

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije
The initiation of replication without the origin of replication

Studentica: Monika Vrani
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentorica: doc.dr.sc. Ivana Ivančić Baće

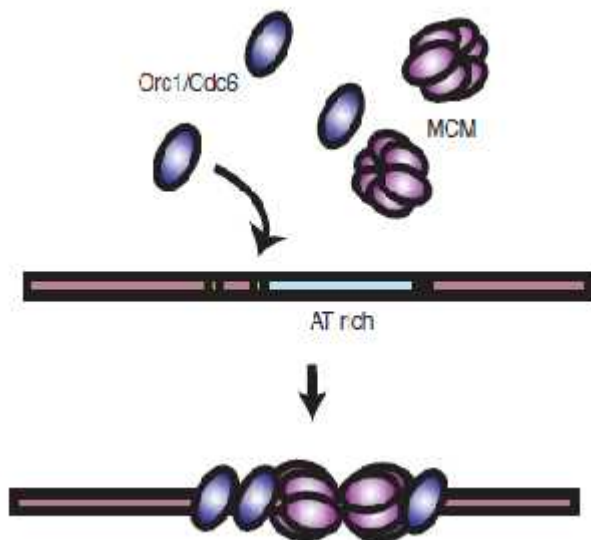
Zagreb, 2014.

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Ishodište replikacije <i>Haloferax volcanii</i>	4
2.1. Karakterizacija dinamike replikacije.....	4
2.1.1. Analiza replikacijskih profila pomoću metode „ <i>deep sequencing</i> “	5
2.1.2. Analiza GC-kosine (<i>engl.</i> GC skew).....	6
3. Test korištenja ishodišta replikacije u laboratorijskom soju H26.....	7
4. Dva moguća mehanizma raspršene inicijacije replikacije	9
4.1. Inicijacija replikacije kod bakteriofaga T4.....	9
4.1.1. Mehanizam inicijacije replikacije ovisan o ishodištu replikacije.....	10
4.1.2. Mehanizam replikacije ovisan o homolognoj rekombinaciji (RDR)	10
4.2.1. Inducirana stabilna replikacija DNA.....	11
4.2.2. Konstitutivna stabilna replikacija DNA	12
4.2.3. Mutanti <i>sdrT</i>	13
5. Uloga proteina RadA u replikaciji DNA u <i>H. volcanii</i>.....	13
6. Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije u arheji <i>Haloferax volcanii</i>.....	14
6.1. Kako se odvija replikacija u mutantima <i>oriC1,2,3,pHV4</i> arheje <i>Haloferax volcanii</i> ?	14
7. Koja je uloga ishodišta replikacije?	15
8. Zaključak	17
9. Literatura	18
10. Sažetak.....	20
11. Summary	21

1. Uvod

Inicijacija replikacije započinje s definiranim mjestima nazvanim ishodišta replikacije što je zajedničko trima domenama života: prokariotima, eukariotima i arhejama. Arheje za inicijaciju replikacije koriste jedno (*Pyrococcus sp.*) ili više ishodišta replikacije (*Sulfolobus sp.*, *Haloarchaea*) [1], dok prokarioti koriste jedno ishodište, a eukarioti više ishodišta. Također, postoje razlike u organizaciji ishodišta replikacije. Osnovna struktura arhealnog ishodišta replikacije evolucijski je sačuvana među arhejama. Tipično uključuje AT-bogatu taljivu regiju (*engl.* AT-rich melting region), tzv. regiju DUE (*engl.* duplex unwinding element) okruženu s nekoliko elemenata ORB (*engl.* origin recognition box), tj. ponavljaju ih invertiranih sekvenci. Elementi ORB bivaju prepoznati od proteina Orc1/Cdc6 ili proteina Orc, a smješteni su pored gena koji kodira za protein inicijator replikacije [1]. Protein Orc homologan je proteinima Orc1 i Cdc6 eukariota pa se smatra da ima ulogu specifičnog prepoznavanja ishodišta replikacije i vezanja helikaze MCM (*engl.* minichromosomal



Sl. 1. Model prepoznavanja arhealnog ishodišta replikacije utemeljen prema arheji *S. solfataricus*. Zelene regije predstavljaju elemente ORB prepoznate proteinima Orc1/Cdc6 kodiranim u genomu *cdc6-1* što dovodi do privlačenja kompleksa MCM na ishodište. Ne zna se da li su dodatni faktori potrebni za ovaj proces [2].

