

Evolucija DNA i mehanizma replikacije DNA

Romac, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:217:312611>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Romac

Evolucija DNA i mehanizma replikacije DNA

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Nina Romac

**Evolution of DNA and DNA replication
mechanism**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomski studij Biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Damjana Franjevića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Evolucija DNA i mehanizma replikacije DNA

Nina Romac

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Iako nije poznato koji su selektivni pritisci utjecali na nastanak i ranu evoluciju DNA, neosporno je da je prelazak s RNA na DNA genome jedan od ključnih događaja u evoluciji života. S obzirom na to da je replikacija esencijalan proces u svim živućim stanicama, koje su potekle od zajedničkog pretka, logična bi pretpostavka bila da je osnovna replikacijska mašinerija homologna u svim trima domenama živog svijeta – bakterijama, arhejama i eukariotima. Međutim, većina enzima koji sudjeluju u molekularnom mehanizmu replikacije nisu homologni u svim domenama života, što je podudarno s neovisnim nastancima replikacije DNA. Na kraju rada ću iznijeti hipotezu prema kojoj su virusi prethodili staničnom životu i potencijalno predstavljaju poveznicu između DNA i RNA svijeta.

Ključne riječi: replisom, DNA-polimeraza, LUCA, virusi
(26 stranica, 5 slika, 0 tablica, 72 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Damjan Franjević

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Evolution of DNA and DNA replication mechanism

Nina Romac

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

While it remains uncertain which selective pressures influenced the origin and early evolution of DNA, the transition from RNA to DNA genomes is undoubtedly a key event in the history of life. Since replication is an essential process in all living cells, which share a common ancestor, a reasonable assumption would be that the fundamental replication machinery is homologous across all three domains of life: Bacteria, Archaea, and Eukarya. Nonetheless, most enzymes that play a role in the molecular mechanism of replication are not homologous across all domains of life, which aligns with the idea of multiple independent inventions of DNA replication. Lastly, I will discuss a hypothesis that proposes viruses predated cellular life and might serve as the missing link between the RNA and DNA worlds.

Keywords: replisome, DNA-polymerase, LUCA, viruses
(26 pages, 5 figures, 0 tables, 72 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Damjan Franjević

Sadržaj

1 Uvod	1
2 RNA–DNA tranzicija	2
3 Genom LUCA-e	4
4 Evolucijske prednosti DNA	6
5 Stanični i virusni mehanizmi replikacije DNA	8
6 Replikacija DNA – dva neovisna nastanka	9
6.1 DNA-polimeraza	10
6.2 Primaza	11
6.3 Helikaza	12
6.4 Klizni držač i kompleks za nanošenje držača	14
7 Virusno porijeklo DNA i replikacije	16
8 Zaključak	19
9 Literatura	20
10 Životopis	26

1 Uvod

Sve danas poznate stanice imaju dvolančani DNA genom, no pretpostavlja se da je prije DNA i genski kodiranih proteina postojao period u povijesti života na Zemlji kada je RNA, ili neka kemijski slična molekula, imala vodeću ulogu u skladištenju i prenošenju genske informacije, odnosno jedinstvenu genetičku i katalitičku funkciju (Crick 1968; Orgel 1968). Postojanje RNA svijeta podupire otkriće introna koji imaju sposobnost vlastitog izrezivanja (Kruger i sur. 1982), kao i eksperiment kojim je dokazano da je ribosom funkcionalno ribozim, to jest da je RNA katalitički aktivna komponenta ribosoma (Nissen i sur. 2000). Iako nije izgledno da će ikada postojati fizički dokaz organizma s RNA genomom jer RNA svijet ne postoji gotovo četiri milijarde godina, kristalna struktura ribosoma pokazuje da je takav svijet ne samo moguć, već i vjerojatan prekursor današnjeg DNA svijeta (Ban i sur. 2000; Joyce 2002). Nastanak i evolucija DNA i mehanizma replikacije DNA stoga je smještena u vremenskom kontekstu kasnog RNA svijeta te pojave posljednjeg zajedničkog pretka svih živih bića (eng. *Last Universal Common Ancestor*, LUCA) (Forterre i sur. 2004).

Za svaku je stanicu od iznimne važnosti da jednom prije svake stanične diobe, s najvećom mogućom točnošću, replicira sveukupnu gensku informaciju. Za replikaciju DNA odgovoran je replisom, velik i dinamičan kompleks proteina koji integrira i koordinira sve enzimske aktivnosti ključne za replikaciju (DePamphilis i Bell 2011). S obzirom na to da mehanizam replikacije DNA u svih živućih organizama ima mnoge sličnosti – poput bidirekcionalnosti replikacije, RNA početnica i definiranih ishodišta replikacije – inicijalno se pretpostavljalo da su strukture replisoma homologne između tri domene. Ipak, ispostavilo se da različite komponente bakterijske replikacijske mašinerije nisu blisko ili uopće nisu srodne sa svojim arhealnim i eukariotskim funkcionalnim ekvivalentima. S druge strane, identificirani su i proteini kodirani sekvencama koje su visoko konzervirane u svim trima domenama. Stoga se pretpostavlja da je LUCA, kao i svi recentni organizmi, posjedovao DNA, ali ga nije replicirao mehanizmom koji koriste sve danas poznate stanice, već je današnja replikacija DNA najvjerojatnije evoluirala nakon pojave LUCA-e, i to dvaput neovisno (Leipe i sur. 1999)

2 RNA–DNA tranzicija

Pretpostavlja se da su prvi DNA genomi bili manji i potencijalno jednolančani, za razliku od velikih, dvolančanih DNA genoma, kakve imaju svi stanični organizmi (Forterre 2002). Također su predloženi modificirani RNA genomi, 2'-O-metil-RNA, stabilnije i veće inačice RNA genoma, koji su potencijalno predstavljali evolucijski most između RNA i DNA svijeta (Poole i sur. 2000).

Osnovni preduvjet koji je morao biti zadovoljen kako bi mogla nastati DNA jest dostupnost prekursora DNA, deoksiribonukleozid-trifosfata. Deoksiribonukleozid-trifosfati u modernim stanicama nastaju u dva koraka: ribonukleotid-reduktaza reducira ribonukleotide, konkretno, ribonukleozid-difosfate, čime nastaju deoksiribonukleotidi koji se ugrađuju u DNA, dok timidilat-sintaza katalizira konverziju uridin-monofosfata (uridilat, UMP) u deoksitimidin-monofosfat (deoksitimidilat, dTMP) (Nelson i Cox 2017). S obzirom na to da je uridilat prekursor deoksitimidilata, posljedično se i tranzicija iz RNA u DNA svijet morala dogoditi u dva koraka, gdje je prvo došlo do nastanka DNA koja je sadržavala uracil, (U-DNA), a tek onda do DNA s timinom (T-DNA), kakvu danas poznajemo (Forterre 2001; Poole i sur. 2001).

Često se kao razlog zamjene RNA s DNA navodi veća stabilnost DNA i činjenica da je replikacija DNA točnija, što je u konačnici omogućilo evoluciju velikih genoma koji kodiraju mnogobrojne i kompleksne proteine (Lazcano i sur. 1988; Poole i sur. 2001). Primjer prednosti DNA nad RNA jest da DNA ima sposobnost popravka uracila koji nastaje aminacijom citozina, dok u RNA taj uracil neće biti prepoznat kao pogrešan jer je riječ o dušičnoj bazi koja se inače nalazi u RNA.

