Bošković  
Bijenička 54, 10000 Zagreb

U bakteriji *Escherichia coli* dva su osnovna puta popravka oštećene DNA. RecBCD put služi za popravak dvolančanih lomova. Glavni enzim ovog puta je RecBCD koji ima helikaznu, egzonukleaznu aktivnost, i sposobnost nanošenja proteina RecA na jednolančanu DNA. RecF putem popravljaju se jednolančane praznine molekule DNA. Sve navedene enzimske aktivnosti nema sadržane u jednom enzimu već ih obavljaju proteini RecQ, recJ, RecF, RecO, RecR koji su potrebni za nastanak filameta RecA na jednolančanoj DNA. Mutantni soj *recB1080* kombinira oba puta rekombinacije nadomještajući enzimske aktivnosti (nukleazna i nanošenje RecA) proteinima RecF puta. Mutacijom *ssb-1* nastaje temperaturno nestabilan protein SSB-1 sa smanjenim afinitetom vezanja na jednolančanu DNA.

Cilj ovog rada bio je utvrditi da li će u slučaju slabijeg vezanja proteina SSB-1 za jednolančanu DNA doći do efikasnije zamjene s proteinom RecA. Dobiveni rezultati navode na zaključak da mutacija *ssb-1* inhibira aktivnost enzima RecBCD. Vrlo važanu ulogu u zamjeni tetramera SSB-1 sa proteinom RecA imaju proteini RecFOR.

(36 stranica, 12 slika, 7 tablica, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Escherichia coli*, homologna rekombinacija, RecBCD, RecF, *ssb-1*, DNA popravak

Voditelj: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, doc.

Ocjenitelji:

1. Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, doc.
2. Dr. sc. Mirjana Kalafatić, red. prof.
3. Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, doc.
4. Dr. sc. Višnja Besendorfer, red. prof. (zamjena)

Rad prihvaćen: 11. veljače 2009.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **THE EFFICIENCY OF DNA REPAIR IN *Escherichia coli* *ssb-1* MUTANT**

**Sanja Perković**

Rudjer Boskovic Institute  
Bijenička 54, 10000 Zagreb

Damaged DNA in *Escherichia coli* can be repaired by two main pathways. RecBCD pathway repairs double stranded breaks. The essential enzyme this pathway uses is RecBCD which has helicase, exonuclease activity, and the capability of loading RecA protein onto single stranded DNA. RecF pathway repairs single stranded gaps made in DNA molecule. It does not have a single enzyme performing all the essential activities. RecQ, RecJ, RecF, RecO and RecR proteins are required for polymerization of RecA nucleoprotein filament on single stranded DNA. The lost activities (nuclease and RecA loading) are compensated by combining both pathways of recombination in *recB1080* mutant. Mutation *ssb-1* produces temperature unstable SSB-1 protein which has a lower affinity of binding to single stranded DNA.

In this thesis we wanted to see if lower binding affinity of SSB-1 protein to ssDNA will result in more efficient replacement with RecA protein. Results indicate that *ssb-1* mutation inhibits the activity of RecBCD enzyme. RecFOR proteins are very important for the exchange of SSB-1 tetramere with RecA protein.

(36 pages, 12 figures, 7 tables, 27 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: *Escherichia coli*, homologous recombination, RecBCD, RecF, *ssb-1*, DNA repair

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Asst. Prof.

Reviewers:

1. Dr. Ivana Ivančić Baće, Asst. Prof.
2. Dr. Mirjana Kalafatić, Prof.
3. Dr. Mirna Ćurković Perica, Asst. Prof.
4. Dr. Višnja Besendorfer, Prof. (substitute)

Thesis accepted: February 11th 2009.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 HOMOLOGNA REKOMBINACIJA.....	1
1.2 MOLEKULARNI MODELI HOMOLOGNE REKOMBINACIJE.....	2
1.2.1 Hollidayev model.....	2
1.2.2 Meselson-Radding model .....	2
1.2.3 Model popravka dvolančanog loma.....	3
1.3 MOLEKULARNI MEHANIZMI REKOMBINACIJSKOG POPRAVKA.....	4
1.3.1 RecBCD put.....	5
1.3.2 Rec F put.....	7
1.3.3 Popravak dvolančanog loma u odsutnosti RecBCD .....	9
1.3.4 Protein RecA i stvaranje sinapse.....	10
1.3.5 Razrješenje Hollidayeve veze .....	11
1.3 PROTEIN SSB BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.3.1 Fiziološka svojstva SSB proteina.....	12
1.3.2 Vezanje na DNA .....	13
1.3.3 Gen <i>ssb</i> .....	14
1.3.4 Mutacije gena <i>ssb</i> .....	14
1.3.5 Uloga proteina SSB u rekombinaciji .....	15
2. MATERIJALI I METODE .....	17
2.1 MATERIJALI.....	17
2.1.1 Bakterijski sojevi .....	17
2.1.2 Hranidbene podloge i puferi .....	18
2.1.3 Korišteni uređaji.....	19
2.2 METODE.....	20
2.2.1 Preživljenje nakon UV zračenja.....	20
2.2.2 Krivulja rasta.....	20
2.2.3 Konjugacijska rekombinacija.....	21
3. REZULTATI.....	22

3.1 UTJECAJ MUTACIJE <i>ssb-1</i> NA REKOMBINACIJSKI POPRAVAK .....	22
3.1.1 Utjecaj mutacije <i>ssb-1</i> na rekombinacijski popravak u mutantu <i>recB1080</i> .....	22
3.1.2 Utjecaj mutacije <i>ssb-1</i> na rekombinacijski popravak u mutantima RecF puta	23
3.1.3 Utjecaj mutacije <i>ssb-1</i> na rekombinacijski popravak hibridnim putem kada nedostaju enzimi RecF puta .....	25
3.2 KRIVULJA RASTA .....	26
3.3 KONJUGACIJSKA REKOMBINACIJA .....	27
4. RASPRAVA .....	29
4.1 UTJECAJ MUTACIJE <i>ssb-1</i> NA REKOMBINACIJSKI POPRAVAK .....	29
4.2 KONJUGACIJSKA REKOMBINACIJA .....	32
5. ZAKLJUČCI.....	33
6. LITERATURA .....	34



# 1. UVOD

## 1.1 HOMOLOGNA REKOMBINACIJA

Homologna rekombinacija je proces koji se događa između bilo koja dva DNA slijeda koja imaju određenu razinu homologije. Uključuje izmjenu genetičkog materijala između dvije molekule DNA ili njihovih dijelova. Duljina homolognih regija je varijabilna, a može iznositi samo 23 pb. Prisutnost gena za homolognu rekombinaciju u svim živim bićima pokazatelj je iznimne važnosti mehanizma rekombinacije za opstanak vrsta. Nove kombinacije gena presudne su za prilagodbu na promijenjene okolišne uvijete i osnova su evolucijskih procesa.

Genetičke analize otkrile su brojne gene koji su nužni ili važni za rekombinaciju. Definirano je najmanje dvadeset i pet proteina koji sudjeluju u procesu, a većina njih ne sudjeluje u drugim metaboličkim procesima. Iako mehanizam homologne rekombinacije nije u potpunosti razjašnjen, veliki napredak postignut je istraživanjima na bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*). Poznata su tri osnovna molekularna puta rekombinacije: RecBCD, RecE i RecF. Međutim, svi putevi su međusobno isprepleteni, mnogi enzimi su im zajednički, pa se stroga klasifikacija na tri različita puta napušta. Jedini gen čija inaktivacija u potpunosti blokira ovaj proces je *recA*, stoga se smatra da je njegova uloga ključna. Također, single-stranded DNA-binding protein (SSB) sudjeluje u rekombinaciji olakšavajući polimerizaciju proteina RecA na jednolančanu (ss) DNA. Bez SSB proteina RecA filamenti su *in vitro* neproduktivni (Kuzminov i Stahl 2005).

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost homologne rekombinacije u mutantu *ssb-1* bakterije *E. coli*. Protein SSB-1 slabijim se afinitetom veže na jednolančanu DNA. Uz mutaciju *ssb-1*, konstruirani su i drugi dvostruki i trostruki mutantni sojevi koji nose mutacije u određenim genima bitnima u procesu inicijacije rekombinacije. Mjerenjem preživljenja stanica nakon izlaganja UV zračenju i praćenjem uspješnosti konjugacijske rekombinacije moguće je donijeti zaključke o ulozi i važnosti pojedinih proteina u nastanku filamenta RecA, te pokušati odgovoriti na pitanje da li će se protein RecA lakše vezati na ssDNA kada protein SSB ima slabiji afinitet vezanja na ssDNA.

## **1.2 MOLEKULARNI MODELI HOMOLOGNE REKOMBINACIJE**

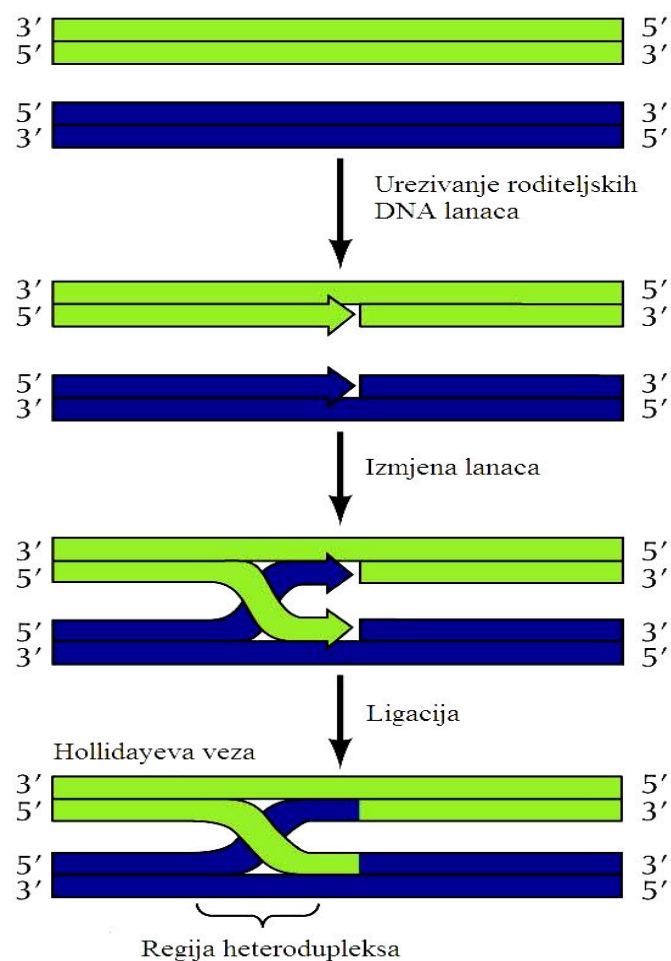
### **1.2.1 Hollidayev model**

Robert Holliday je 1964. godine predložio prvi model homologne rekombinacije (slika 1). Pretpostavka ovog modela je bila da do izmjene genetičkog materijala dolazi uslijed pucanja jednog lanca DNA u oba homologa na istom mjestu. Slobodni krajevi lanaca se sparuju sa svojim homolognim slijedovima na drugoj DNA stvarajući regiju heterodupleksa. Dolazi do spajanja krajeva DNA i stvaranja Hollidayeve veze. Razrješenje veze može dati rekombinirani (spliced), ali i nerekombinirani (patched) produkt ovisno o konfiguraciji veze, odnosno njenoj izomerizaciji (slika 2). Hollidayeva veza se može širiti (migrirati) duž molekule DNA razaranjem i ponovnim stvaranjem vodikovih veza koje drže dva lanca DNA međusobno sparenima. Ovaj model naziva se i model dvolančane invazije jer se jedan lanac od svake DNA sparuje s drugom molekulom DNA (Snyder i Champness 1997).