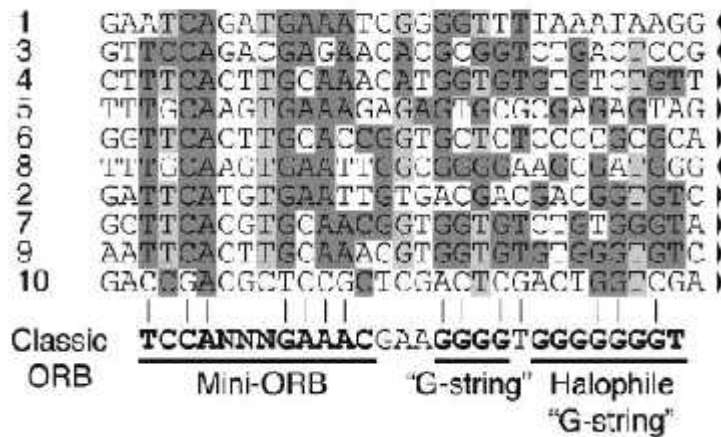
maintenance) na ishodište [1]. Helikaza MCM analogna je helikazi DnaB prokariota koja se pomoću proteina Cdc6 i Cdc1 eukariota, slično funkciji proteina DnaC prokariota, postavlja na ishodište replikacije [1]. Sl. 1. prikazuje model prepoznavanja arhealnog ishodišta replikacije *oriC1* vrste *S. solfataricus* [2]. Ishodište i gen za protein inicijator zajedno čine sustav replikator-inicijator koji je sličan sustavu *oriC-dnaA* kod prokariota, a neki sustavi potječu od ekstrakromosomalnih elemenata [1]. Dakle, arhealna ishodišta replikacije definirana su specifičnim sekvencijskim elementima kao i kod bakterija i kvasca *S. cerevisiae* – jedinog eukariota za kojeg se zna da ima jasno definirana ishodišta replikacije zvana autonomno replicirajuće

sekvence prepoznate kompleksom koji prepoznaje ishodište, tj. kompleksom ORC (*engl.* origin recognition complex) [3]. Kod kvasca *S. pombe* i ostalih viših eukariota ne postoje jasne konsenzus sekvence na mjestu ishodišta replikacije, iako esto znaju biti bogata A i T bazama [3]. Brojna istraživanja replikacijske mašinerije eukariota i arheja pokazala su veliku analogiju izme u te dvije domene života. Navode se i mogu nosti epigenetske kontrole aktivnosti ishodišta kod arheja analogno eukariotima kod kojih je ishodište replikacije više definirano organizacijom kromatina nego DNA sekvencama. Tako se npr. pokazalo da kromatinski proteini Alba i Sul7d roda *Sulfolobus* mogu inhibirati translokaciju helikaze MCM [3], te da je Alba reguliran reverzibilnom acetilacijom [2]. O ito je da struktura arhealnog ishodišta replikacije nalikuje onoj prokariota, dok replikacijska mašinerija nalikuje onoj eukariota.

Do sada su provedena brojna istraživanja alternativnih mehanizama inicijacije replikacije bez upotrebe ishodišta replikacije, ve homolognom rekombinacijom na raspršenim mjestima genoma, najve im dijelom u modelnom organizmu *E. coli*. Takva replikacija kod bakterija naziva se „stabilna replikacija DNA“, pri kojoj nije potrebna sinteza proteina i RNA. Stabilna replikacija normalno je utišana, no aktivira se pod utjecajem SOS odgovora. Popravak lezija u lancu DNA, npr. dvolan anog loma ili zaustavljene replikacijske vilice, zahtijeva koordinaciju aktivnosti mašinerija homologne rekombinacije i replikacije [5]. Osim kod bakterija, inicijacija replikacije cijelog genoma homolognom rekombinacijom odvija se kod faga T4, a molekularni mehanizam detaljno je opisan [6]. Tako er, *Pappiloma* virus [7], *Herpes simplex* virus [8], te *Abutilon* mozai ki virus [9] repliciraju vlastiti genom homolognom rekombinacijom. Nadalje, pretpostavlja se da se mitohondrijska DNA replicira na isti na in kod kvasaca [10] ili uzro nika malarije *Plasmodium* [11-12]. No, nedavno je opisano veliko otkri e u arheji *Haloferax volcanii*. Naime, dokazano je da se inicijacija replikacije u ovoj arheji može odvijati homolognom rekombinacijom i to efikasnije nego s definiranih ishodišta replikacije [13]. U daljnjem radu, detaljno u opisati eksperimentalni pristup provedenog istraživanja i paralelno se nadovezivati na dosadašnja istraživanja vezana za inicijaciju replikacije bez ishodišta replikacije te pokušati predložiti nove ideje vezane za mehanizam replikacije u arheji *Haloferax volcanii*.