Ipak, takav evolucijski pritisak jedino ima smisla sagledavati u kontekstu kompeticije između populacija s DNA genomima i onih s RNA genomima. Stabilnost i točnost DNA genoma je jedino prednost ukoliko su veliki DNA genom i mehanizam popravka deaminacije citozina već bili prisutni kod prvih organizama s DNA genomima, ali ne daje odgovor na pitanje zašto je DNA evoluirala. Stoga je potrebno uzeti u obzir neki drugi selektivni pritisak, kako bismo dobili odgovor zašto je prisutnost DNA genoma kod prve jedinke koja ga je posjedovala pozitivno selektirana osobina (Forterre 2002).

Jedan od predloženih prvih organizama s U-DNA, a samim time i prvi organizam selektiran za to svojstvo je virus (Forterre 2001). U tom slučaju bi virus s mutacijom imao neposrednu prednost u

odnosu na divlji tip jer bi njegov genom bio zaštićen od mehanizama inaktivacije RNA domaćina. Konkretno, redukcija riboze u deoksiribozu je za posljedicu imala značajnu promjenu strukture dvostruke uzvojnice, koja je iz gušće pakirane i zavijenije A forme prešla u rahliju B formu, zbog čega RNAze ne prepoznaju DNA kao supstrat i obrnuto. Hipotezi da je virus prvi organizam s DNA genomom u prilog ide činjenica da neki recentni virusi posjeduju U-DNA, dok neki drugi, poput bakteriofaga T4, imaju modificirane T-DNA genome koji im omogućuju zaštitu od deoksiribonukleaza, kao i to da mnogi DNA virusi kodiraju vlastitu ribonukleotid-reduktazu, odnosno timidilat-sintazu (Balter 2000; Forterre 2002).

3 Genom LUCA-e

Postoji mnogo oprečnih mišljenja o organizaciji genoma u LUCA-i, koji je živio prije više od tri milijarde godina. Carl Woese, za kojeg je pitanje o složenosti LUCA-e bilo jedno od najvažnijih u biologiji, smatrao je da je LUCA stanica jednostavne organizacije, tzv. progenot, čiji sustavi prenošenja genske informacije nisu dosegli preciznost i točnost kakvu imaju danas u svim trima koljenima živog svijeta. LUCA je, prema Woeseu i Foxu, mnogo manje kompleksnosti od prokariotske stanice, te postoji mogućnost da kod njega nije još u potpunosti evoluirala veza između genotipa i fenotipa (Woese i Fox 1977). S druge strane, postoji i mišljenje da je LUCA po kompleksnosti na molekularnoj razini bio usporediv s eukariotskom stanicom, s replikacijskom i transkripcijskom mašinerijom nalik onoj kod eukariota, a da je kod prokariota došlo do regresivne evolucije (Glansdorff 2000; Penny i Poole 1999).

Također se postavlja pitanje vezano uz konkretnu nukleinsku kiselinu koju je LUCA posjedovao. Woese, a kasnije i drugi znanstvenici, zastupaju RNA-LUCA hipotezu, prema kojoj je posljednji zajednički predak pripadao RNA svijetu, odnosno imao RNA s dvojakom – kodirajućom i katalitičkom – ulogom. Ova je hipoteza temeljena na manjku sličnosti između sustava replikacije DNA bakterija te onog kod eukariota i arheja (Mushegian i Koonin 1996; Woese 1987). Analiza mogućih filogenetičkih odnosa između proteina koji sudjeluju u replikaciji DNA u različitim domenama i obavljaju analogne funkcije pokazala je da spomenuti nedostatak sličnosti ne može biti rezultat isključivo različitih stopa evolucije (Leipe i sur. 1999).

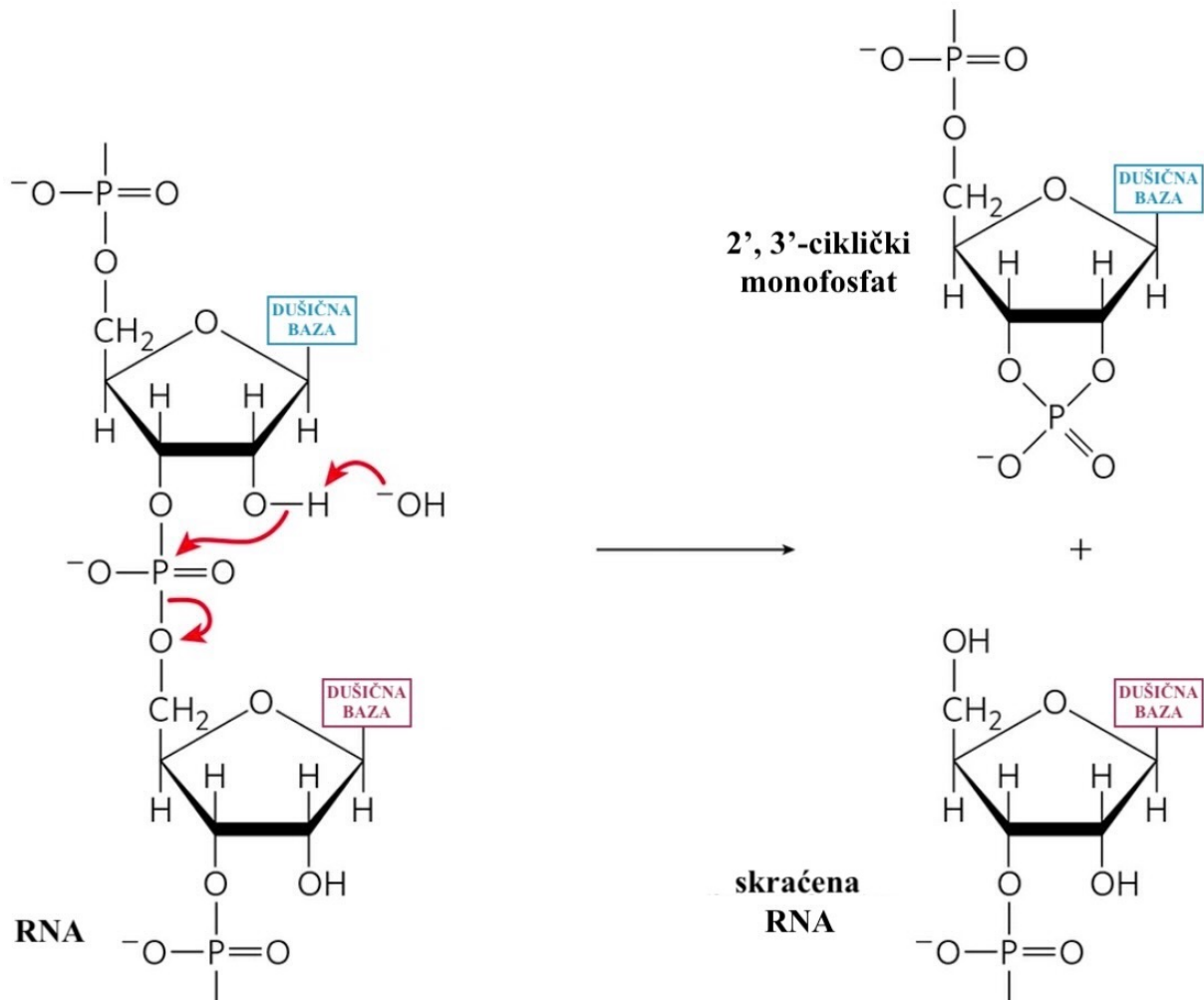
Sredinom 90-ih godina 20. stoljeća Koonin i suradnici predložili su da je DNA, a posljedično i replikacija DNA, nastala dvaput neovisno – jednom u bakterija, te drugi put u zajedničkoj liniji arheja i eukariota (Mushegian i Koonin 1996). Međutim, nekoliko godina kasnije korigirali su svoju teoriju i sugerirali da je ne još replicirana DNA bila prisutna u LUCA-i, pri čemu je RNA i dalje imala funkciju kodiranja, odnosno prenošenja genske informacije. Stoga se samo replikacija DNA, a ne DNA, razvila dvaput neovisno (Leipe i sur. 1999). Recentnija istraživanja minimalnog genoma LUCA-e, temeljena na identifikaciji zajedničkih gena u osam vrsta koje pripadaju koljenima Euryarchaeota i Thermoproteota ukazuju na to da je LUCA imao DNA genom. Međutim, pitanje je li riječ o rudimentarnom progenotu ili pak stanici koja više podsjeća na recentnu prokariotsku ili eukariotsku stanicu ostaje otvoreno, kao i pitanje je li LUCA uz DNA