Iako Hollidayev model ima više nedostataka, svaki slijedeći model preuzima stvaranje Hollidayeve veze, njenu izomerizaciju, migraciju i razrješenje. Razlike se uvode u prve stadije rekombinacije, prije nastanka Hollidayeve veze.

### **1.2.2 Meselson-Radding model**

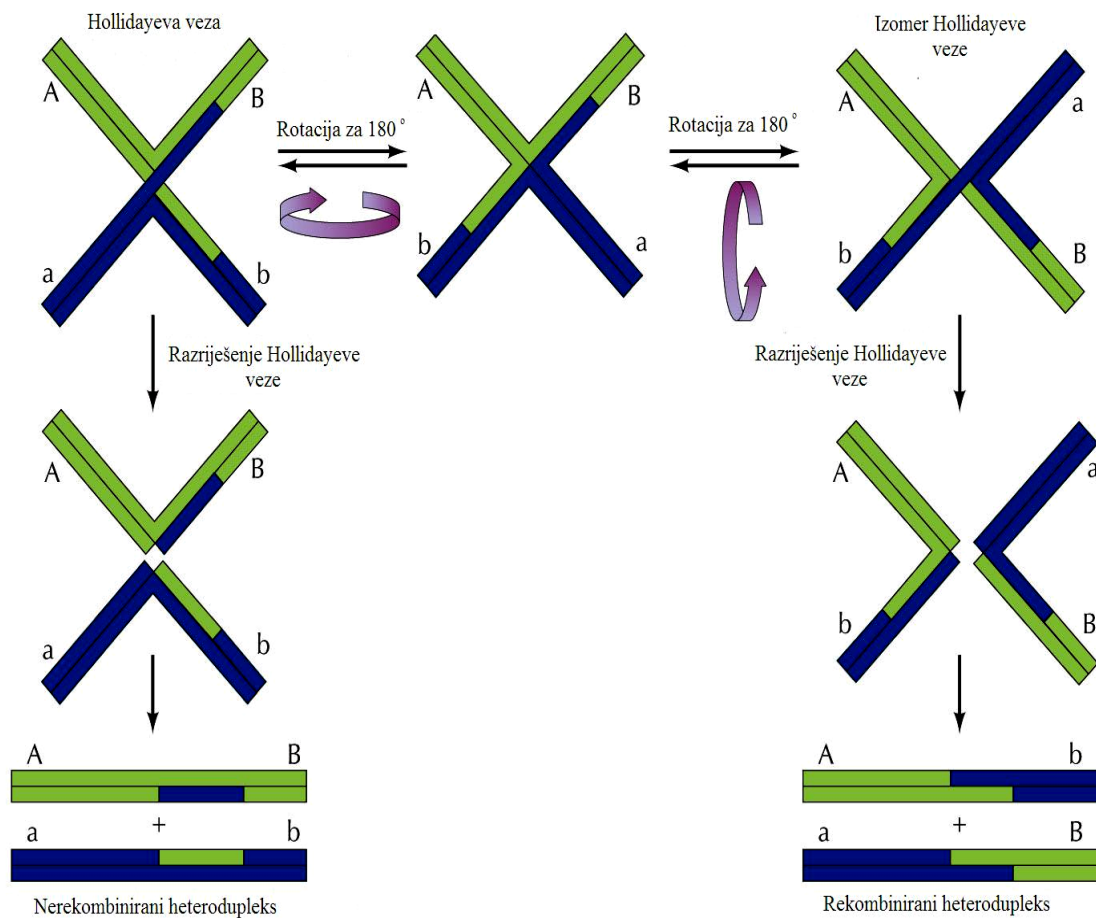
Model predlaže jednonančani početak rekombinacije. Lezija u jednom lancu DNA omogućuje invaziju 3' hidroksilnog kraja na drugu molekulu DNA. Pronalaskom komplementarnog slijeda dolazi do degradacije istisnutog lanca DNA i stvaranja Hollidayeve veze koja može migrirati i stvoriti heterodupleks. Prednost ovog modela je što ne zahtijeva istovremeno pucanje dvaju lanaca na istom mjestu i sukladnost s načinom djelovanja enzima RecBCD u stvaranju 3' hidroksilnog kraja.



**Slika 1.** Hollidayev model homologne rekombinacije (prilagođeno prema Cooper 2000)

### 1.2.3 Model popravka dvolančanog loma

Pretpostavka ovog modela je da početak rekombinacije započinje dvolančanim lomom jedne molekule DNA. 5' krajevi se degradiraju, što ostavlja prazninu s dva 3' jednolančana repa. Jedan od ovih krajeva traži komplementarni slijed na drugoj molekuli DNA, istiskuje drugi lanac DNA i služi kao početnica za DNA polimerazu. Lanac koji je istisnut služi kao kalup za popunjavanje praznine koja je ostala u prvoj DNA. Stvaraju se dvije Hollidayeve veze koje mogu stvoriti rekombinantne produkte ovisno o načinu razrješavanja veze i njenoj izomerizaciji.



**Slika 2.** Izomerizacija i razrješenje Hollidayeve veze (prilagođeno prema Cooper 2000)

### 1.3 MOLEKULARNI MEHANIZMI REKOMBINACIJSKOG POPRAVKA

Otkrićem homologne rekombinacije uočena je njena značajna uloga u procesu konjugacije. S evolucijskog gledišta prepoznata je kao mehanizam širenja poželjnih alela i način unošenja raznolikosti u genom. No, tek kasnije se uvidjelo da homologna rekombinacije ima neposrednu ulogu kao mehanizam održavanja integriteta kromosoma. Rekombinacija omogućuje popravak dvolančanih i jednolančanih lezija i preživljenje organizama s oštećenjima genetičkog materijala. Osnovni molekularni mehanizmi

uključeni u popravak su RecBCD put koji kao supstrat koristi dvolančanu DNA i RecF put kojem je supstrat jednolančani lom.

### 1.3.1 RecBCD put

**Stvaranje dvolančanog loma.** Dvolančani lom (DSB) može nastati na više načina. Izlaganje ionizirajućem zračenju, npr. gama zračenju, dovodi do fragmentacije kromosoma direktno uzrokujući dvolančane lezije molekule DNA. Kraj svake dvolančane DNA tretira se kao DSB, pa konjugacija, transformacija i infekcija bakteriofagom iniciraju rekombinacijski popravak. Ipak, većina takvih lezija nastaje indirektno, kao rezultat DNA replikacije preko jednolančanog nepopravljenog loma. Takvi lomovi letalni su za stanicu, bakterija *E. coli* ih može popraviti samo nekoliko po kromosomu. Dakle, DNA replikacija glavni je izvor spontanih DSB koji se potom popravljaju homolognom rekombinacijom.

**Enzim RecBCD.** RecBCD put primarno služi za inicijaciju rekombinacije na dvolančanim lomovima. Uključuje proteine RecBCD, SSB, RecA i RuvABC i specifičan DNA lokus  $\chi$ . Enzim RecBCD je heterotrimer koji se sastoji od tri različite podjedinice: RecB (134 kDa), RecC (129 kDa) i RecD (67 kDa) (Kuzminov 1999). Produkti gena *recB* i *recC* su nužni za rekombinacijski popravak i konjugaciju. Enzim RecBCD ima mnogo različitih aktivnosti: jednolančana DNA endonukleaza i egzonukleaza, dvolančana DNA egzonukleaza, DNA helikaza, DNA ovisna ATP-aza, prepoznavanje sekvence  $\chi$  i sposobnost nanošenja filameta RecA na jednolančanu DNA.

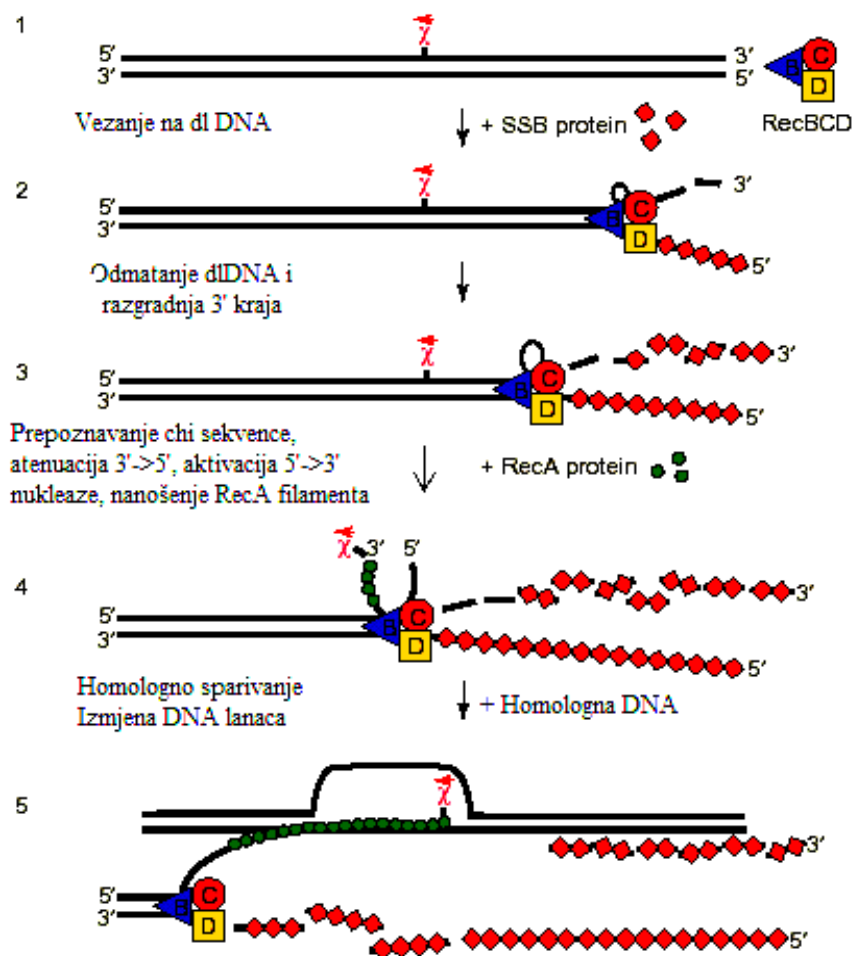
RecBCD enzim se veže na tupe dvolančane DNA krajeve s velikim afinitetom. Podjedinica RecB je 3'→5' helikaza, posjeduje nukleaznu aktivnost i katalizira nanošenje proteina RecA. Podjedinica RecC igra ulogu u prepoznavanju mjesta  $\chi$ . Interakcijom s podjedinicom RecB stimulira se njena slaba nukleazna aktivnost i pojačava se afinitet za dvolančane DNA krajeve. Rezultirajući enzim RecBC je brza, procesivna helikaza. Protein RecD je DNA ovisna ATPaza koja ima 5'→3' helikaznu aktivnost. RecB se veže na 3' kraj dvolančanog (ds) loma, a RecD na 5' kraj, a helikazne aktivnosti su im suprotne polarnosti, pa rezultirajući enzim RecBCD putuje samo u jednom smjeru s obzirom na

lom. Holoenzim pokazuje jaku nukleaznu aktivnost jer, smatra se, podjedinica RecD aktivira nukleazu podjedinice RecB (Spies i Kowalczykowski 2005).

Jednom kada se veže na dvolančani tupi kraj, enzim RecBCD koristi svoju ATPaznu aktivnost za pomicanje i odmatanje molekule DNA. Energija oslobođena hidrolizom dvije molekule ATP-a dovoljna je za odmatanje jednog baznog para. Stvaranje jednolančane DNA popraćeno je njenim asimetričnim cijepanjem. RecBCD razgrađuje s većim afinitetom 3' kraj.