2. Ishodište replikacije *Haloferax volcanii*

Halofilna arheja *Haloferax volcanii* ima multireplikonski genom koji se sastoji od glavnog kromosoma, tri sekundarna kromosoma pHV1, pHV3 i pHV4 i plazmida pHV2 [14]. Geni za inicijacijski protein Cdc6/Orc1 koji su smješteni susjedno od ishodišta replikacije, nalaze se u svim replikonima osim na plazmidu pHV2 i djeluju *in trans* na ciljnu autonomno repliciraju u sekvencu u *H. volcanii* [14]. Struktura ishodišta replikacije tipična je za arheje -



Sl. 2. Element ORB me ugenske regije ishodišta replikacije OriC3 *Haloferax volcanii*. Dok je element „G-string“ pronađen u svim ishodištima replikacije, element ORB može sadržavati dodatnu regiju „G-string“ specifičnu za halofile [13].

uvjetima [14]. Vjerojatno postoji hijerarhija ishodišta replikacije, jer kompetiraju za zajedničke replikacijske faktore, zbog čega se ne aktiviraju i ne koriste jednako često [13-14].

2.1. Karakterizacija dinamike replikacije

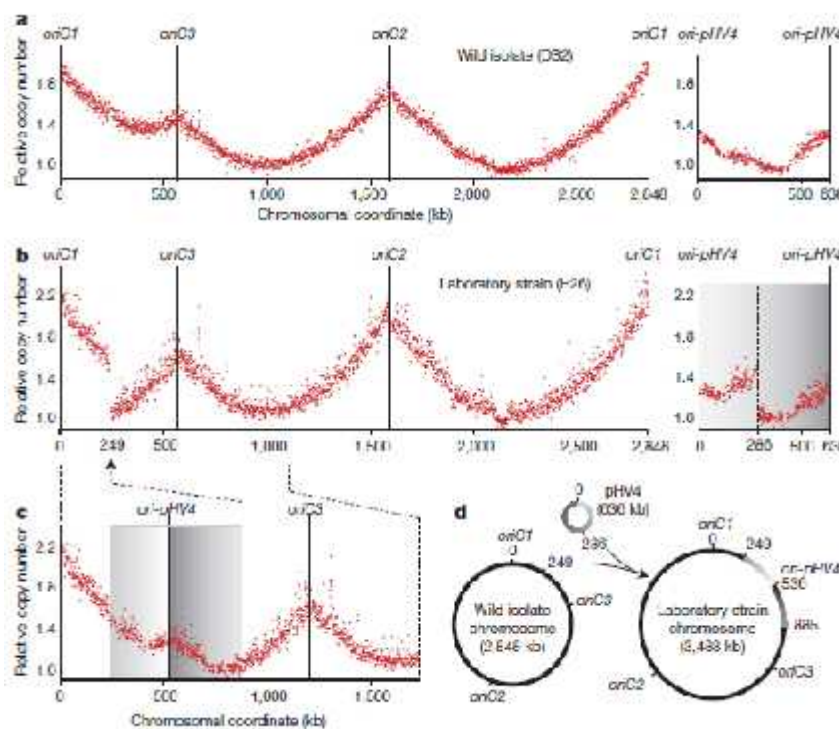
Hawkins et al. (2013.) započeli su istraživanje ishodišta replikacije *H. volcanii* sekvenciranjem genoma soja DS2 divljeg tipa i laboratorijskog soja H26. U svim laboratorijskim sojevima nedostaje pHV2 bez sustava replikator-inicijator [14]. Koristili su metodu sekvenciranja (*engl.* deep sequencing) kojom su dobili replikacijske profile i GC-

elementima ORB. Sl. 2. prikazuje tipičnu strukturu elementa ORB *Haloferax volcanii* [13]. U njemu se nalazi slijed G baza (*engl.* G-string) koji veže protein Cdc6/Orc1 i element mini-ORB koji veže protein inicijator s puno manjim afinitetom [2]. Broj gena koji kodira za proteine inicijatore veći je od broja ishodišta replikacije. Smatra se da neki proteini Cdc6/Orc1 djeluju pod definiranim fiziološkim

kosine (*engl.* GC skew), pomo u kojih su proučavali aktivnost ishodišta replikacije, lokalizaciju ishodišta replikacije i kromosomske rearanžmane. Analizom replikacijskih profila uo ili su novo ishodište replikacije *oriC3* na glavnom kromosomu.