posjedovao i RNA genom. Nadalje, na temelju analize proteina uključenih u replikaciju, rekombinaciju i popravak DNA koji ne prate nikakav obrazac konzistentan s predloženim stablom života, nedostatka topoisomerase II kod LUCA-e, kao i ovisnosti ribonukleotid-reduktaze o radikalu cisteina za sintezu deoksiribonukleotida, može se zaključiti da je nastanak LUCA-e uslijedio nedugo nakon pojave DNA (Forterre i sur. 2004; Freeland i sur. 1999; Mat i sur. 2008).

4 Evolucijske prednosti DNA

Prednost DNA kao genetičkog materijala primarno se odnosi na veću kemijsku stabilnost DNA u odnosu na RNA. Kemijska stabilnost DNA očituje se u činjenici da okosnicu DNA uz fosfate gradi i deoksiriboza, umjesto riboze RNA. Deoksiriboza se razlikuje od riboze u tome što na 2' poziciji umjesto hidroksilne skupine ima vodikov atom. Upravo iz te male strukturne razlike proizlazi velika razlika u stabilnosti. Naime, u lužnatim uvjetima RNA je podložna neenzimskoj hidrolizi; zbog velike koncentracija hidroksidnih iona dolazi do napada na hidroksilnu skupinu na 2' poziciji riboze, uslijed čega će ta hidroksilna skupina napasti fosfat te će doći do pucanja fosfodiesterске veze i nastajanja cikličkog monofosfata, odnosno do skraćivanja RNA (**Slika 1.**). DNA se nikad neće hidrolizirati jer na 2' poziciji nema hidroksilnu skupinu (Nelson i Cox 2017).

S druge strane, značajan je i genetički aspekt prelaska na DNA, prvenstveno zbog veće vjernosti replikacije DNA u usporedbi s replikacijom RNA. Pogreške pri replikaciji genetičkog materijala rezultiraju uvođenjem mutacija, a prečeste mutacije uzrokuju degradaciju genske informacije. Posljedično, stopa mutacija izravno ograničava količinu informacija koja može biti pohranjena u genomu, odnosno veličinu genoma. Prema teorijskim modelima, veličina informacije sadržane u DNA obrnuto je proporcionalna stopi mutacija po nukleotidu (Eigen 1971). Neenzimske polimerizacije DNA i RNA u laboratorijskim uvjetima pokazale su da je RNA intrinzično sklonija pogreškama prilikom replikacije. Manja vjernost replikacije RNA u odnosu na replikaciju DNA može se pripisati velikoj stabilnosti gvanin-uracil para baza, koji nastaje uslijed pogreške pri replikaciji, a stabilnost mu je usporediva s Watson-Crickovim parovima baza. Osim toga, RNA-DNA hibridni sustavi ukazuju na to da se RNA može vjerno prepisati u komplementarnu DNA, dok prepisivanje DNA u RNA podrazumijeva relativno visoku stopu mutacija. Navedeni eksperimentalno dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je prijelaz s RNA na DNA rezultirao smanjenjem stope mutacija pri replikaciji genetičkog materijala, što je omogućilo povećanje genoma. Osim toga, veća vjernost replikacije DNA osigurala je jednosmjernost tranzicije genetičkog materijala jer bi teoretsko povratno prepisivanje genoma iz DNA u RNA za posljedicu imalo značajan gubitak genske informacije (Leu i sur. 2011).



Slika 1. Neenzimska hidroliza RNA u lužnatim uvjetima. Preuzeto i modificirano iz Nelson i Cox 2017.

5 Stanični i virusni mehanizmi replikacije DNA

U svim se stanicama DNA replicira simetrično, pri čemu je osnovni mehanizam replikacije vrlo sličan u bakterija, eukariota i arheja (Bohlke i sur. 2002). Inicijacijski proteini prepoznaju specifične, vrlo konzervirane sekvence na ishodištu replikacije te započinju stvaranje replikacijskog sustava DNA – replisoma – koji čini sveukupna proteinska mašinerija uključena u replikaciju DNA. Kretanje replikacijske viljuške uključuje usklađeno djelovanje primaza, helikaza, DNA-vezujućih proteina i DNA-polimeraza, s pripadajućim kliznim držačima, što za posljedicu ima simultanu replikaciju oba lanca DNA. Jedino takav efikasan mehanizam replikacije podržava postojanje velikih staničnih genoma.

Međutim, virusi imaju različite mehanizme replikacije. U nekih bakteriofaga, poput P4 i TZ, te eukariotskih virusa, primjerice herpesvirusa, simetrična replikacija se ostvaruje zajedničkom primaznom i helikaznom aktivnosti jedinstvenog proteina (Kato i sur. 2001; Lehman i Boehmer 1999). S obzirom na to da primaze bakteriofaga i herpesvirusa pripadaju različitim porodicama proteina, sličnost u združenoj aktivnosti helikaze i primaze posljedica je konvergentne evolucije (Dracheva i sur. 1995). Replikacija virusne DNA također može biti i asimetrična, kao što je slučaj kod adenovirusa, gdje prvo dolazi do potpune denaturancije dvolančane uzvojnice, a tek onda do replikacije pojedinačnih lanaca. Treći mehanizam replikacije DNA zastupljen kod virusa je polusimetrični, gdje je inicijacija replikacije na jednom od lanaca odgođena sve dok drugi lanac već nije djelomično repliciran (Forterre i sur. 2004). Zanimljivo je i da se neki plazmidi repliciraju virusnim mehanizmima replikacije, kao što je replikacija kotrljajućeg kruga (eng. *rolling circle replication*), dok neki kodiraju replikacijske proteine koji su homologni virusnima, što indicira da su plazmidi potekli od virusa koji su izgubili gene za kodiranje kapsidnih proteina (Forterre 1992).

Uzevši u obzir da je replikacija svih virusa s dvolančanim RNA genomom asimetrična, vjerojatno je replikacija DNA u svom izvornom obliku također bila asimetrična, a da je tek kasnije – preko intermedijarnog polusimetričnog – evoluirala u simetričan model replikacije kakav je prisutan u svim danas poznatim stanicama (Forterre i sur. 2004).