**Sekvenca  $\chi$ .** U bakteriji *Escherichia coli* sekvenca  $\chi$  je oktanukleotid 5'-GCTGGTGG-3'. Prekomjerno je zastupljena i stimulira rekombinaciju. Nakon što enzim RecBCD dođe do lokusa  $\chi$  njegova aktivnost se mijenja, ali samo ako enzim prilazi s 3' strane. Stvara se jednolančani lom četiri do šest nukleotida udaljen od 3' strane slijeda. Degradacija 3' ssDNA se znatno smanjuje, a razgradnja 5' kraja postaje izraženija. Posljedica je to, pretpostavlja se, inaktivacije podjedinice RecD nailaskom na lokus  $\chi$  čime se indirektno inhibira 3'→5', a stimulira 5'→3' egzonukleazna aktivnost kompleksa RecBC.

Rezultat je nastanak jednolančanog DNA repa koji ima sekvencu  $\chi$  na 3' terminalnom dijelu. Susret s rekombinacijskim lokusom utječe i na helikaznu aktivnost enzima. RecBCD na kratko zastane i potom nastavi odmotavati DNA smanjenom brzinom. Treća, iznimno značajna posljedica nailaska na mjesto  $\chi$  je aktiviranje sposobnosti enzima RecBCD da katalizira stvaranje filameta RecA na novonastaloj ssDNA. Točnije, RecBCD pomaže usmjeriti protein RecA na dio molekule DNA na koji je sam vezan. Sekvence bogate G i T nukleotidima većim afinitetom vežu protein RecA, stoga je lokus  $\chi$  idealno mjesto za homolognu rekombinaciju. RecA stvara kontakt i s molekulom DNA i s enzimom RecBCD što je faktor stabilizacije kompleksa (Snyder i Champness 1997). Nukleofilament RecA tada može tražiti homolognu regiju na drugoj molekuli DNA i započeti proces homologne rekombinacije (slika 3).



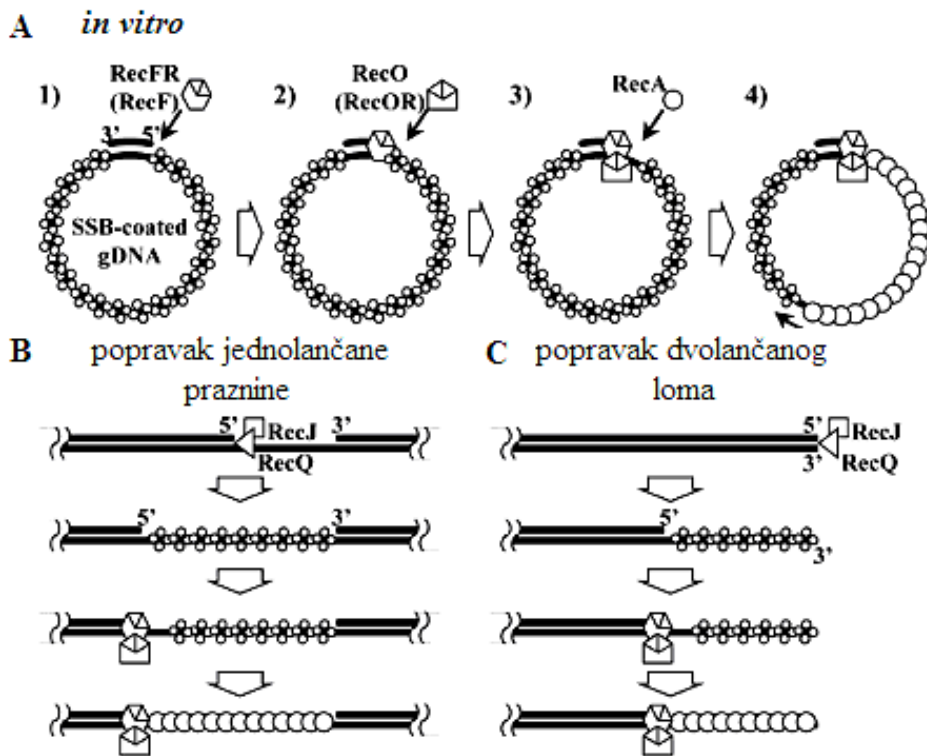
Slika 3. RecBCD put homologne rekombinacije (prilagođeno prema Kowalczykowski 2000)

### 1.3.2 RecF put

**Stvaranje jednolančanog loma.** Jednolančana praznina može nastati blokiranjem sinteze DNA nekodirajućom lezijom npr. pirimidinskim dimerom. Nastaju na jednom od novosintetiziranih lanaca DNA tokom replikacije. Popravak takvih oštećenja ovisan je o homolognoj rekombinaciji.

**Proteini RecF puta.** Produkti gena *recF*, *recO*, *recR*, *recQ* i *recJ* potrebni su za popravak jednolančanih praznina i pripremu za homolognu rekombinaciju. Poput enzima RecBCD, protein RecQ posjeduje 3'→5' helikaznu aktivnost, ali nema sposobnost

nukleaznog izrezivanja. Međutim, RecJ ima 5' nukleaznu aktivnost koja nedostaje enzimu RecQ. Ova dva enzima odgovorna su za proširenje jednolančane praznine. Da bi proces homologne rekombinacije mogao početi potrebno je nanijeti protein RecA na jednolančanu DNA. Komplex RecFOR igra glavnu ulogu u procesu zamjene proteina SSB vezanog na ssDNA s proteinom RecA. RecF ili RecFR se veže na 5' kraj praznine na prijelazu ss u dsDNA. RecO ili RecOR veže se na RecF(R) uzrokujući promjenu kompleksa SSB-ssDNA u blizini što omogućava nanošenje proteina RecA (slika 4). Nukleofilament RecA stvara se cijelom duljinom jednolančane DNA koja sada ima mogućnost inicijacije homologne rekombinacije pronalaskom homologne DNA.



**Slika 4.** Model RecF puta homologne rekombinacije. A) Nanošenje filameta RecA na jednolančanu DNA prazninu B) Popravak jednolančanih praznina pomoću kompleksa RecFOR C) Popravak dvolančanog DNA loma s proteinima RecFOR, RecQ i RecJ (prilagođeno prema Morimatsu i Kowalczykowski 2003)



### 1.3.3 Popravak dvolančanog loma u odsutnosti RecBCD

**RecF put.** Nedostatak homologne rekombinacije u mutantu *recBC* može se nadvladati kombiniranim učinkom dviju ekstragenetskih supresorskih mutacija *sbcB* i *sbcC(D)*. Prva onemogućava aktivnost egzonukleaze I koja s velikim afinitetom cijepa kompleks SSB-ssDNA, a druga onemogućava aktivnost jedne od dviju podjedinica nukleaze SbcCD. Zajedničkim djelovanjem mutacija, aktivira se RecF put popravka dvolančanog loma koji ima sličnu razinu učinkovitosti kao i RecBCD put.

Helikaza RecQ osim afiniteta za spoj ss-dsDNA, također može odmatati i ds tupe krajeve DNA molekula. Helikazna 3'→5' aktivnost enzima RecQ zajedno s 5'→3' egzonukleaznom aktivnošću proteina RecJ rezultira stvaranjem 3' jednolančanog kraja koji se može koristiti za stvaranje nukleoproteinskog kompleksa RecA pomoću kompleksa RecFOR i inicijaciju rekombinacije u mutantu *recBC sbcB sbcC(D)*.

**RecE put.** Mutanti *recBC sbcA* imaju aktivnu dsDNA egzonukleazu RecE koja selektivno degradira 5' kraj stvarajući DNA s 3' stršećim krajem. Smatra se da se RecT veže na stršeće krajeve koje stvara enzim RecE prije proteina SSB čime se onemogućava razgradnja egzonukleazom I. Polimerizacija nukleofilamenta RecA vrši se aktivnošću kompleksa RecFOR koji potom može popraviti dvolančanu leziju procesom rekombinacijskog popravka (Kuzminov 1999).

**RecB1080CD put.** Mutant *recB1080* bakterije *Escherichia coli* sadrži supstituciju jedne aminokiseline u nukleaznom katalitičkom centru podjedinice RecB. Osim deficijencije u nukleaznoj aktivnosti, mutant nema sposobnost nanošenja proteina RecA na jednolančanu DNA, no zadržava helikaznu aktivnost. Popravak i rekombinacija enzimom RecB1080CD potpomognuti su proteinima RecF puta i 5'→3' egzonukleazom RecJ. Međutim, rekombinacijski popravak kod RecB1080CD puta nije istovjetan RecF putu jer je ovisan o nekim funkcijama RecBCD puta (Ivančić-Baće i sur. 2003). Enzim RecB1080CD zadržava helikaznu aktivnost, pa u ovom slučaju nije potrebna aktivnost proteina RecQ. Umjesto nukleazne aktivnosti kompleksa RecBCD, 5'→3' ssDNA egzonukleaza RecJ obavlja funkciju degradacije 5' kraja, a nanošenje filamenta RecA i zamjenu sa proteinom SSB obavlja kompleks RecFOR.

### 1.3.4 Protein RecA i stvaranje sinapse

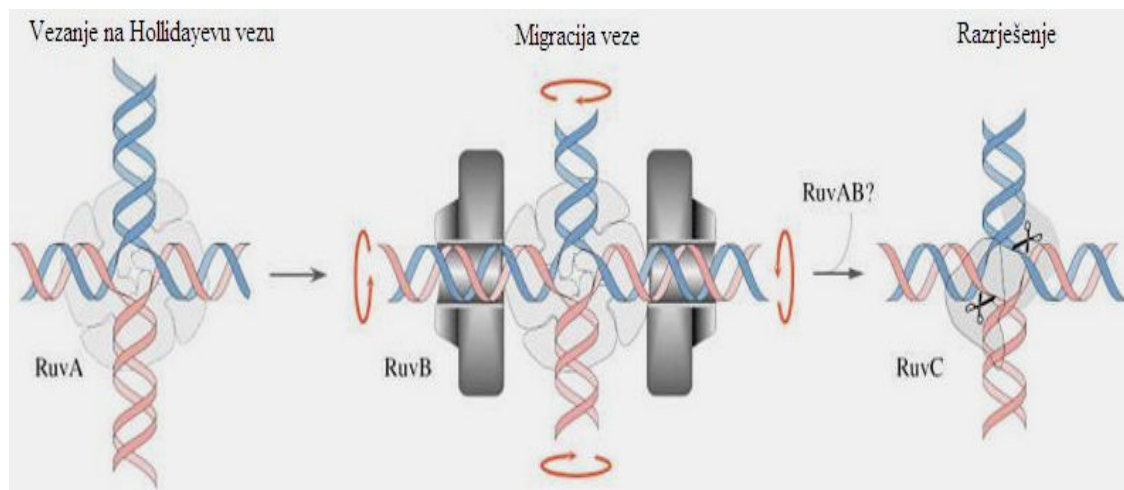
**RecA.** Protein RecA je 38 kDa velik protein koji obavlja specifičnu funkciju traženja homologije i katalizira izmjenu lanaca DNA. Normalna ekspresija u stanici bakterije *Escherichia coli* je 1000 do 10000 monomera po stanici. Ali, produkcija se znatno povećava izlaganjem uvjetima koji oštećuju DNA (npr. UV zračenje). Kristalna struktura proteina RecA pokazuje spiralni filament koji sadrži šest monomernih jedinica po okretu. U fiziološkim uvjetima oko jednolančane DNA tvori helikalni filament koji ima duboki utor gdje se odvija vezanje i sparivanje DNA. Unutar utora postoje manje definirana mjesta za vezanje do tri lanca DNA. Svaki monomer veže po jednu molekulu ATP-a i tri nukleotida ssDNA. Širina filameta je oko 100 Å, a DNA vezana za njega je 1.5 puta duža nego u nativnom obliku zbog lakšeg prepoznavanja homologije između dvije DNA molekule. Rast nukleofilameta odvija se u 5'→3' smjeru brzinom od najviše 30-40 monomera u sekundi. RecA filament se disocira kada je omjer ADP/ATP oko 50% na suprotnom kraju od sinteze, ali u istom smjeru (Kuzminov 1999).