2.1.1. Analiza replikacijskih profila pomo u metode „*deep sequencing*“

Ishodišta replikacije razlikuju se po trenutku aktivacije, što znači da se određene genomske regije repliciraju u karakteristično vrijeme – ranije u fazi S ili pak kasnije u fazi S. Neka ishodišta su aktivna u većini stanica dok su druga „uspavana“ i rijetko se aktiviraju. Pomo u SOLiD (*engl.* Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) sekvenciranja



Sl. 3. Replikacijski profili soja DS2 divljeg tipa i laboratorijskog soja H26 arheje *H. volcanii*. **a**, Replikacijski profil glavnog kromosoma i replikona pHV4 soja DS2 divljeg tipa. **b**, Replikacijski profil laboratorijskog soja H26 napravljen mapiranjem kratkih očitavanja na genom soja DS2 divljeg tipa i replikacijski profil pHV4 iz soja H26. **c**, Kratka očitavanja soja H26 mapirana na rekonstruiranom glavnom kromosomu s integriranim pHV4 replikonom. Sivo osjenjano područje iz **b** naglašava orijentaciju integriranog pHV4 replikona. **d**, Integracija pHV4 replikona u glavni kromosom [13].

može se izmjeriti relativno vrijeme aktivacije replikacije i odrediti smještaj ishodišta u genomu. Potrebno je iz asinkrone stanične kulture odvojiti stanice koje su u fazi S od stanica koje su u fazi G2. Stanice u fazi G2 služe kao referentna kontrola za normalizaciju stanica u fazi S jer se ne repliciraju. Izmjeri se relativni broj kopija svake sekvence pomo u kvantitativnog „*deep*“ sekvenciranja. Kratka očitavanja (*engl.* short reads) mapiraju se prema odgovarajućoj regiji u kromosomu.

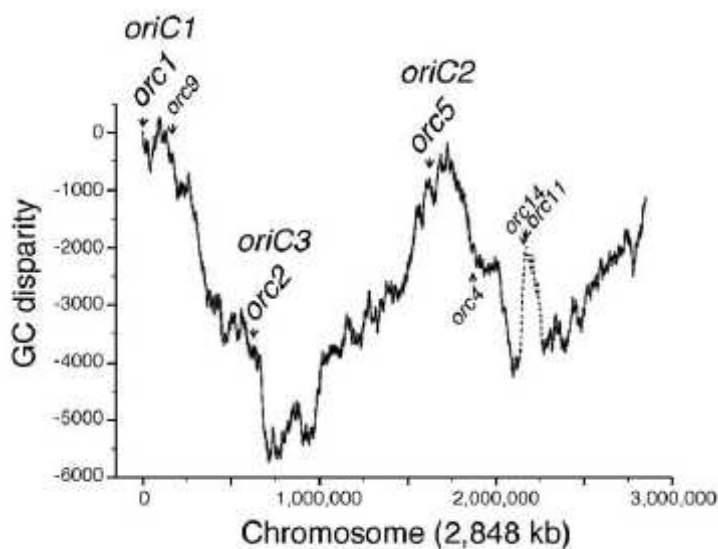
Sekvence koje se repliciraju ranije u fazi S prisutne su u većem relativnom broju kopija nego sekvence replicirane u kasnoj fazi S. Na temelju replikacijskog profila izradi se graf položaja na kromosomu i relativnog broja kopija. Sekvence koje se repliciraju rano pridonose povećanju pika, a one koje se repliciraju kasno pridonose stvaranju udolina na replikacijskom profilu [15].

Sl. 3. prikazuje replikacijske profile soja divljeg tipa i laboratorijskog soja *H. volcanii* [13]. Pikovi relativnog broja kopija predstavljaju sekvence koje su prezastupljene u stanicama koje se repliciraju i definiraju aktivna ishodišta replikacije. Što je pik veći, veći je relativni broj kopija na mjestu ishodišta replikacije, stoga je veća aktivnost ishodišta replikacije. Udolina predstavlja mjesta terminacije replikacije.