6 Replikacija DNA – dva neovisna nastanka

Struktura DNA, antiparalelna dvostruka uzvojnica, predstavlja prepreku enzimskoj replikaciji jer se lanci DNA prvo moraju razdvojiti te se zavoji moraju kontinuirano odmotavati prilikom replikacije, na što su ukazali još Watson i Crick u svojem radu o implikacijama strukture DNA (Watson i Crick, 1953). Helikaze su enzimi koji klize po DNA i razdvajaju roditeljske lance, pritom trošeći ATP, dok su topoizomeraze odgovorne za odmotavanje superzavijenih dijelova koji nastaju kao posljedica razdvajanja lanaca. Posljedica antiparalelnosti lanaca je da se jedan lanac diskontinuirano sintetizira u suprotnom smjeru od odmatanja, pri čemu se svaki fragment (tzv. Okazakijev fragment) mora *de novo* inicirati, odnosno potrebna mu je vlastita početnica koja nastaje kondenzacijom ribonukleotida. Početnice su kratki RNA segmenti koje u stanici sintetizira primaza, specijalizirana RNA-polimeraza ovisna o DNA (Kilkenny i sur. 2013; Kornberg i Baker 1992). Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja zašto upravo RNA-polimeraza, a ne DNA-polimeraza, sintetizira početnice, odnosno zašto su one RNA po kemijskom sastavu, zbog čega ih u konačnici drugi enzimi moraju zamijeniti za DNA. Prvi razlog je taj što su ribonukleotidi prisutni u 10-100 puta većoj koncentraciji od deoksiribonukleotida, a visoka koncentracija je vjerojatno neophodna da bi enzim istovremeno vezao dva ribonukleotida. Drugo, početne kondenzacije nukleotidnog lanca nisu dovoljno točne, konkretno, primaza pogriješi u jedan posto slučajeva (Zhang i Grosse 1990). Stoga RNA predstavlja svojevrsan marker za dio novonastalog lanca koji nije sintetiziran dovoljnom točnošću, zbog čega naposljetku može biti zamijenjen s DNA, dok bi DNA početnica bila trajnija, to jest teža za prepoznati i ukloniti. Enzim koji prepoznaje i izrezuje ribonukleotide te ih zamjenjuje za deoksiribonukleotide je DNA-polimeraza, što čini visokom točnošću. DNA-ligaza je enzim koji povezuje Okazakijeve fragmente.

S obzirom na složenost simultane replikacije oba lanca DNA, koja obuhvaća brojne reakcije katalizirane različitim enzimima i njihovu međusobnu kooperativnost, postavlja se pitanje je li ovaj proces postojao i bio funkcionalan u LUCA-i.

Arhealne i eukariotske zajedničke DNA-polimeraze se razlikuju od svojih bakterijskih pandana, što upućuje na neovisnu evoluciju replikacijske mašinerije u tim dvama granama staničnog života, no upravo su primaze i helikaze komponente mehanizma replikacije DNA koje se najviše razlikuju između bakterija i eukariota, odnosno arheja (Yao i O'Donnell 2016).

6.1 DNA-polimeraza

Kristalne strukture RNA- i DNA-polimeraza te biokemijski eksperimenti su otkrili da u katalizi reakcije sinteze polinukleotidnog lanca, odnosno stvaranja fosfodieterske veze, ne sudjeluju aminokiselinski bočni ogranci, već katalitičku, ali i strukturnu, ulogu imaju ioni magnezija koji su pozicionirani s dva negativno nabijena bočna ogranka. Naime, dva magnezijeva iona se nalaze u strukturi polimeraza: prvi magnezijev ion aktivira 3'-hidroksilnu skupinu početnice za nukleofilni napad na α -fosfat nukleotida, dok je drugi zaslužan za stabilizaciju negativno nabijene trifosfatne skupine nukleozid-trifosfata, a naposljetku i izlazne skupine pirofosfata (Nelson i Cox 2017). S obzirom na to da RNA ima sposobnost heliranja magnezijevih iona, dva metalna iona koja kataliziraju reakciju potencijalno predstavljaju odraz RNA svijeta (Yao i O'Donnell 2016).

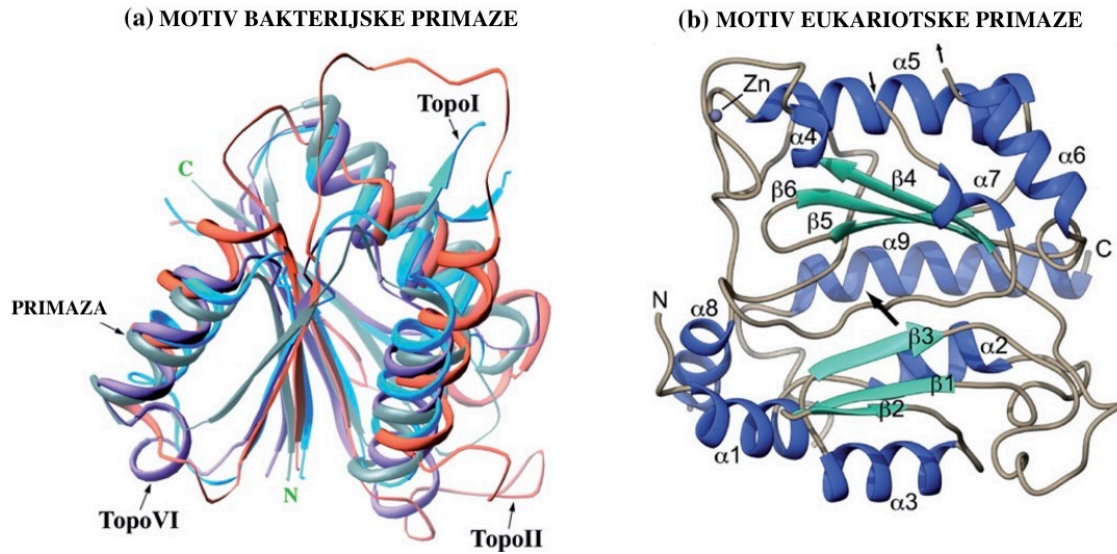
DNA-polimeraze su na temelju nehomolognih sekvenci svrstane u šest porodica (A, B, C, D, X, Y i reverzna transkriptaza) (Steitz 1999; Yang i Woodgate 2007). Sve DNA-polimeraze, neovisno kojoj porodici pripadaju, imaju strukturu nalik desnoj ruci, s domenama koje se često nazivaju dlan, prsti i palac (Johansson i Macneill 2010; Steitz 1999). Svaka domena ima specifičnu ulogu u sintezi polinukleotidnog lanca: prsti vežu dolazeći supstrat, nukleozid-trifosfat, palac prihvaća dvolančanu DNA, a dlan je katalitička domena jer sadrži aminokiseline, aspartate, koji vežu magnezijeve ione. Katalitička domena je ujedno i najkonzerviranija domena, s obzirom na to da u porodicama A, B i Y ova domena ima slične motive vezanja elemenata sekundarne strukture, što upućuje na srodnost tih polimeraza (Yang i Woodgate, 2007). Budući da sve polimeraze zauzimaju istu generalnu strukturu, neovisno kojoj porodici pripadaju, a istovremeno imaju nehomologe sekvence, evolucijski odnosi polimeraza i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Nadalje, porodice C i Z također imaju sličnu topologiju katalitičke domene, stoga postoji mogućnost da je ona dvaput evoluirala (Wing i sur. 2008). U bakterijama replikacijsku ulogu imaju polimeraze porodice C, koje nisu zastupljene u eukariota. Eukarioti za replikaciju koriste tri DNA-polimeraze iz porodice B. Arheje također koriste polimeraze porodice B, uz koje u replikaciji sudjeluju i polimeraze iz porodice D (Kelman i Kelman 2014). Upotreba polimeraza iz različitih porodica – polimeraza porodice C u bakterija i polimeraza porodice B u eukariota i arheja – ukazuje na to da je replikacijska mašinerija nakon LUCA-e evoluirala dvaput (Leipe i sur. 1999).