**Stvaranje sinapse.** Nukleofilament RecA stvoren RecBCD ili RecF putem mora pronaći homolognu DNA unutar nekoliko minuta da oštećenje ne bi prouzrokovalo još veću štetu. Proces sparivanja događa se unutar utora filameta. Izmjena lanaca DNA pomoću proteina RecA može uključivati tri od četiri lanca. Kompleks RecA-ssDNA skenira dsDNA u potrazi za homolognim slijedom. Jednom kada ga pronade, sparuje se s njim. Lanac dvolančane DNA molekule koji nije sparen istiskuje se stvarajući D-petlju. ATP hidroliza nije potrebna u ovoj fazi, no postoji mogućnost produžavanja hibridnog dupleksa koja treba hidrolizu ATP-a pomoću proteina RecA. Ono se događa u 5'→3' smjeru polimerizacijom nukleofilameta RecA u dvolančanoj regiji molekule DNA. Ovo uzrokuje nastanak četverolančane izmjene umjesto početne trolančane, te samim time i nastanak Hollidayeve veze. Takva veza može migrirati niz DNA mnogo brže od spontane migracije, uz utrošak energije hidrolizom ATP-a.

### 1.3.5 Razrješenje Hollidayeve veze

Hollidayeva veza stvorena suradnjom proteina RecA s RecBCD ili RecF putem homologne rekombinacije može se razriješiti na dva neovisna načina: kompleksom RuvABC ili helikazom RecG.

**RuvABC.** Protein RuvA je tetramer sastavljen od 4 podjedinice. Struktura tetramera nalik je na cvijet sa 4 latice. Hollidayeva veza smještena je između dva RuvA kompleksa u planarnoj konfiguraciji. RuvB tvori heksamerni prsten koji okružuje dvolančanu DNA. Hidrolizom ATP-a dobiva se energija za prolazak DNA kroz prsten i migraciju Hollidayeve veze. Razrješenje Hollidayeve veze omogućuje enzim RuvC. Naziva se i rezolvaza, a cijepa samo one lance Hollidayeve veze na koju su vezani proteini RuvA i RuvB. Enzim je aktivan u obliku homodimera kada sadrži dva aktivna egzozukleazna centra, pa može istovremeno cijepati dva lanca DNA iste polarnosti i iste udaljenosti od veze. Rezultat cijepanja Hollidayeve veze proteinom RuvC je dvolančani lom. Cijepanje se najčešće odvija na slijedu 5'-(A/T)TT#(G/C)-3'. Minimalni zahtjev je jedan timin na 3' strani loma. Hollidayeve veze koje ne sadrže traženi slijed mogu vezati RuvC, no enzim neće vršiti nukleaznu aktivnost. Dakle, RuvA i RuvB uzrokuju migraciju veze dok ona ne naiđe na željenu sekvencu koju potom RuvC pocijepa. Razrješenjem Hollidayeve veze rekombinirani homolozi se odvajaju jedan od drugoga (slika 5).



**Slika 5.** Migriranje i razrješenje Hollidayeve veze pomoću kompleksa RuvABC (prilagođeno prema Rafferty i sur. 1996)

**RecG.** Slično kao i RuvAB, RecG je helikaza koja se veže na Hollidayevu vezu i uzrokuje njenu migraciju. Bitna razlika je smjer migracije. RuvAB ide duž molekule DNA u 5'→3' smjeru, a RecG helikaza u suprotnom. Također, RecG može formirati Hollidayevu vezu iz zaustavljene replikacijske viljuške, i vezati se na trolančane veze. Enzim koji cijepa Hollidayevu vezu u suradnji s proteinom RecG nije RuvC, nego protein RusA. Izgleda da RecG igra ulogu u potpuno drugačijem i neovisnom putu razrješenja Hollidayeve veze. Ali oba puta mogu imati isti rezultat: rekombinantni produkt (Snyder i Champness 1997).

### **1.3 PROTEIN SSB BAKTERIJE *Escherichia coli***

Single-stranded DNA-binding protein (SSB) sudjeluje u osnovnim procesima bakterije *Escherichia coli*: replikaciji, popravku i rekombinaciji. Otkriven je kao protein koji destabilizira dvostruki DNA heliks. Produkt je gena *ssb*, čijim otkrićem slijedi niz spoznaja o brojnim drugim aktivnostima u koje je uključen ovaj protein.

#### **1.3.1 Fiziološka svojstva SSB proteina**

SSB iznimno je stabilan protein. Analiza slijeda DNA određuje da je molekularna težina monomerne jedinice 18.843 kDa. U fiziološkim uvjetima je u obliku homotetramera koji je otporan na denaturaciju zagrijavanjem i alkalnu denaturaciju. DNA slijed pokazuje da protein sadrži 177 aminokiselina. N kraj započinje s alaninom, što ukazuje da dolazi do cijepanja početnog metionina. U aminokiselinskom sastavu uočava se visoki sadržaj glicina, potpuna odsutnost cisteina i samo jedan histidin. C kraj je negativno nabijen i sastavljen uglavnom od  $\alpha$  helikalnih struktura. Iako hidrofилne domene prevladavaju, postoje četiri hidrofobne domene koje se uglavnom nalaze na N kraju proteina. Jedna od njih bitna je za vezanje na DNA, a imaju i važnu ulogu u rekombinacijskom popravku zbog vezanja na protein RecA (Meyer i Laine 1990).

Sekundarna struktura proteina SSB predviđena iz DNA slijeda sadrži 22%  $\alpha$ -heliksa, 19%  $\beta$  ploha i 59% nasumičnog klupka. Smatra se da His-55 ima ulogu u interakciji između podjedinica, a Phe-60 i Trp-54 u vezanju proteina SSB na DNA. Ova regija je hidrofobna i sadrži šupljinu koja bi mogla biti mjesto vezanja proteina na ssDNA. COOH kraj sadrži domenu koja sudjeluje u dodiru i vezanju s drugim proteinima.

### 1.3.2 Vezanje na DNA

Otkrićem da se protein SSB s vrlo velikim afinitetom veže na jednolančanu molekulu DNA krenula su istraživanja s ciljem otkrivanja prirode te veze. Iako se single-stranded DNA-binding protein ubraja u heliks destabilizirajuće proteine, on samostalno ne može u fiziološkim uvjetima denaturirati DNA. Tek ako se vodikove veze prekinu spontano, ili na bilo koji drugi način, SSB ima sposobnost vezanja i stabilizacije jednolančane DNA.

Vezanje na DNA je kooperativan proces. Polinukleotid koji već ima vezan protein SSB jačim afinitetom veže slijedeće SSB tetramere od polinukleotida koji nema vezan protein. Iako postoje četiri mjesta kojima bi se SSB mogao vezati na DNA, koriste se samo dva mjesta po tetrameru.

Elektronskom mikroskopijom dokazana je zrnata struktura kompleksa SSB-ssDNA ovisno o omjeru proteina i DNA. Objašnjenje se našlo u modelu omatanja DNA oko proteina SSB. Daljnja istraživanja pokazala su da SSB oktamer obavija 145 nukleotida dug segment s oko 30 nukleotida slobodne DNA koja povezuje dva oktamera. Dakle, ovisno o gustoći proteina, SSB može biti vezan na ssDNA u obliku tetramera ili oktamera.

Svaka podjedinica proteina SSB ima mjesto vezanja molekule DNA. Broj nukleotida koje tetramer zauzima varira ovisno o uvjetima temperature, ionske jakosti, koncentracije monovalentnih i divalentnih soli, pH i gustoći vezanja proteina. Pri fiziološkim uvjetima smatra se da tetramer proteina SSB zauzima  $65 \pm 5$  nukleotida. Zrnata struktura kompleksa (SSB)<sub>65</sub> rezultat je postojanja oktamera SSB proteina koji nastaje dimerizacijom dvaju tetramera. U ovom obliku SSB pomaže proteinu RecA da

polimerizira na jednolančanu DNA. Pri visokim SSB i niskim ssDNA koncentracijama prisutan je (SSB)<sub>35</sub> model vezanja bitan tokom DNA replikacije. Stvaranje (SSB)<sub>40</sub> i (SSB)<sub>56</sub> kompleksa nije vjerojatno u živoj stanici, ali može se postići u *in vitro* uvjetima (Meyer i Laine 1990).

### 1.3.3 Gen *ssb*

Broj nukleotida kodirajućeg slijeda je 534, ali početni metionin ne ulazi u konačni sastav proteina SSB. Posljednja, 177. aminokiselina je fenilalanin. Prosječna bakterijska stanica *E. coli* sadrži oko 1000 do 2000 tetramera SSB-a. Gen *ssb* ima tri različita promotora od kojih dva nisu inducibilna. Treći promotor pokazuje svojstva inducibilnosti, no ona je mnogo sporija od inducibilnosti drugih gena regulona *recA-lexA* SOS. Smatra se da nema nikakvu ulogu u SOS popravku (Meyer i Laine 1990).

```

      10      20      30      40      50      60
MASRGNKVI LVGNLGDPE VRYMPNGGAV ANITLATSEŠ WRDKATGEMK EQTEWHRVVL
      70      80      90     100     110     120
FGKLAEVASE YLRKGSQVYI EGQLRTRKWT DQSGQDRYTT EVVVNVGGTM QMLGGRQGGG
     130     140     150     160     170
APAGGNIGGG QPQGGWGQPQ QPQGGNQFSG GAQSRPQQSA PAAPSNEPPM DFDDDDIPF

```

**Slika 6.** Slijed aminokiselina proteina SSB bakterije *E. coli* (izvor: UniProtKB/Swiss-Prot Protein Knowledgebase)

### 1.3.4 Mutacije gena *ssb*

Danas su poznate brojne mutacije gena *ssb*. Neke od njih su *ssb-1*, *ssb-2*, *ssb-3*, *ssb-113*, *ssb-114*, *ssbW40F*, *ssbW54F*, *ssbW88F*... Većina njih su temperaturno i UV

osjetljive i imaju defekt u procesima popravka, replikacije i rekombinacije. Null mutanti gena *ssb* ne postoje jer bi takva mutacija imala letalan ishod za bakterijsku stanicu. Osim *ssb-113*, najbolje proučena i karakterizirana mutacija je *ssb-1*.

Protein SSB-1 ima mutaciju u histidinu 55 koji je zamijenjen tirozinom. Radi se o domeni koja je odgovorna za vezanje proteina SSB na jednolančanu molekulu DNA i za interakciju među podjedinicama. Ova promjena događa se tranzicijom C→T u jednom koraku. Tetramerna struktura SSB-1 disocira na monomerne podjedinice čak i pri temperaturi koja nije letalna za bakterijsku stanicu. Temperaturna nestabilnost SSB-1 monomera onemogućava ponovno formiranje funkcionalnih tetramera i vezanje za DNA. Zanimljivo je da se svi učinci mutacije *ssb-1* mogu poništiti povećanim stvaranjem proteina SSB-1 (Williams i sur. 1984).

Supstitucijom His→Tyr izoelektrična točka proteina mijenja se od 6.0 za divlji tip SSB na 5.7 za SSB-1. Slabljenjem tetramerne strukture, mutantni protein se pojavljuje u monomernom obliku s molekularnom masom od 16-17 kDa. Povećavanjem koncentracije proteina SSB-1 pri permisivnoj i nepermisivnoj temperaturi poništavaju se svi učinci ove mutacije. Razlog je u pomicanju ravnoteže prema stvaranju tetramernog proteina SSB-1 koji ima veću temperaturnu stabilnost od monomera.

### **1.3.5 Uloga proteina SSB u rekombinaciji**

Protein SSB ima iznimno važnu ulogu u mnogim procesima u stanici. Osim u replikaciji i SOS odgovoru, neizostavan je i u homolognoj rekombinaciji i rekombinacijskom popravku.