Replikacijski su profili soja H12 i mega-plazmida pHV4 diskontinuirani ako se kratka očitavanja mapiraju na referentni genom soja D12 (Sl. 3b). Znatne razlike u vremenu replikacije navode na preuređenje gena [16]. Kontinuirani profil dobiven je mapiranjem kratkih očitavanja na genom s integriranim pHV4 replikonom, što znači da soj H12 ima integrirani mega-plazmid u genom (Sl. 3c). Jasno je da je ishodište replikacije *oriC1* najaktivnije, a ishodište *oriC3* „najuspavanije“.

2.1.2. Analiza GC-kosine (engl. GC skew)

Vode i zaostali lanci bakterijskog i arhealnog genoma razlikuju se po sastavu baza, a veća zastupljenost gvanina u odnosu na citozin u jednoj je obično u vodećim lancima tijekom



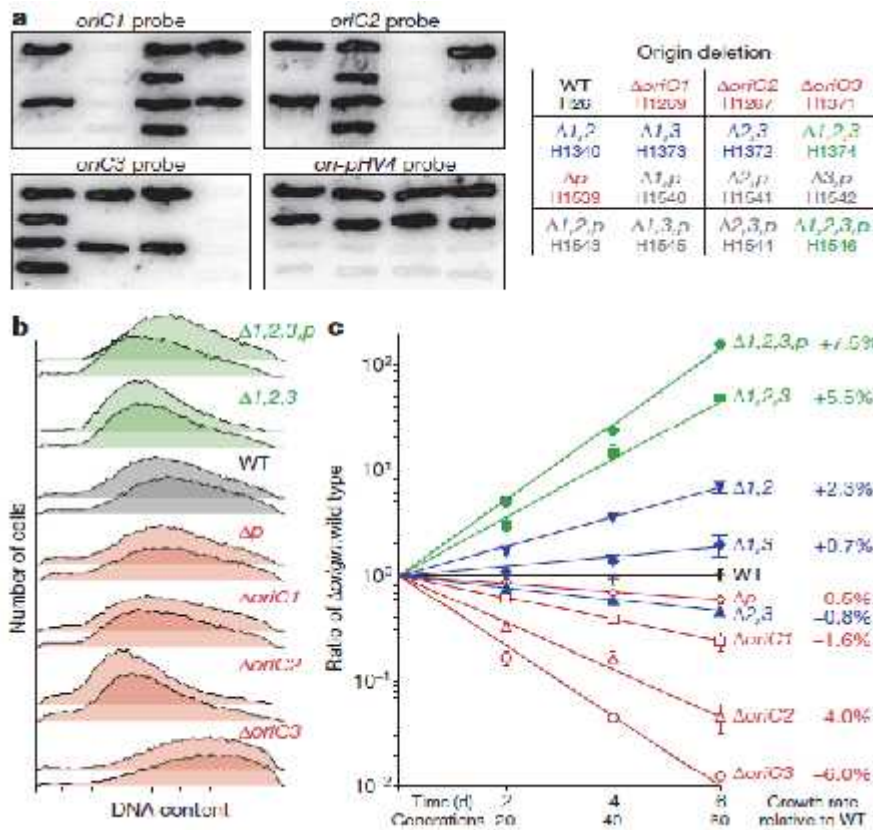
Sl. 4. GC-disparitet glavnog kromosoma soja DS2 divljeg tipa [13].

replikacije [14]. Isprekidane promijene sastava nukleotida koji je specifičan za određeni lanac ukazuju na prisutnost ishodišta replikacije ili terminatora replikacije [14,19]. U haloarhealnom genomu, GC-kosina je obrnuta - vodeći lanac bogat je citozinom, a zaostali lanac bogat je gvaninom [14]. Sl. 4. prikazuje ovisnost GC dispariteta o koordinatama

glavnog kromosoma soja DS2 divljeg tipa [13]. Iz grafa se može iš itati lokalizacija ishodišta replikacije. Mjesto gdje se predznak GC dispariteta mijenja (to ka infleksije) ozna va mjesto ishodišta replikacije. Zbog rijetke aktivacije ishodišta replikacije *oriC3*, nije ga mogu e detektirati metodom GC-kosine. Ishodište je vjerojatno nastalo nedavno ili se gotovo nikada ne koristi [13]. Vjerojatno je nastalo duplikacijom ishodišta *oriC1* ili *oriC2* [14].