6.2 Primaza

Od svih replikacijskih enzima koji čine replikacijsku mašineriju, među bakterijskim i eukariotskim primazama postoji najveća divergencija. Bakterijska primaza je monomerni enzim, građen od samo jedne podjedinice, čije strukturno konzervirano aktivno mjesto – tzv. *toprim* domena – ukazuje na homologiju s topoizomerazama (**Slika 2. a**) (Aravind i sur. 1998; Podobnik i sur. 2000). Za razliku od toga, primaza se u eukariotskoj stanici nalazi u kompleksu s DNA polimerazom α (Pol α), pri čemu je katalitička aktivnost sinteze početnica ograničena na heterodimer dvije najmanje podjedinice koje ne dijele nikakvu sličnost u aminokiselinskom slijedu, ali niti strukturnu sličnost s bakterijskom *toprim* domenom. Eukariotske primazne podjedinice su homologne DNA-polimerazama porodice X (**Slika 2. b**) (Kilkenny i sur. 2013; Kirk i Kuchta 1999) Kooperacija obje podjedinice je neophodna za primaznu aktivnost: uloga veće podjedinice je stvaranje fosfodiesterske veze između prva dva nukleotida, dok je na manjoj podjedinici smješteno aktivno mjesto za elongaciju lanca (Copeland i Wang 1993; Zerbe i Kuchta 2002). Primaza u bakterija sintetizira RNA početnice od 10-12 nukleotida, dok su eukariotske početnice, koje nastaju u aktivnom mjestu primaznih podjedinica, veličine oko 7 ribonukleotida. Nakon što primazne podjedinice sintetiziraju RNA početnicu, podjedinica DNA-polimeraze elongira početnicu s 20-25 deoksiribonukleotida, što rezultira hibridnom RNA/DNA početnicom (Kilkenny i sur. 2013; Singh i sur. 1986).

Poput dviju malih podjedinica DNA-polimeraze α koje imaju primaznu aktivnost u eukariotskim stanicama, arhealna primaza je strukturno također heterodimer, a manjak polimerazne i B podjedinice ju razlikuje od eukariotske inačice. Nadalje, dokazano je *in vitro* da arhealna primaza ima sposobnost korištenja ribonukleotida ili deoksiribonukleotida kao prekursora, to jest sinteze RNA ili DNA početnica, s tim da ribonukleotide čvršće povezuje, što dodatno razlikuje arhealnu od eukariotske primaze (Bocquier i sur. 2001; Lao-Sirieix i sur. 2005). Za arheje je specifično i to da su Okazakijevi fragmenti naknadno procesirani, dodatkom RNA kape na 5' krajevima (Matsunaga i sur. 2003).

S obzirom na to da se bakterijska primaza po strukturi i aminokiselinskom slijedu nedvojbeno razlikuje od eukariotske i arhealne primaze koje dijele mnoge homologije, za pretpostaviti je da nemaju zajedničkog pretka i da su neovisno evoluirale (Yao i O'Donnell 2016).



Slika 2. (a) Struktura bakterijske primaze s tzv. *toprim* domenom koja je homologna s topoizomerazama. (b) Struktura eukariotska primaza ukazuje na homologiju s DNA-polimerazama X. Preuzeto i modificirano iz Yao i O'Donnell 2016.

6.3 Helikaza

Helikaze su enzimi koji imaju katalitičku sposobnost kidanja vodikovih veza između dušičnih baza nukleotida te translokacije duž jednolančane DNA, za što koriste energiju oslobođenu hidrolizom ATP-a. DNA-helikaze, nužne za replikaciju u svim staničnim tipovima, su homoheksameri koji obavijaju jedan lanac DNA i klize po njemu. Šest istovjetnih podjedinica enzima formira prsten s otvorom kroz koji, prilikom odvajanja lanaca, prolazi jednolančana DNA, dok drugi lanac ne ulazi u strukturu enzima. Svi tipovi helikaza ostvaruju helikaznu aktivnost tzv. mehanizmom steričke ekskluzije (eng. *steric exclusion mechanism*) razmatanja DNA (Hacker i Johnson 1997; Lee i sur. 2014).

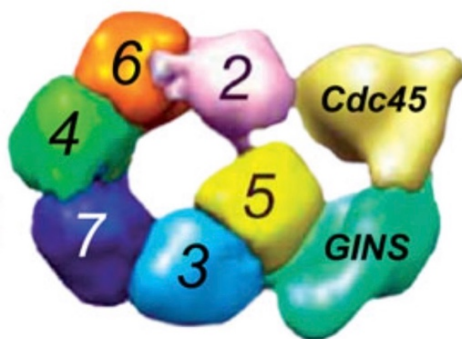
Premda zajednička kvaterna struktura i temeljni mehanizam odvajanja lanaca koje dijele DNA-helikaze u svim domenama živog svijeta na prvu sugeriraju njihovo zajedničko porijeklo, ne postoje homologije u aminokiselinskim sljedovima, ni u strukturi podjedinica (Yao i O'Donnell 2016). Motorne domene bakterijske helikaze – primjerice, protein DnaB u bakteriji *Escherichia coli* – imaju strukturni motiv lanca sličan onome kod rekombinaze RecA, dok su helikazni

molekularni motori eukariotskog heteroheksamernog kompleksa MCM2–7 (eng. *Minichromosome Maintenance*) temeljeni na AAA+ motivu (eng. *ATPases Associated with diverse cellular Activities*) (Chong i sur. 2000; Forterre i sur. 2004; LeBowitz i McMacken 1986; Leipe i sur. 1999; Li i sur. 2015; Tye 1999). Arheje imaju, kao i eukarioti, MCM helikazni kompleks zasnovan na AAA+ motivu, samo što mu je struktura homo-, a ne heteroheksamerna (Chia i sur. 2010; Chong i sur. 2000).

Eukariotsku helikazu sačinjava 11 podjedinica: 6 različitih AAA+ motornih podjedinica koje formiraju MCM2–7 heteroheksamerni prsten, uz 5 pomoćnih faktora vezanih za prsten (Li i sur. 2015; Moyer i sur. 2006). Pomoćni faktori su protein Cdc45 i 4 međusobno homologne podjedinice koje tvore heterotetramer GINS. Helikazni kompleks se stoga često naziva CMG (Cdc45, MCM2–7, GINS) (**Slika 3.**). Prema 3D rekonstrukciji elektronskim mikroskopom, eukariotski CMG kompleks u strukturi ima dva kanala, jedan koji tvore MCM2–7 podjedinice obavijajući jednolančanu DNA uslijed razmatanja dvolančane uzvojnice, a drugi – čija funkcija nije poznata – formiraju pomoćni faktori (Costa i sur. 2011). Nisu poznati homolozi Cdc 45 i GINS podjedinica u strukturi bakterijske helikaze, a arheje ih sadrže, iako nije poznato tvore li podjedinice CMG kompleks (Makarova i sur. 2012).

Postoji i značajna razlika u mehanizmu bakterijskih helikaza u odnosu na arhealne i eukariotske. Naime, bakterijska helikaza translocira na jednolančanoj DNA u smjeru 5'–3', dok je smjer helikazne aktivnosti arhealnog MCM i eukariotskog CMG kompleksa 3'–5' (Bochman i Schwacha 2009; LeBowitz i McMacken 1986; Moyer i sur. 2006).

Iz navedenih razlika slijedi da bakterijska i eukariotska helikaza nemaju zajedničkog pretka, te da su neovisno evoluirale (Yao i O'Donnell 2016).



Slika 3. Struktura eukariotskog helikaznog kompleksa (CMG). Preuzeto iz Yao i O'Donnell 2016.