Single-stranded DNA-binding protein nespecifično stimulira RecA interakciju s jednolančanom DNA i stvaranje nukleoproteinskog filameta. Nastanak filameta RecA u odsutnosti proteina SSB gotovo je potpuno inhibiran. Smatra se da je tetramerni protein faktor koji omogućava vezanje proteina RecA na ssDNA i da postoji fizički dodir između dva proteina. Također, jedan od načina na koji SSB olakšava nanošenje filameta je uklanjanje sekundarnih struktura stvorenih na jednolančanoj DNA koje mogu ometati vezivanje RecA. Nakon stvaranja sinapse, protein SSB se veže na lanac DNA koji ne sudjeluje u izmjeni sprječavajući time ponovno sparivanje s homolognim mu lancem.

U homolognoj rekombinaciji koja se odvija RecBCD putem odmatanjem DNA stvara se jednolančana petlja na lancu DNA na kojem se nalazi slijed  $\chi$ . Vezanjem na ss petlju protein SSB ima sposobnost kontrole nivoa nukleazne aktivnosti enzima RecBCD. Protein SSB smanjuje 5'→3' egzonukleaznu aktivnost prije i poslije prepoznavanja sekvence  $\chi$  (Anderson i Kowalczykowski 1998).

RecF put rekombinacije ne može direktno nanositi protein RecA na jednolančanu DNA. Produkti gena *recF*, *recO* i *recR* potrebni su za proces zamjene vezanog proteina SSB s nukleoproteinskim filamentom RecA. SSB ima inhibitorni učinak na stvaranje predsinaptičkog kompleksa koji proteini RecO i RecR mogu nadići. Protein RecO fizički se veže na proteine RecR i SSB. Smatra se da kompleks RecOR stimulira nastanak filameta RecA na ssDNA molekuli, a RecFR sprječava njegovo produžavanje u područje dvolančane DNA.

Dio RecF puta rekombinacije je i helikaza RecQ. Ona zajedno s egzonukleazom RecJ stvara jednolančanu DNA koja je supstrat za vezanje filameta RecA. Za odmatanje DNA heliksa pomoću enzima RecQ potreban je protein SSB. Direktnom interakcijom dvaju proteina, SSB stimulira aktivnost helikaze. Vezanjem na istu molekulu DNA potiče se konformacijska promjena u oba proteina koja rezultira jačim afinitetom vezanja SSB i RecQ. Vezujuće mjesto za RecQ nalazi se na visoko konzerviranom C kraju SSB molekule, a ulogu vezanja SSB-a nosi WH subdomena helikaze. Podaci pokazuju da se jedan monomer proteina SSB veže s jednim monomerom RecQ, odnosno da jedan SSB tetramer veže četiri molekule enzima RecQ (Shereda i sur. 2007).

Egzonukleaza RecJ razgrađuje jednolančanu DNA u 5'→3' smjeru i dio je RecF puta homologne rekombinacije. Vezanje proteina SSB na ssDNA molekulu stimulira aktivnost proteina RecJ. Tetrameri proteina SSB sprječavaju nastanak sekundarnih struktura na jednolančanoj DNA molekuli na koju se vežu. Sekundarne strukture na ssDNA negativno utječu na procesivnost egzonukleaze RecJ, pa SSB direktnom ili indirektnom interakcijom s proteinom RecJ pojačava njegovu nukleaznu aktivnost. Literatura (Han i sur. 2006) predlaže da postoji direktan kontakt između proteina SSB i nukleaze RecJ. Tom interakcijom olakšalo bi se uklanjanje proteina SSB s ssDNA čime bi se omogućilo lancu DNA da dođe u aktivno mjesto enzima RecJ.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1 MATERIJALI

#### 2.1.1 Bakterijski sojevi

Tablica 1. Korišteni sojevi bakterije *E. coli* i njihov genotip

Sojevi	Genotip	Porijeklo
AB1157	F <sup>-</sup> <i>thr-1 leuB6 Δ(gpt-proA)62 hisG4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rspL31 kdgK51 rfbD1 mgl-51 λ<sup>-</sup> rac<sup>-</sup></i>	Bachman 1996
Kao AB1157:		
IIB654	+ <i>ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10</i>	Ovaj rad
IIB655	+ <i>recB1080 ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10</i>	Ovaj rad
IIB661	+ <i>ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10 recO1504::Tn5</i>	Ovaj rad
IIB662	+ <i>recB1080 ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10 recO1504::Tn5</i>	Ovaj rad
IIB663	+ <i>recQ1803::Tn3 ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10</i>	Ovaj rad
IIB672	+ <i>ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10 recJ2052::Tn10</i>	Ovaj rad
IIB673	+ <i>recB1080 ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10 recQ1803::Tn3</i>	Ovaj rad
IIB690	+ <i>recB1080 ssb-1<sup>ts</sup> malE145::Tn10 recJ2052::Tn10</i>	Ovaj rad
IRB103	+ <i>recO1504::Tn5</i>	Paškvan i sur. 2001.
RIK174	+ <i>recB1080</i>	Jockovich i Myers 2001.
IRB101	+ <i>recQ1803::Tn3</i>	Paškvan i sur. 2001.
IIB278	+ <i>recB1080 recJ284::Tn10</i>	Ivančić Baće i sur. 2003.
IIB279	+ <i>recB1080 recQ1803::Tn3</i>	Ivančić Baće i sur. 2003.
IIB282	+ <i>recB1080 recO1504::Tn5</i>	Ivančić Baće i sur. 2003.
LMM1032	+ <i>recJ2052::Tn10</i>	D. Zahradka
HfrH	Hayes PO1 <i>pro AB</i> <sup>+</sup>	Bachman 1996

## 2.1.2 Hranidbene podloge i puferi

**Tablica 2.** Kemijski sastav tekuće LB hranidbene podloge

<b>Tekuća LB hranidbena podloga</b>	<b>Sastav</b>	<b>Količina</b>
pH=7.4	Bactotryptone	10 g
	Kvašček ekstrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Voda	do 1000 ml

**Tablica 3.** Kemijski sastav krute LB hranidbene podloge

<b>Kruta LB hranidbena podloga</b>	<b>Sastav</b>	<b>Količina</b>
pH=7.4	Bactotryptone	10 g
	Kvašček ekstrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Agar	16 g
	Voda	do 1000 ml

**Tablica 4.** Kemijski sastav M/15 fosfatnog pufera

<b>M/15 fosfatni pufer</b>	<b>Sastav</b>	<b>Količina</b>
pH=7,0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.94 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4.54 g
	Voda	do 1000 ml

**Tablica 5.** Kemijski sastav B minimalne krute selektivne hranidbene podloge

<b>B kruta hranidbena podloga</b>	<b>Sastav</b>	<b>Količina</b>	
pH=7.4	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	6,0 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g	
	NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g	
	NaCl	0,5 g	
	MgSO <sub>4</sub>	0,1 M	
	CaCl <sub>2</sub>	0,01 M	
	Glukoza (40%)	10,0 ml	
	Vitamin B1	1,0 mg	
	Agar	16 g	
	Voda	do 1000 ml	
		<b>Završna koncentracija</b>	
		Adenin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>
	Arginin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>	
	Leucin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>	
	Treonin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>	
	Histidin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>	
	Streptomycin	50,0 µg ml <sup>-1</sup>	

### 2.1.3 Korišteni uređaji

**Tablica 6.** Uređaji korišteni za eksperimentalni dio rada

<b>Uređaj</b>	<b>Specifikacija</b>
Termostat	Termomedicinski aparati, BTES-2
Vodena kupelj	GFL; 1083
Spektrofotometar	Pharmacia Biotech: Novaspec II
UV lampa	Philips TUV15 niskotlačna živina lampa tipa, snage 30 W
Električni brojač kolonija	New Brunswick Scientific Co.; C-10

## 2.2 METODE

### 2.2.1 Preživljenje nakon UV zračenja

Sojevi bakterije *Escherichia coli* nasade se inokuliranjem pojedinačnih kolonija s krute u 10 ml tekuće hranidbene LB podloge. Ostave se da rastu preko noći na temperaturi od 37°C u vodenoj kupelji uz trešnju. Slijedeći dan se 0.2 ml noćne kulture presadi u 10 ml svježeg tekuće LB podloge i stavi u vodenu kupelj na 37°C inkubirati do ekspanzionalne faze rasta. Koncentracija stanica, odnosno optička gustoća, prati se spektrofotometrijski. Kada apsorbancija pri valnoj duljini od 650 nm iznosi 0.4 tada je koncentracija stanica po mililitru  $2 \times 10^8$  i odgovara ekspanzionalnoj fazi rasta.

Zatim se sojevi decimalno razrjeđuju. U 900  $\mu$ l M/15 pufera stavi se 100  $\mu$ l suspenzije stanica određenoj soja bakterije *E. coli* da bi se dobilo decimalno razrjeđenje  $10^{-1}$ . Ovom metodom naprave se razrjeđenja svih sojeva do  $10^{-5}$ . Razrjeđenja se nakapavaju u volumenu od 10  $\mu$ l na krutu LB podlogu. Nakon što se kapljica upila svaka podloga se ozrači različitom dozom UV zračenja od 5, 10, 20, 30, 45 i 60 J/m<sup>2</sup>. Također, razrjeđenja svih sojeva nakapavaju se i na kontrolnu podlogu koja se ne zrači UV svjetlom. Podloge s ozračenim sojevima rade se u duplikatu i inkubiraju se u termostatu na temperaturama od 37°C i 42°C preko noći. Slijedeći dan broje se narasle kolonije i izračunava se preživljenje iz omjera broja naraslih kolonija na ozračenim i neozračenim podlogama.

### 2.2.2 Krivulja rasta

U 10 ml tekuće LB podloge presadi se 0.2 ml noćne kulture bakterijskih sojeva. Bakterijska suspenzija se inkubira u vodenoj kupelji uz aeraciju na 30°C odnosno 42°C do optičke gustoće  $O.D._{650} = 0.2$ . Zatim se prati rast bakterija u vremenskom periodu od tri sata. Apsorbancija se mjeri u intervalima od 30 minuta pri valnoj duljini od 650 nm. Krivulja rasta dobije se crtanjem grafa ovisnosti apsorbancije o vremenu inkubiranja.

### 2.2.3 Konjugacijska rekombinacija

0.2 ml noćnih kultura bakterijskih sojeva presade se u 10 ml tekuće LB podloge, uključujući i donorski Hfr soj. U vodenoj kupelji rastu uz trešnju na 37°C do eksponencijalne faze rasta. Tada se svaki soj recipijenta miješa s HfrH sojem u omjeru 1:10 (donor : recipijent): 0.3 ml donorskog soja i 2.7 ml recipijenta. Smjesa se stavi u vodenu kupelj bez trešnje na 37°C. Nakon 30 minuta proces konjugacije se prekida vorteksiranjem otopine. Naprave se potrebna decimalna razrjeđenja koja se zasađuju na B krutu selektivnu hranidbenu podlogu. Po 100 µl smjese stavi se na B podlogu, stakleni etaler se umoči u alkohol i zapali. Nakon hlađenja etalera bakterije se razmažu po podlozi. Ploče se inkubiraju u termostatu na željenoj temperaturi (37°C i 42°C) tokom 48 sati. Narasli transkonjuganti prebrojavaju se električnim brojačem kolonija.

Da bi se izračunala frekvencija rekombinacije potrebno je znati i vijabilnost svakog soja, uključujući i donorski HfrH soj. Naprave se decimalna razrjeđenja svakog soja u eksponencijalnoj fazi, i po 100 µl željenog razrjeđenja zasađi se na krutu LB podlogu. Uzorak se razmaže po podlozi staklenim sterilnim etalrom. Frekvencija konjugacijske rekombinacije dobiva se iz omjera naraslih kolonija rekombinanata i donora uz uračunavanje korekcije za vijabilnost. Frekvencija rekombinacije za divlji tip AB1157 uzima se kao 1, a frekvencije svih ostalih sojeva se izračunavaju prema tome.