3. Test korištenja ishodišta replikacije u laboratorijskom soju H26

Autori su uo ili varijabilnu aktivaciju ishodišta replikacije. Kako bi detaljnije prou ili aktivnost ishodišta testirali su vijabilnost arheja nakon delecija pojedina nih ili kombinacija ishodišta replikacije. Sl. 5. prikazuje karakterizaciju sojeva s deletiranim ishodištima [13].

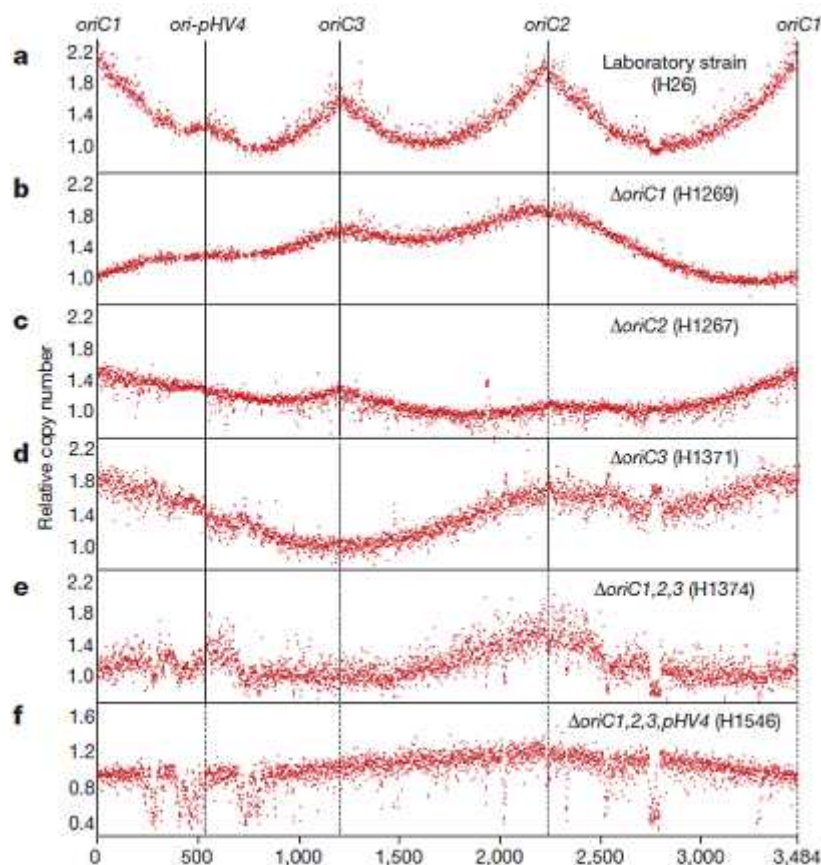


Stanice su ostale vijabilne ak i nakon delecije sva etiri ishodišta replikacije – *oriC1*, *oriC2*, *oriC3* i *ori-pHV4* [13]. Zanimljivo je da je soj bez ijednog ishodišta pokazao ve i sadržaj DNA od divljeg tipa, a sojevi s uklonjenim jednim ishodištem pokazali su neznatne promijene sadržaja DNA [13].

Sl. 5. Karakterizacija sojeva s uklonjenim ishodištima replikacije. a, Delecije ishodišta potvr ene su hibridizacijom sa specifi nim probama koje se vežu za ishodište iz divljeg tipa. **b,** Proto nim citometrom izmjeren je sadržaj DNA u sojevima s uklonjenim ishodištima replikacije. **c,** Test rasta stanica s uklonjenim ishodištima nad divljim tipom (H54, bgaHa⁺) [13].

Delecijom pojedina nih ishodišta stanice rastu slabije od stanica divljeg tipa. Soj kojem nedostaje najslabije aktivno ishodište *oriC3* pokazuje najslabiji rast, a soj kojem nedostaje najaktivnije ishodište *oriC1* pokazuje malo slabiji rast od stanica divljeg tipa. Delecijom sva etiri ishodišta stanice rastu 7,5 % brže od stanica divljeg tipa. Dakle, brzina rasta stanica ve a je što je aktivnost prisutnih ishodišta replikacije manja.