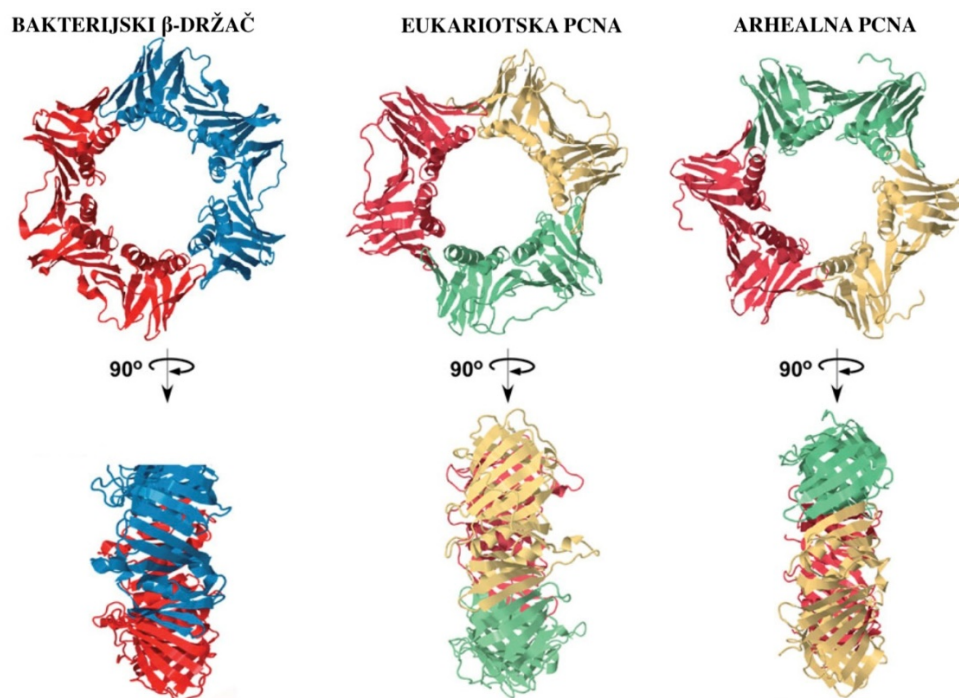
6.4 Klizni držač i kompleks za nanošenje držača

β -držač, otkriven u *E. coli*, prvi je pronađeni protein koji svoju funkciju obavlja obavijajući DNA (Kong i sur. 1992; Kuriyan i O'Donnell 1993). β -držač je po strukturi dimer, a pojedina podjedinica se sastoji od tri domene, od kojih sve imaju istu supersekundarnu strukturu, tj. motiv (eng. *fold*), što proteinu daje izgled simetričnog heksamera sa šest ponavljajućih jedinica.

Na DNA β -držač nanosi tzv. kompleks za nanošenje β -držača, protein koji se sastoji od 5 podjedinica te uz utrošak ATP-a regulira otvaranje i zatvaranje β -držača oko DNA. Nakon što obuhvati DNA, β -držač se veže za DNA-polimerazu III, glavni replikacijski enzim *E. coli*, te klizi po DNA. DNA-polimeraza III u kompleksu s β -držačem može dodati 500-1000 nukleotida u sekundi te replicirati čak 500 000 nukleotida prije nego što disocira (Kuriyan i O'Donnell 1993). Dakle, glavna uloga držača u replikaciji jest povećanje procesivnosti DNA-polimeraze, a to ostvaruje tako što se veže za polimerazu i klizi iza nje, pri čemu povezuje polimerazu s DNA tijekom sinteze komplementarnog lanca (Nelson i Cox 2017).

U stanicama eukariota i arheja, ulogu kliznog držača ima PCNA (eng. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), čija je struktura u načelu podudarna s onom β -držača (Krishna i sur. 1994). Najveća razlika je u tome što je PCNA trimer čije se podjedinice sastoje od dvije domene, ali u konačnici, poput β -držača, tvori strukturu prstena sa šest domena (**Slika 4.**). Strukturna homologija bakterijskog β -držača i eukariotske, odnosno arhealne PCNA-e sugerira da su porijeklom od istog pretka, kao i da je LUCA sadržavao svoju inačicu kliznog držača. Za funkciju kliznog držača neophodan je i kompleks za nanošenje držača koji ima ATP-aznu aktivnost. Bakterijski i eukariotski kompleksi za nanošenje držača su cirkularni pentameri čije su podjedinice međusobno strukturno slične, ali i homologne, iz čega slijedi da je LUCA posjedovao klizni držač i kompleks za njegovo nanošenje koje su svi njegovi potomci naslijedili (Bowman i sur. 2004; Kelch i sur. 2011; O'Donnell i sur. 1993). S obzirom na to da gotovo sve eukariotske, bakterijske i arhealne DNA-polimeraze interagiraju s kliznim nosačem koji je ključan za procesivnost, logična je pretpostavka da je u LUCA-i držač povećavao procesivnost polimerazi odgovornoj za replikaciju genoma. Ipak, to nije nužno slučaj, niti je sigurno da je povećanje procesivnosti primarna i inicijalna funkcija držača. Naime, DNA-polimeraze imaju intrinzičnu procesivnost, a, osim toga, klizni držač u stanicama veže različite enzime te ima i druge funkcije, poput popravka DNA.

Primjerice, PCNA je neophodna za popravak pogrešno sparenih baza jer osigurava da krivo spareni nukleotid novog lanca bude izrezan, a ne ispravan nukleotid lanca kalupa (Pluciennik i sur. 2010).



Slika 4. Strukture kliznih držača u pojedinim domenama živog svijeta: bakterijski β -držač, eukariotska PCNA te arhealna PCNA. Preuzeto i modificirano iz Yao i O'Donnell 2016.

7 Virusno porijeklo DNA i replikacije

Hipoteza prema kojoj su virusi prethodili staničnom životu uvjerljiva je ako se uzme u obzir genetička raznolikost virusa koja je neusporedivo veća u odnosu na raznolikost načina pohrane genske informacije kod staničnih organizama. Iako se to protivi donekle konvencionalnom pogledu na viruse, prema kojemu su se prvo pojavile stanice, zastupnici ove teorije mišljenja su da ona može rasvijetliti brojne nedoumice kada je riječ o evoluciji DNA i mehanizma replikacije (Forterre i sur. 2004; Koonin i sur. 2015; Leipe i sur. 1999).

Izrazita sličnost enzimskih aktivnosti uključenih u replikaciju DNA kod bakterija i eukariota isprva je implicirala da su te replikacijske mašinerije porijeklom od zajedničke predačke koja je bila prisutna u LUCA-i. Drugim riječima, očekivano je bilo da bakterijski i eukariotski replikacijski proteini budu ortologni. Međutim, ispostavilo se da ne samo da to nije slučaj, već da višestruki ključni replikacijski proteini u bakterija nemaju arhealne, odnosno eukariotske homologe. Nadalje, homologni proteini većine eukariotskih proteina koji sudjeluju u replikaciji DNA su identificirani samo u arheja, a ne u bakterija (Edgell i Doolittle 1997; Leipe i sur. 1999; Mushegian i Koonin 1996).