### 3. REZULTATI

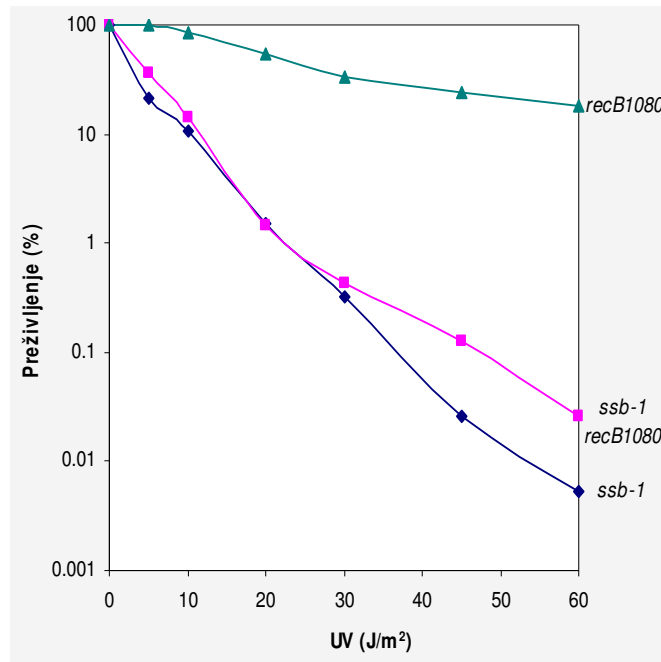
#### 3.1 UTJECAJ MUTACIJE *ssb-1* NA REKOMBINACIJSKI POPRAVAK

##### 3.1.1 Utjecaj mutacije *ssb-1* na rekombinacijski popravak u mutantu *recB1080*

Protein SSB-1 mnogo je nestabilniji od proteina divljeg tipa i već pri permisivnoj temperaturi disocira na monomerne podjedinice. Stoga je bilo zanimljivo istražiti da li će zbog nestabilnosti proteina SSB-1 doći do efikasnijeg nastanka RecA filamenta.

Da bismo provjerili utjecaj mutacije *ssb-1* na popravak DNA (odnosno nastanak RecA filamenta) ispitivali smo preživljenje *ssb-1*, *ssb-1 recB1080* i *recB1080* mutantnih sojeva bakterije *E. coli* nakon zračenja s UV svjetlom. Kao kontrolu pokušali smo konstruirati i mutantni soj *ssb-1 recB*, ali nismo uspjeli ili zbog loše vijabilnosti ili moguće letalnosti dvostrukog mutanta. Brojanjem kolonija naraslih nakon ozračivanja stanica određenim dozama UV zračenja izračunali smo postotak preživljenja bakterija. Kao referentnu vrijednost uzimali smo broj kolonija naraslih na neozračenim podlogama. Slika 7 daje grafički prikaz ovisnosti postotka preživljenja pojedinih bakterijskih sojeva o dozi UV zračenja pri temperaturi od 42°C.

Jednostruki mutant *recB1080* ima mnogo veći postotak preživljenja nakon UV zračenja od mutantnih sojeva *ssb-1* i *ssb-1 recB1080* pri 42°C. Rezultat je očekivan jer RecB1080CD put koristi proteine RecJ, RecF, RecO i RecR za nadomještanje aktivnosti koje mu nedostaju zbog mutacije, a ima divlji tip proteina SSB. Mutant *ssb-1* je očekivano osjetljiv na UV zračenje pri temperaturi inkubiranja od 42°C zbog slabijeg vezanja na ssDNA. Zanimljivo, mutant *ssb-1* je nešto osjetljiviji na UV zračenje od dvostrukog mutanta *ssb-1 recB1080*. Međutim ovaj dvostruki mutant ima smanjenu vijabilnost (vidjeti poglavlje 3.2).

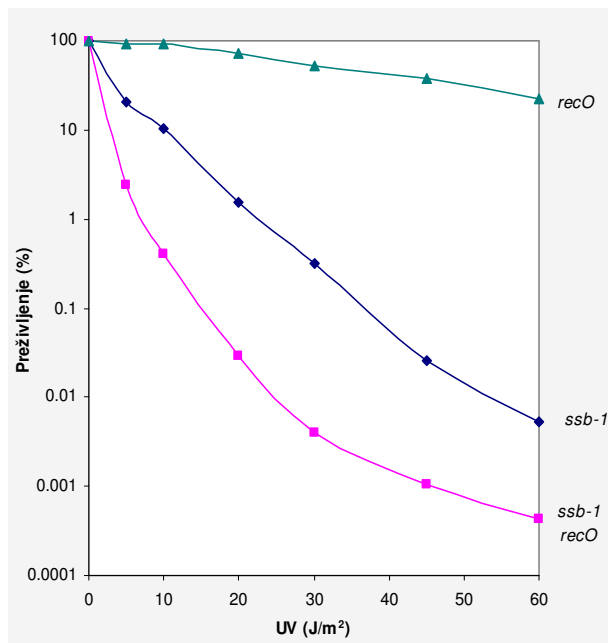


**Slika 7.** Utjecaj mutacija *ssb-1*, *ssb-1 recB1080* i *recB1080* na preživljenje nakon UV zračenja (42°C)

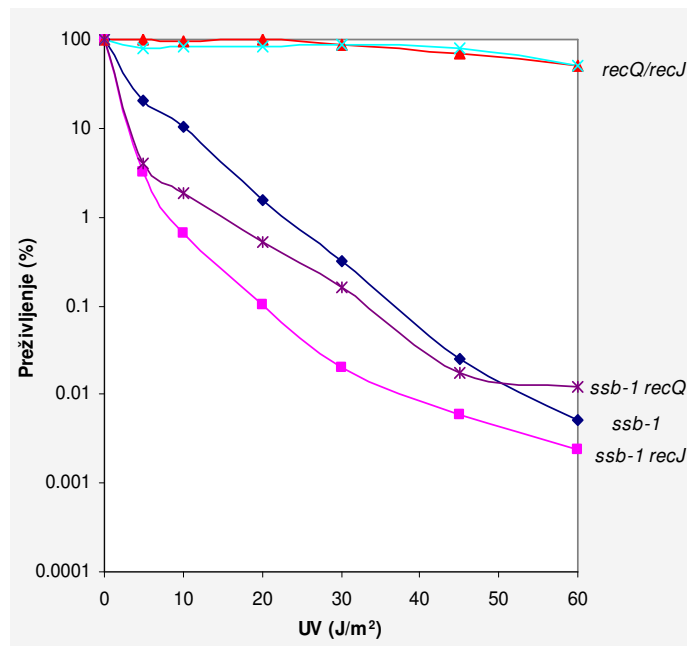
### 3.1.2 Utjecaj mutacije *ssb-1* na rekombinacijski popravak u mutantima RecF puta

Za proučavanje utjecaja mutacije *ssb-1* na nastanak filameta RecA u mutantima RecF puta rekombinacijskog popravka koristili smo mutantne sojeve *ssb-1*, *ssb-1 recO*, *recO*, *ssb-1 recJ*, *recJ*, *ssb-1 recQ* i *recQ* bakterije *Escherichia coli*. Postotak preživljenja nakon UV zračenja pri temperaturi od 42°C grafički je prikazan na slikama 8 i 9.

Mutantni soj *recO* najviše je otporan na UV zračenje jer ima funkcionalan RecBCD put popravka i SSB protein. Postotak preživljenja mutanta *ssb-1* znatno je manji, a iz slike 8 vidljiva je još veća osjetljivost dvostrukog mutanta *ssb-1 recO*. Rezultati su u suprotnosti onima iz odlomka 3.1.1 i potvrđuju važnost RecF puta na popravak DNA u stanicama ozračenim UV svjetlom. Naime, ovaj rezultat ukazuje na inhibiciju RecBCD puta popravka u prisutnosti proteina SSB-1.



Slika 8. Utjecaj mutacije *ssb-1 recO* na preživljenje nakon UV zračenja (42°C)



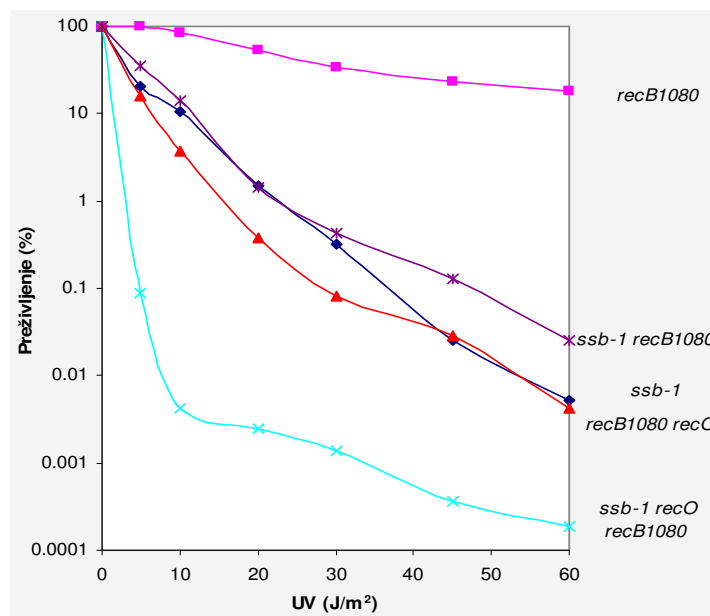
Slika 9. Utjecaj mutacija *ssb-1 recQ* i *ssb-1 recO* na preživljenje nakon UV zračenja (42°C)



Mutacija *recQ* u kombinaciji s mutacijom *ssb-1* ne pridonosi značajno popravku DNA nakon UV zračenja, kao ni dvostruka mutacija *ssb-1 recJ* što je vidljivo iz grafičkog prikaza ovisnosti preživljenja o dozi UV zračenja pri 42°C (slika 9). Moguće je da mutaciju ova dva proteina mogu nadomjestiti drugi proteini bakterije *E. coli* s helikaznom, odnosno egzonukleaznom aktivnošću, pa je rekombinacija i dalje jednako uspješna kao i u jednostrukom mutantu *ssb-1*.

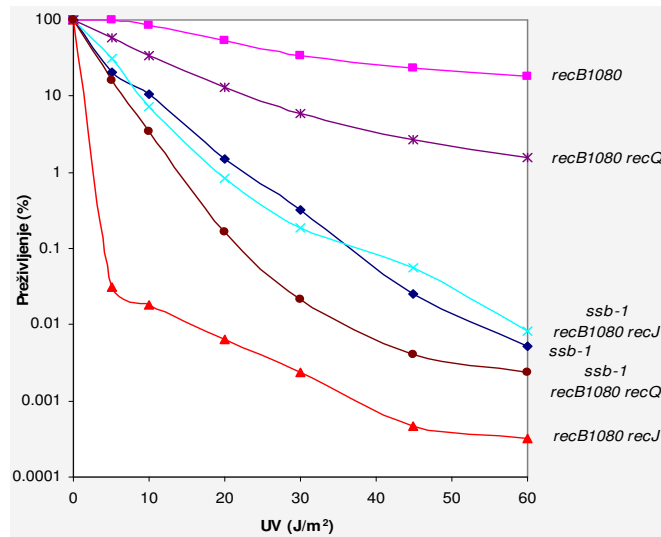
### 3.1.3 Utjecaj mutacije *ssb-1* na rekombinacijski popravak hibridnim putem kada nedostaju enzimi RecF puta

Da bismo ispitali utjecaj mutacije *ssb-1* na nastanak RecA filameta u uvjetima kada nedostaju enzimi RecF puta na hibridni put popravka odredili smo preživljenja bakterijskih sojeva sojeva *ssb-1 recB1080 recO*, *recB1080*, *ssb-1 recB1080*, *ssb-1, recB1080 recO* nakon UV zračenja (slika 10). Pretpostavili smo će u uvjetima kada su oba puta za nanošenje proteina RecA inaktivirana, osjetljivost na UV zračenje biti najveća (mutant *ssb-1 recB1080 recO*).