Kako je mogu e da je rast stanica brži što je ishodište replikacije slabije aktivno? Tajna je u helikazi MCM i njezinom afinitetu vezanja na ishodište replikacije o emu je rije na kraju seminara. Ova vrsta arheje pokazuje da ishodišta replikacije, tj. replikacija inicirana s



Sl. 6. Replikacijski profili sojeva s uklonjenim ishodištima replikacije. Usporedba replikacijskih profila laboratorijskog soja H26 (a) s mutantima *oriC1* (b), *oriC2* (c), *oriC3* (d), *oriC1,2,3* (e) i *oriC1,2,3,pHV4* (f) [13].

ishodišta, usporava rast vrste. Kako bi dokazali da se replikacija doga a neovisno o utvr enim ishodištima replikacije, autori su napravili replikacijske profile sojeva s uklonjenim ishodištima, a rezultati su prikazani na Slici 6. Oštri pikovi na replikacijskim profilima prikazuju prava mjesta ishodišta replikacije, a zaobljavanje pika posljedica je inicijacije replikacije na raspršenim mjestima po genomu [13]. Tamo gdje je ishodište uklonjeno, ne pojavljuje se pik. Profil soja *oriC1,2,3* pokazuje zonu koja je oboga ena kopijama DNA oko ishodišta *oriC2*. Budu i da na tom mjestu nema oštrog pika, nema ni „uspavanog“ ishodišta replikacije na što se sumnjalo, jer je kod kvasaca zabilježen slu aj „uspavanih“ ishodišta replikacije [13]. Profili sojeva *oriC1,2,3* i *oriC1,2,3,pHV4* pokazuju inicijaciju replikacije na raspršenim mjestima neovisnima o ishodištima replikacije. Dakle, inicijacija replikacije može se odvijati neovisno od utvr enim ishodišta replikacije s malo ili niti malo mjesne specifi nosti.

4. Dva moguća mehanizma raspršene inicijacije replikacije

Autori su pretpostavili da se inicijacija replikacije događa posredstvom homologne rekombinacije što su naposljetku i eksperimentalno dokazali. Predložili su mehanizam nastanka D-omera ili R-omera kao intermedijera rekombinacije ili transkripcije za inicijaciju replikacije [13]. D-omer nastaje posredstvom proteinskog kompleksa RecBCD i proteina RecA u bakteriji *E. coli*. RecBCD na kraju dvolanane DNA stvarajući 3'-OH jednolanani kraj koji pomoću proteina RecA prodire u homolognu regiju dvolanane DNA i komplementarno se sparuje s jednim od razdvojenih lanaca. Istisnuti lanac strši, a trolanana struktura DNA nalikuje na slovo „D“. R-omer nastaje komplementarnim sparivanjem transkripta RNA s kalupom DNA, a kodiraju i lanac ostaje istisnut. R-omer je obično prepoznata od enzima RNaze H1 u bakteriji *E. coli* pomoću kojeg je uklonjena [5].

U sojevima *oriC1,2,3* i *oriC1,2,3,pHV4* znanstvenici su otkrili zonu obogaenu kopijama DNA u regiji od 2230 kb. Ta je regija blizu ribosomskog RNA (rRNA) operona *rrnB* koji je 6 kb udaljen od ishodišta *oriC2* [13,14] (Sl. 6e, f; 2234-2239 kb). Smatra se da operon *rrnB* sudjeluje u homolognoj rekombinaciji s operonom *rrnA* koji je 200 kb udaljen od ishodišta *oriC1* [14]. Ti isti operoni orijentirani su u suprotnom smjeru od ishodišta replikacije, vjerojatno da bi se izbjegao sudar između replikacijske vilice i transkripcijske rRNA mašinerije [14]. Visoka razina transkripcije DNA povezana je s povišenom razinom homologne rekombinacije [13], zbog čega autori smatraju da ipak D-omer i/ili R-omer olakšavaju inicijaciju replikacije u operonima *rrn*. Takav je način replikacije detaljno opisan kod faga T4 na temelju petnaestogodišnjeg istraživanja [6], a nastanak D-omera i/ili R-omera zabilježen je za vrijeme replikacije inducirane oštećenjem (ili ne) u bakteriji *E. coli* – tzv. „stabilna replikacija DNA“ [5].