Stoga je plauzibilan zaključak da su bakterijske i arhealne/eukariotske verzije brojnih replikacijskih proteina neovisno nastale. Pretpostavlja se da su to proteini koji su izvorno bili uključeni u replikaciju ili gensku regulaciju RNA pa su regrutirani i modificirani. Značajnu iznimku predstavljaju držač i kompleks za nanošenje držača, za koje se na temelju sličnosti u strukturi i nukleotidnim sekvencama smatra da su ortologni u svim trima domenama. U okvirima hipoteze da je prvobitni replikacijski sustav DNA nastao u virusima, homologija proteina replikacijskih sustava koji su neovisnog postanka objašnjava se pretpostavkom da je riječ o proteinima koji su se pojavili kasno u evoluciji replikacije DNA te su ih replikacijski sustavi neovisno regrutirali (Forterre i sur. 2004).

U slučaju da je DNA evoluirala u virusima, postoji mogućnost da je više replikacijskih sustava DNA nastalo i evoluiralo u različitim razvojnim linijama RNA virusa, što bi za posljedicu imalo period evolucije mehanizma replikacije ograničen na viruse. Takav scenarij bi mogao objasniti postojanje različitih funkcionalno analognih, ali nehomolognih inačica replikacijskih proteina.

Istovjetan je odnos prisutan i u svijetu virusa – primjerice – replikacijski proteini herpesvirusa, različitih virusa iz porodice Poxviridae te bakteriofaga T4 se potpuno razlikuju. Štoviše, nisu srodniji međusobno nego u odnosu na arhealne, odnosno bakterijske sustave replikacije DNA (Kato i sur. 2001; Lehman i Boehmer 1999; Trakselis i sur. 2001). Osim toga, više je porodica proteina uključenih u replikaciju DNA virusa, poput nekih helikaza i DNA-polimeraza porodice B, ograničeno na viruse i ne pojavljuju se u staničnim organizmima (Filee i sur. 2002; Lakshminarayan i sur. 2001). Postojanje replikacijskih proteina specifičnih za viruse je teško objasniti ukoliko se virusi promatraju kao izdvojena skupina nastala od staničnih organizama, ali u kontekstu virusnog porijekla replikacije, ovi su proteini nastali u virusima i jednostavno nikad nisu prešli u stanice (Forterre i sur. 2004).

Ako su se DNA i replikacijski proteini prvo pojavili u virusima, za pretpostaviti je da su iz virusa prešli u stanice, a ideju o prijenosu replikacijskih proteina između virusa i stanica podupiru filogenetički odnosi mnogih proteina (Forterre 2001). Naročito je značajno da različite eukariotske DNA-polimeraze – konkretno, alfa (Pol α), delta (Pol δ) i epsilon (Pol ϵ) – nisu grupirane zajedno u filogenetičkom stablu, već alterniraju s arhealnim DNA-polimerazama, DNA-polimerazama bakteriofaga T4, kao i brojnim skupinama virusnih DNA-polimeraza. Nadalje, na filogenetičkom stablu je također uočljivo da se Pol δ , koja je u eukariotskim stanicama uključena u replikaciju i popravak DNA, grana iz skupine virusnih DNA-polimeraza (**Slika 5.**) (Filee i sur. 2002, Villarreal i DeFilippis 2000).

8 Zaključak

Uspoređujući strukture i osobitosti RNA i DNA, evidentno je da DNA predstavlja kemijski i funkcionalno stabilniji genetički materijal. Pohrana genske informacije u manje reaktivnoj DNA, a ne RNA, ujedno se pokazala kao jedina vijabilna opcija, čemu svjedoči činjenica da danas nije poznat organizam koji posjeduje RNA genom. Ono oko čega postoji puno više nejasnoća jest na koji je način došlo do evolucije DNA, odnosno koji su selektivni pritisci bili ključni da bi pojava DNA kod prvih organizama predstavljala prednost, pod pretpostavkom da je riječ o organizmima s malim genomima i da sustav popravka DNA nije imao današnju točnost i preciznost.

Porijeklo replikacije DNA također predstavlja enigm. Premda je mehanizam replikacije detaljno istražen, i dalje nije poznato kada i gdje je evoluirao. Jedan od glavnih problema jest to da manjak konzerviranosti onemogućava rekonstrukciju predačkog mehanizma replikacije. Iako ključni replikacijski enzimi, poput DNA-polimeraze, primaze i helikaze, nisu homologni u bakterijama i eukariotima/arhejama, situaciju dodatno kompliciraju proteini koji su homologni u svim trima domenama živog svijeta, kao što je slučaj kod kliznog držača i kompleksa za nanošenje držača. Ako prihvatimo hipotezu da je mehanizam replikacije DNA nastao dvaput neovisno, moguće objašnjenje homologije je da se radi o proteinima koji originalno nisu imali ulogu u replikaciji, već su tek kasnije u evoluciji regrutirani za tu ulogu.

S obzirom na to da su virusi jedini biološki entitet koji ima sposobnost koristi RNA kao genetički materijal, zanimljivo ih je promatrati kao moguću poveznicu između genoma kakav posjeduju svi poznati stanični organizmi i svijeta u kojem je RNA imala kodirajuću i katalitičku funkciju. Osim toga, filogenetički odnosi proteina koji sudjeluju u replikaciji također ukazuju na to da je između virusa i stanica došlo do neke vrste prijenosa, a na budućim je istraživanjima da otkriju može li se ta povezanost virusa i staničnih organizama iskoristiti za razjašnjavanje evolucije mehanizma replikacije.

9 Literatura

Aravind L., Leipe D. D., Koonin E. V. (1998): Toprim-a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res* 26: 4205–4213.

Balter M. (2000): Evolution on life's fringes. *Science* 289: 1866–1867.

Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B., Steitz T. A. (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289: 905–920.

Bochman M. L., Schwacha A. (2009): The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 652–683.

Bocquier A. A., Liu L., Cann I. K., i sur. (2001): Archaeal primase: bridging the gap between RNA and DNA polymerases. *Curr Biol* 11: 452–456.

Bohlke K., Pisani F. M., Rossi M., i sur. (2002): Archaeal DNA replication: spotlight on a rapidly moving field. *Extremophiles* 6: 1–14.

Bowman G. D., O'Donnell M., Kuriyan J. (2004): Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp–clamp loader complex. *Nature* 429: 724–30.

Chia N., Cann I., Olsen G. J. (2010): Evolution of DNA replication protein complexes in eukaryotes and Archaea. *PLoS One* 5: e10866.

Chong J. P., Hayashi M. K., Simon M. N., i sur. (2000): A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1530–1535.

Copeland W. C., Wang T. S. (1993): Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of DNA replication. *J Biol Chem* 268: 26179–26189.

Costa A., Ilves I., Tamberg N., i sur. (2011): The structural basis for MCM2–7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nat Struct Mol Biol* 18: 471–477.

Crick F. H. C. (1968): The origin of the genetic code. *J Mol Biol* 38: 367–379.

DePamphilis M. L., Bell S. D. (2011): *Genome Duplication*. Garland Science, London.

Dracheva S., Koonin E. V., Crute J. J. (1995): Identification of the primase active site of the herpes simplex virus type 1 helicase-primase. *J Biol Chem* 270: 14148–14153.

Edgell D. F., Doolittle W. F. (1997): Archaea and the origin[s] of DNA replication proteins. *Cell* 89: 995–998.

Eigen M. (1971): Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58: 465–523.

Filee J., Forterre P., Sen-Lin T., i sur. (2002): Evolution of DNA polymerase families: evidences for multiple gene exchange between cellular and viral proteins. *J Mol Evol* 54: 763–773.

Forterre, P. (1992): New hypotheses about the origins of viruses, prokaryotes and eukaryotes. U: Trân Thanh Vân J. K., Mounolou J. C., Shneider J., Mc Kay C. (ur.) *Frontiers of Life*. Gif-sur-Yvette, Editions Frontières, str. 221–234.