Slika 10. Utjecaj mutacije *ssb-1 recO recB1080* na preživljenje nakon UV zračenja (42°C)

Iz slike 10 vidljivo je da je trostruki mutant *ssb-1 recO recB1080* pri temperaturi od 42°C najosjetljiviji na UV zračenje.



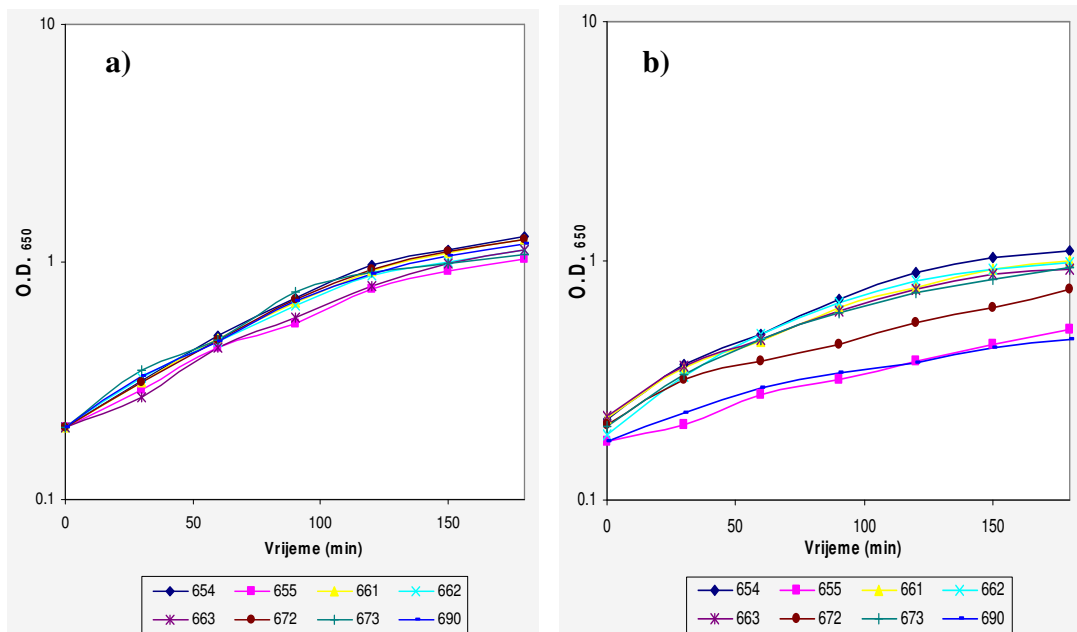
**Slika 11.** Utjecaj mutacija *ssb-1 recQ recB1080* i *ssb-1 recJ recB1080* na preživljenje nakon UV zračenja (42°C)

Rezultati pokazuju da mutacija *recQ* nema značajan utjecaj na homolognu rekombinaciju u trostrukom mutantu *ssb-1 recB1080 recQ* jer je preživljenje na nepermisivnoj temperaturi slično mutantu *ssb-1* (slika 11). Ono što je zanimljivo jest da dvostruki mutant *recB1080 recJ* pokazuje mnogo veću osjetljivost na UV zračenje od trostrukog mutanta *ssb-1 recB1080 recJ*. Međutim, ovaj mutant pokazuje smanjenu vijabilnost slično kao mutant *ssb-1 recB1080* (vidjeti poglavlje 3.2).

### 3.2 KRIVULJA RASTA

Da bismo proučili utjecaj mutacije *ssb-1* na normalan rast stanica (obzirom da je protein SSB potreban za replikaciju) pratili smo rast svih mutanata. Krivulja rasta mutantnih bakterijskih sojeva dobivena je postupkom opisanim u poglavlju 2.2.2. Slika 12 daje grafički prikaz ovisnosti apsorbancije o vremenskom periodu u kojem je spektrofotometrijski mjerena optička gustoća. Pri permisivnoj temperaturi (30°C)

vijabilnost svih mutantnih sojeva približno je jednaka. Povišenjem temperature inkubacije na 42°C dva soja pokazuju nižu vijabilnost od svih ostalih sojeva. To su bakterijski sojevi *ssb-1 recB1080 recJ* i *ssb-1 recB1080*.



**Slika 12.** Krivulja rasta mutantnih sojeva bakterije *E. coli* pri a) permisivnoj (30°C) i b) nepermisivnoj (42°C) temperaturi

### 3.3 KONJUGACIJSKA REKOMBINACIJA

Konjugacija je proces izmjene genetičkog materijala između dvije bakterije. Donorski soj koji smo koristili u ovom radu je HfrH, a recipijenti su mutantni sojevi bakterije *E. coli*.

Iz tablice 7 je vidljivo da mutant *ssb-1* pri temperaturi od 42°C ima nižu frekvenciju rekombinacije od one pri 37°C. Sukladno tome, i svi ostali mutanti koji sadrže *ssb-1* mutaciju pri 42°C imaju nešto niže frekvencije rekombinacije. Rezultati pokazuju da u konjugacijskoj rekombinaciji, što je sukladno rezultatima preživljenja nakon UV zračenja, dvostruki mutant *ssb-1 recO* ima smanjenu frekvenciju rekombinacije pri

nepermisivnoj temperaturi. Također, mutantni soj *ssb-1 recB1080 recO* pokazuje značajno manju sposobnost rekombinacije.

Dok mutacija helikaze RecQ ne smanjuje značajno rekombinacijsku sposobnost mutanata *ssb-1*, zanimljiv rezultat dobiven je za mutaciju 5'→3' egzonukleaze RecJ. Pri temperaturi od 42°C dvostruki mutant *ssb-1 recJ* pokazuje smanjenu frekvenciju konjugacijske rekombinacije, međutim trostruki mutant *ssb-1 recB1080 recJ* pokazuje povećanu frekvenciju rekombinacije. Ovaj rezultat poklapa se s rezultatom iz poglavlja 3.1.3 gdje je veći postotak preživljenja bakterijskog soja IIB690 (*ssb-1 recJ recB1080*) od preživljenja soja IIB672 (*ssb-1 recJ*). Taj rezultat je vjerojatno posljedica korekcije slabije vijabilnosti ovih mutanata, ali ukazuje da je enzim RecBCD jače inhibiran mutacijom *ssb-1* od enzima RecB1080CD.

**Tablica 7.** Utjecaj mutacije *ssb-1* na frekvenciju konjugacijske rekombinacije pri permisivnoj (37°C) i nepermisivnoj (42°C) temperaturi

Bakterijski soj	Relevantan genotip	Frekvencija rekombinacije (37°C)	Frekvencija rekombinacije (42°C)
AB1157	<i>wt</i>	1	1
IIB654	<i>ssb-1</i>	1.068 ± 0.41	0.79 ± 0.24
IIB655	<i>ssb-1 recB1080</i>	0.12 ± 0.025	0.025 ± 0.00071
IIB661	<i>ssb-1 recO</i>	0.57 ± 0.23	0.0024 ± 0.00093
IIB662	<i>ssb-1 recO recB1080</i>	0.053 ± 0.038	0.00018 ± 0.00011
IIB663	<i>ssb-1 recQ</i>	0.35 ± 0.15	0.022 ± 0.016
IIB672	<i>ssb-1 recJ</i>	0.93 ± 0.22	0.047 ± 0.00089
IIB673	<i>ssb-1 recQ recB1080</i>	0.095 ± 0.018	0.021 ± 0.0059
IIB690	<i>ssb-1 recJ recB1080</i>	0.15 ± 0.15	0.22 ± 0.12

## 4. RASPRAVA

### 4.1 UTJECAJ MUTACIJE *ssb-1* NA REKOMBINACIJSKI POPRAVAK

Dva osnovna puta kojima se vrši popravak oštećene DNA kod bakterije *Escherichia coli* su RecBCD i RecF putevi. Razlikuju se u supstratu potrebnom za enzime pojedinog puta. RecBCD put ima glavnu ulogu u popravku dvolančanih lomova, a njegova enzimatska aktivnost najviše ovisi o enzimu RecBCD koji ima mnoge aktivnosti i sam je dovoljan za obavljanje procesa inicijacije homologne rekombinacije. RecF put nužan je za popravak jednolančanih praznina. U ovom putu ne postoji samo jedan enzim koji objedinjuje sve funkcije potrebne za rekombinaciju. Više nezavisnih proteina obavlja ulogu ekvivalentnu proteinu RecBCD (Amundsen i Smith 2003). Međutim, dva puta nisu strogo odvojena, i postoji mogućnost suradnje dva puta rekombinacije. U slučaju da se inaktivira podjedinica RecB enzima RecBCD mutacijom u nukleaznom katalitičkom centru, kompleks RecB1080CD zadržava helikaznu aktivnost, ali nedostaje mu 5'→3' egzonukleazna aktivnost i gubi sposobnost nanošenja proteina RecA na jednolančanu DNA. U tom slučaju proteini RecF puta pomažu kompleksu RecB1080CD da nadomjesti sve izgubljene aktivnosti (Ivančić-Baće i sur. 2003). RecJ u ovom hibridnom putu rekombinacijskog popravka služi kao 5'→3'egzonukleaza. S obzirom da RecB1080CD ne katalizira polimerizaciju proteina RecA, SSB protein se prvi veže na ssDNA. Produkti gena *recF*, *recO* i *recR* olakšavaju zamjenu SSB tetramera s proteinom RecA i omogućavaju rekombinaciju u mutantu *recB1080*.

Prvi dio ovog rada prati učinkovitost nastanka RecA filamenta u mutantu *ssb-1* bakterije *E. coli* kada nanošenje proteina RecA ovisi o RecBCD, RecF putu i kada su oba puta inaktivirana. Mutant *ssb-1* u aminokiselinskom slijedu na mjestu 55. aminokiseline ima tirozin umjesto histidina. Mutacija se nalazi u domeni koja je odgovorna za interakciju među podjedinicama i za vezanje SSB proteina na DNA, pa rezultira smanjenim afinitetom vezanja za DNA. Naime, mutanti *ssb-1* su temperaturno i UV osjetljivi, tetramerna struktura proteina SSB-1 ima manju stabilnost i disocira na

monomerne podjedinice. Posljedica je smanjena učinkovitost vezanja na DNA pri nepermissivnim temperaturama i reducirana stopa rekombinacije (Meyer i Laine 1990). S obzirom da protein SSB sudjeluje u nizu procesa bitnih za bakterijsku stanicu kao što su replikacija, rekombinacija i popravak DNA, za pretpostaviti je da će se mutacija *ssb* gena odraziti na sve ove procese. Tako mutant *ssb-1* ima veću osjetljivost na UV zračenje i manju vijabilnost od stanica divljeg tipa.

S obzirom da enzim RecBCD ima sposobnost direktnog nanošenja proteina RecA na jednolančanu DNA, zamjena proteina SSB s RecA se ne događa. Protein SSB, međutim, ima važnu ulogu u RecBCD putu popravka. SSB tetramer stimulira stvaranje nukleoproteinskog filameta i stabilizira ga sprječavajući disocijaciju monomera RecA s jednolančane DNA. SSB uklanja sekundarne strukture koje jednolančana DNA stvara olakšavajući polimerizaciju nukleoproteinskog filameta RecA. Pri izmjeni lanaca DNA tokom homologne rekombinacije SSB se veže na istisnuti lanac sprječavajući ponovno spajanje dvaju lanaca. U prisutnosti SSB tetramera, 5'→3' egzozukleazna aktivnost enzima RecBCD se smanjuje (Anderson i Kowalczykowski 1998).

Rezultati iz poglavlja 3.1.1 pokazuju utjecaj mutacije *ssb-1* na popravak DNA nakon UV zračenja u mutantu *recB1080*. Ono što se izdvaja kao zanimljiv rezultat je veći postotak preživljenja dvostrukog mutanta *ssb-1 recB1080* od preživljenja jednostrukog mutanta *ssb-1*. Moguće objašnjenje ovog rezultata je efikasnije nanošenje proteina RecA na jednolančanu DNA pomoću proteina RecF puta u slučaju kada enzim RecBCD nije u potpunosti aktivan. Međutim, vijabilnost soja *ssb-1 recB1080* je prilično niska. Niska vijabilnost vjerojatno je rezultat nepopravljenih spontanih dvolančanih lomova molekule DNA koje samo enzim RecBCD može popraviti. Smanjena vijabilnost ukazuje na veću važnost RecBCD puta u neozračenim uvjetima, dok RecF put ima mnogo važniju ulogu nakon izlaganja UV zračenju što je u skladu s podacima iz literature (Tseng i sur. 1994, Ivančić Baće i sur. 2003).

Protein SSB ima važnu ulogu u RecF putu homologne rekombinacije. Protein RecA ne može se samostalno nanijeti na jednolančanu DNA na koju je prethodno već vezan SSB. Za uklanjanje tetramera SSB i polimerizaciju filameta RecA potrebni su

proteini RecF puta. Također, SSB interakcija s helikazom RecQ stimulira njenu aktivnost, kao i aktivnost egzonukleaze RecJ u kontaktu sa tetramernim proteinom (Han i sur. 2006).

Rezultati iz poglavlja 3.1.2 pokazuju da mutant *ssb-1 recO* ima izrazito smanjen postotak preživljenja nakon izlaganja UV zračenju zbog nemogućnosti polimerizacije RecA nukleoproteinskog filameta na jednolančanu DNA. Proces homologne rekombinacije je onemogućen nedostatkom filameta RecA. Iako jednostruki mutant *recO* ima značajno bolje preživljenje, u kombinaciji s mutacijom *ssb-1* preživljenje drastično pada. Ovdje se nameće zaključak da mutacija *ssb-1* inhibira aktivnost enzima RecBCD koji je aktivan u ovom dvostrukom mutantu.

Nasuprot iznimno velikoj važnosti proteina RecO u mutantu *ssb-1* bakterije *E. coli*, izgleda da proteini RecQ i RecJ imaju manju ulogu u RecF putu rekombinacije. Dvostruki mutanti *ssb-1 recQ* i *ssb-1 recJ* pokazuju približno jednaki postotak preživljenja nakon ozračivanja s različitim dozama UV zračenja kao i jednostruki mutant *ssb-1*. Moguće objašnjenje takvog rezultata moglo bi biti postojanje drugih enzima koji mogu obavljati istu aktivnost. U slučaju deficijencije proteina RecQ i RecJ moguće je da zamjenski enzimi obavljaju njihove aktivnosti omogućavajući rekombinaciju i približno jednak postotak preživljenja kao kod mutanta *ssb-1*.

Kako je već navedeno, RecB1080CD put rekombinacijskog popravka nema egzonukleaznu aktivnost, kao ni sposobnost nanošenja RecA filameta na jednolančanu DNA. Zato protein RecO ima jedinstvenu ulogu u mutantu *recB1080*. Njegovom aktivnošću zamjenjuje se SSB tetramer vezan na jednolančanu DNA s proteinima RecA. RecA filament ima sposobnost pronalaska homologne DNA omogućavajući izmjenu lanaca i homolognu rekombinaciju.

Rezultati prikazani u poglavlju 3.1.3 pokazuju da je trostruki mutant *ssb-1 recB1080 recO* iznimno osjetljiv na UV zračenje jer nema aktivan niti jedan put za nanošenje proteina RecA, što je u skladu sa do sada objavljenom literaturom (Ivančić Baće i sur. 2003).

Trostruki mutant *ssb-1 recB1080 recQ* pokazuje mali pad postotka preživljenja i ne smatra se da RecQ ima esencijalnu ulogu u RecB1080CD hibridnom putu popravka. Literatura (Jockovich i Myers 2001) međutim daje značajnu ulogu egzonukleazi RecJ u slučaju mutanta *recB1080*. Ona je potrebna za stvaranje jednolančane DNA na koju se polimerizira RecA filament. Iako dvostruki mutant *recB1080 recJ*, koji je korišten kao kontrola, zaista pokazuje značajnu osjetljivost na UV zračenje, soj *ssb-1 recB1080 recJ* ima znatno veći postotak preživljenja. Trostruki mutant ima sposobnost rekombinacijskog popravka približno jednaku mutantu *ssb-1*. Ovaj rezultat išao bi u prilog pretpostavci da RecF put efikasnije zamjenjuje protein SSB-1 s RecA proteinom nakon izlaganja UV zračenju. Ali, ovaj soj pokazuje primjetan pad vijabilnosti u neozračenim uvjetima pri nepermisivnoj temperaturi što ukazuje opet na važnost enzima RecBCD. Potrebni su daljnji pokusi da bi se došlo do konkretnijih zaključaka vezanih za ovaj rezultate.

## 4.2 KONJUGACIJSKA REKOMBINACIJA

U prethodnim poglavljima se proučavao postotak preživljenja bakterijskih sojeva nakon UV zračenja u svrhu određivanja učinkovitosti popravka DNA, odnosno nastanka filameta RecA, u mutantima *ssb-1*. Drugi dio rada usmjeren je na određivanje uspješnosti konjugacijske rekombinacije u mutantnim sojevima *ssb-1*.

Zaključak koji je moguće donijeti jest da je protein RecO esencijalan za konjugacijsku rekombinaciju u mutantu *ssb-1*. Naime, soj *ssb-1 recO* pokazuje značajno smanjenje frekvencije rekombinacije pri temperaturi od 42°C. Helikaza RecQ nema značajniju ulogu u ovom procesu. Nasuprot tome, mutant *ssb-1 recJ* ima smanjenu sposobnost vršenja rekombinacije. No, najzanimljiviji rezultat je povećanje frekvencije konjugacijske rekombinacije kod trostrukog mutanta *ssb-1 recB1080 recJ*. S obzirom da ovaj mutant pokazuje veću učinkovitost i kod rekombinacijskog popravka nakon UV zračenja od soja *recB1080 recJ*, može se zaključiti da ovaj rezultat nije slučajna. Dakle, kod mutanta *ssb-1* RecF put rekombinacije učinkovitije vrši zamjenu proteina SSB-1 s proteinom RecA.



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju eksperimentalnih rezultata i dosadašnjih saznanja o tematici ovog rada mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Mutacija *ssb-1* smanjuje aktivnost enzima RecBCD, što dovodi do smanjene vijabilnosti mutanta *ssb-1 recB1080*.
2. Protein RecO ima ključnu ulogu u rekombinacijskom popravku DNA i konjugacijskoj rekombinaciji u mutantu *ssb-1* bakterije *E. coli*. Potreban je za aktivnu izmjenu proteina SSB-1 s proteinom RecA.
3. Nedostatak helikazne aktivnosti enzima RecQ nema značajniji utjecaj na učinkovitost rekombinacijskog popravka DNA i konjugacijsku rekombinaciju u mutantu *ssb-1* bakterije *E. coli*.
4. Utjecaj mutacije 5'→3' egzonukleaze RecJ nije jako bitna za uspješnost rekombinacije kod mutanta *ssb-1*.
5. Trostruki mutantni soj *ssb-1 recB1080 recJ* ima veći postotak preživljenja nakon izlaganja UV zračenju i višu frekvenciju konjugacijske rekombinacije od dvostrukog mutanta *ssb-1 recJ*.
6. Vijabilnost sojeva *ssb-1 recB1080* i *ssb-1 recB1080 recJ* pri temperaturi od 42°C značajno je smanjena zbog teškoća u replikaciji i popravku spontanih oštećenja molekule DNA.

## 6. LITERATURA

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.
2. Amundsen S.K., Taylor A.F., Reddy M., Smith G.R. (2007): Intersubunit signaling in RecBCD enzyme, a complex protein machine regulated by Chi hot spots. *Genes & development* **21**: 3296-3307.
3. Anderson D.G., Churchill J.J., Kowalczykowski S.C. (1999): A single mutation, RecB<sup>D1080A</sup>, eliminates RecA protein loading but not chi recognition by RecBCD enzyme. *The journal of biological chemistry* **274**: 27139-27144.
4. Anderson D.G., Kowalczykowski S.C. (1998): SSB protein controls RecBCD enzyme nuclease activity during unwinding: a new role for looped intermediates. *Journal of molecular biology* **282**: 275-285.
5. Churchill J.J., Kowalczykowski S.C. (2000): Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme. *Journal of molecular biology* **297**: 537-542.
6. Cooper G.M. (2000): *The cell: a molecular approach*. ASM press, Washington.
7. Han E.S., Cooper D.L., Persky N.S., Sutera V.A., Whitaker R.D., Montello M.L., Lovett S.T. (2006): RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic acids research* **34**: 1084-1091.
8. Higgins N.P. (2005): *The bacterial chromosome*. ASM press, Washington.
9. Ivančić-Baće I., Peharec P., Moslavac S., Škrobot N., Salaj-Šmic E., Brčić-Kostić K. (2003): RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient *recB* mutant of *Escherichia coli*. *Genetics* **163**: 485-494.
10. Jockovich M.E., Myers R.S. (2001): Nuclease activity is essential for RecBCD recombination in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **41**: 949-962.
11. Kowalczykowski S.C. (2000): Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 156-165.

12. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. (1994): Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiological reviews **58**: 401-465.
13. Kuzminov A. (1999): Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage  $\lambda$ . Microbiology and molecular biology reviews **63**: 751-813.
14. Lloyd R.G., Buckman C., Benson F.E. (1987): Genetic analysis of conjugational recombination in *Escherichia coli* K12 strains deficient in RecBCD enzyme. Journal of general microbiology **133**: 2531-2538.
15. Magner D.B., Blankschien M.D., Lee J.A., Pennington J.M., Lupski J.R., Rosenberg S.M. (2007): RecQ promotes toxic recombination in cells lacking recombinatin intermediate-removal proteins. Molecular cell **26**: 273-286.
16. Meyer R.R., Laine P.S. (1990): The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. Microbiological reviews **54**: 342-380.
17. Michel B., Boubakri H., Baharoglu Z., LeMasson M., Lestini R. (2007): Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. DNA repair **6**: 967-980.
18. Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. (2000): RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: A universal step of recombinational repair. Mol. Cell **11**: 1337-1347.
19. Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (1996): *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM press, Washington.
20. Rafferty J.B., Sedelnikova S.E., Hargreaves D., Artymiuk P.J., Baker P.J., Sgarple G.J, Mahdi A.A., Lloyd R.G., Rice D.W. (1996): The crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. Science **274**: 415-421.
21. Rudolph C.J., Upton A.L., Lloyd R.G. (2008): Maintaining replication fork integrity in UV-irradiated *Escherichia coli* cells. DNA repair **7**: 1589-1602.

22. Shereda D.S., Bernstein D.A., Keck J.L. (2007): A central role for SSB in *Escherichia coli* RecQ DNA helicase function. *The journal of biological chemistry* **282**: 19247-19258.
23. Snyder L., Champness W. (2007): *Molecular genetics of bacteria*. ASM press, Washington.
24. Tseng, Y.C., Hung J.L., Wang T.C.V. (1994): Involvement of RecF pathway recombination genes in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* cells *Mutat. Res.* **315**: 1-9.
25. Wang T.C.V., Smith K.C. (1982): Effects of the *ssb-1* and *ssb-113* mutations on survival and DNA repair in UV-irradiated  $\Delta$ *uvrB* strains of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **151**: 186-192.
26. Williams K.R., Murphy J.B., Chase J.W. (1984): Characterization of the structural and functional defect in the *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein encoded by the *ssb-1* mutant gene. *The journal of biological chemistry* **259**: 11804-11811.
27. Zerbib D., Mezard C., George H., West S.C. (1998): Coordinated actions of RuvABC in Holliday junction processing. *Journal of molecular biology*. **281**: 621-630.