Forterre P. (2001): Genomic and early cellular evolution. The origin of the DNA world. *C R Acad Sci III* 324: 1067–1076.

Forterre P. (2002): The origin of DNA genomes and DNA replication proteins. *Curr Opin Microbiol* 5: 525–532.

Forterre P., Filee J., Myllykallio H. (2004): Origin and evolution of DNA and DNA replication machineries. U: Ribas de Pouplana L. (ur.) *The genetic code and the origin of life*. Texas, Landes Bioscience, str. 145–168.

Freeland S. J., Knight R. D., Landweber L. F. (1999): Do proteins predate DNA? *Science* 286: 690–692.

Glansdorff N. (2000): About the last common ancestor, the universal life-tree and lateral gene transfer: a reappraisal. *Mol Microbiol* 38: 177–185.

Hacker K. J., Johnson K. A. (1997): A hexameric helicase encircles one DNA strand and excludes the other during DNA unwinding. *Biochemistry* 36: 14080–14087.

Johansson E., Macneill S. A. (2010): The eukaryotic replicative DNA polymerases take shape. *Trends Biochem Sci* 35: 339–347.

Joyce, G. F. (2002): The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418: 214–221.

Kato M., Frick D. N., Lee J., i sur. (2001): A complex of the bacteriophage T7 primase-helicase and DNA polymerase directs primer utilization. *J Biol Chem* 276: 21809–21820.

Kelch B. A., Makino D. L., O'Donnell M., i sur. (2011): How a DNA polymerase clamp loader opens a sliding clamp. *Science* 334: 1675–1680.

Kelman L. M., Kelman Z. (2014): Archaeal DNA replication. *Annu Rev Genet* 48: 71–97.

Kilkenny M. L., Longo M. A., Perera R. L., i sur. (2013): Structures of human primase reveal design of nucleotide elongation site and mode of Pol α tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 15961–15966.

Kirk B. W., Kuchta R. D. (1999): Arg304 of human DNA primase is a key contributor to catalysis and NTP binding: primase and the family X polymerases share significant sequence homology. *Biochemistry* 38: 7727–7736.

Kong X. P., Onrust R., O'Donnell M., i sur. (1992): Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69: 425–437.

Koonin E. V., Dolja V. V., Krupovic M. (2015): Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* 479-480: 2–25.

Kornberg A., Baker T. A. (1992): DNA replication. W. H. Freeman, New York.

Krishna T. S., Kong X. P., Gary S., i sur. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79: 1233–1243.

Kruger K., i sur. (1982): Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147–157.

Kuriyan J., O'Donnell M. (1993): Sliding clamps of DNA polymerases. *J Mol Biol* 234: 915–925.

Lao-Sirieix S. H., Pellegrini L., Bell S. D. (2005): The promiscuous primase. *Trends Genet* 21: 568–572.

Lazcano A., Guerrero R., Margulis L., Oro J. (1988): The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *J Mol Evol* 27: 283–290.

LeBowitz J. H., McMacken R. (1986): The Escherichia coli dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem* 261: 4738–4748.

Lee S. J., Syed S., Enemark E. J., i sur. (2014): Dynamic look at DNA unwinding by a replicative helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E827–E835.

Lehman I. R., Boehmer P. E. (1999): Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* 274: 28059–28062;

Leipe D. D., Aravind L., Koonin E. V. (1999): Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic Acids Res* 27: 3389–3401.

Leu K., Obermayer B., Rajamani S., Gerland U., Chen I. A. (2011): The prebiotic evolutionary advantage of transferring genetic information from RNA to DNA. *Nucleic acids res* 39: 8135–8147.

Li N., Zhai Y., Zhang Y., i sur. (2015): Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature* 524: 186–191.

Makarova K. S., Koonin E. V., Kelman Z. (2012): The CMG (CDC45/ RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes. *Biol Direct* 7: 7.

Mat W. K., Xue H., Wong J. T. (2008): The genomics of LUCA. *Front Biosci* 13: 5605–5613.

Matsunaga F., Norais C., Forterre P., i sur. (2003): Identification of short 'eukaryotic' Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep* 4: 154–158.

Moyer S. E., Lewis P. W., Botchan M. R. (2006): Isolation of the Cdc45/ Mcm2–7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 10236–10241.

Mushegian A. R., Koonin E. V. (1996): A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10268–10273.

Nelson D. L., Cox M. M. (2017): *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman, New York.

Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. (2000): The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930.

O'Donnell M., Onrust R., Dean F. B., i sur. (1993): Homology in accessory proteins of replicative polymerases – *E. coli* to humans. *Nucleic Acids Res* 21: 1–3.

Orgel L. E. (1968): Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol* 38: 381–393.

Penny D., Poole A. (1999): The nature of the last universal common ancestor. *Curr Opin Genet Dev* 9: 672–677.

Pluciennik A., Dzantiev L., Iyer R. R., i sur. (2010): PCNA function in the activation and strand direction of MutLa endonuclease in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 16066–16071.

Podobnik M., McInerney P., O'Donnell M., i sur. (2000): A TOPRIM domain in the crystal structure of the catalytic core *Escherichia coli* primase confirms a structural link to DNA topoisomerases. *J Mol Biol* 300: 353–362.

Poole A., Penny D., Sjöberg B. M. (2000): Methyl-RNA: an evolutionary bridge between RNA and DNA? *Chem Biol* 7: R207–R216.

Poole A., Penny D., Sjöberg B. M. (2001): Confounded cytosine! Tinkering and the evolution of DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 147–151.

Singh H., Brooke R. G., Pausch M. H., i sur. (1986): Yeast DNA primase and DNA polymerase activities. An analysis of RNA priming and its coupling to DNA synthesis. *J Biol Chem* 261: 8564–8569.

- Steitz T. A. (1999): DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem* 274: 17395–17398.
- Trakselis M. A., Mayer M. U., Ishmael F. T., i sur. (2001): Dynamic protein interactions in the bacteriophage T4 replisome. *Trends Biochem Sci* 26: 566–572.
- Tye B. K. (1999): MCM protein sin DNA replication. *Annu Rev Biochem* 68: 649–686.
- Villarreal L. P., DeFilippis A. (2000): Hypothesis for DNA viruses as the origin of eukaryotic replication proteins. *J Virol* 74: 7079–7084.
- Watson J. D., Crick F. H. (1953): Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171: 964–967.
- Wing R. A., Bailey S., Steitz T. A. (2008): Insights into the replisome from the structure of a ternary complex of the DNA polymerase III alpha-subunit. *J Mol Biol* 382: 859–869.
- Woese C. R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51: 221–271.
- Woese C. R., Fox G. E. (1977): The concept of cellular evolution. *J Mol Evol* 1: 1–6.
- Yang W., Woodgate R. (2007): What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15591–15598.
- Yao N. Y., O'Donnell M. E. (2016): Evolution of replication machines. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 51: 135–149.
- Zerbe L. K., Kuchta R. D. (2002): The p58 subunit of human DNA primase is important for primer initiation, elongation and counting. *Biochemistry* 41: 4891–4900.
- Zhang S. S., Grosse F. (1990): Accuracy of DNA primase. *J Mol Biol* 216: 475–479.

10 Životopis

Rođena sam 2. svibnja 2001. godine u Zagrebu. Osnovnu školu sam završila u Kastvu, a potom u Rijeci upisala opći smjer Gimnazije Andrije Mohorovičića. 2020. godine upisala sam Preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Studij planiram nastaviti na diplomskom studiju Molekularne biologije. Interesna područja su mi molekularna evolucija i biokemija.