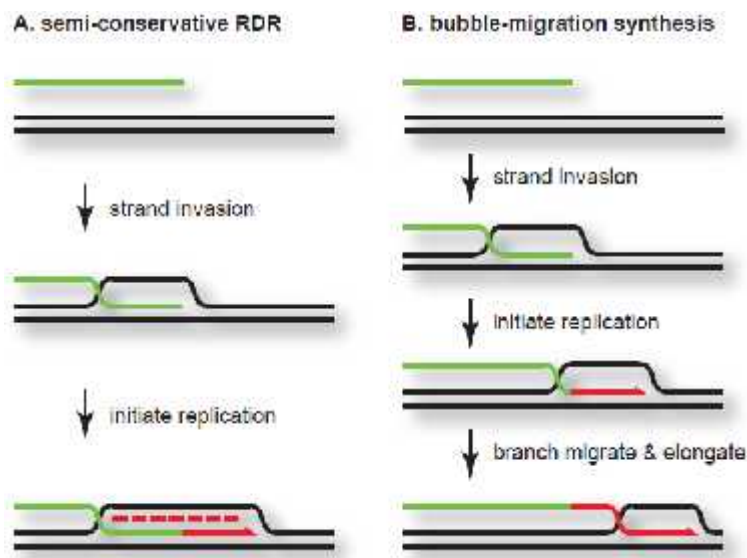
4.1. Inicijacija replikacije kod bakteriofaga T4

Danas postoje jasni dokazi da se inicijacija replikacije kod faga T4 zbiva na specijaliziranim strukturama – tzv. R-omerima, ako se radi o replikaciji ovisnoj o ishodištu replikacije i tzv. D-omerima, ako se radi o replikaciji ovisnoj o homolognoj rekombinaciji. Popravak dvolananih lomova u fagu T4 događa se mehanizmom sličnim onom kod replikacije ovisnoj o rekombinaciji [6]. Koordinirana aktivnost mašinerije homologne rekombinacije i replikacije DNA potrebna je za popravak lezija u lancu DNA, npr.

dvolan anih lomova ili zaustavljene replikacijske vilice. Takva koordinacija ne bi bila moguća bez tzv. „proteina pomaga α “, a kod faga T4 to su UvsY (rekombinacijski medijator) i Gp41/Gp59 (DNA helikaza/translokaza) [20].

4.1.1. Mehanizam inicijacije replikacije ovisan o ishodištu replikacije

Iako sam naslov kaže da fag T4 koristi mehanizam inicijacije replikacije stvaranjem R-om i na ishodištima replikacije, dokazano je da se stvaranje takvih R-om i za inicijaciju replikacije ne mora zbivati na specifičnim sekvencama – sekvencama DUE, već i na heterolognim odmatajućim mjestima. Nadalje, u *in vitro* testu proučavanja mehanizma replikacije faga T4 pomoću R-om i, pokazalo se da ishodišta replikacije nisu potrebna za



Sl. 7. Dva modela replikacije ovisne o rekombinaciji (RDR) kod faga T4. a. Tijekom semi-konzervativne RDR, primaza omogućava sintezu zaostalog lanca na istisnutom lancu unutar D-om e. **b.** Po modelu sinteze u migrirajućim mjehurima, sinteza zaostalog lanca se ne događa, a novosintetizirani je lanac istisnut iza D-om e dok se nova sinteza događa ispred u D-om i [6].

stvaranje om i ve regije DUE, tj. DNA odmatajuće regije [6].

R-om a je signal za stvaranje replisoma. Procesira se RNazom H da bi se stvorio 3'-OH kraj koji bi služio kao početnica za sintezu vodećeg lanca, dok sinteza zaostalog lanca započinje pomoću primaze Gp61 [6].

Postoji mogućnost da su mjesta analogna odmatajućim regijama kod faga T4 također žarišta inicijacije replikacije povezane s transkripcijom kod arheje *Haloferax volcanii*.

4.1.2. Mehanizam replikacije ovisan o homolognoj rekombinaciji (RDR¹)

Replikacija DNA može se inicirati na 3'-OH kraju invazivnog lanca u D-om i nastaloj rekombinacijskom mašinerijom. Sl. 7. prikazuje dva moguća mehanizma replikacije ovisne o

¹ RDR, *engl.* recombination dependent replication, replikacija ovisna o rekombinaciji

rekombinaciji kod faga T4 [6]. RDR mehanizam događaje se nakon što prođe jedan krug replikacije ovisne o ishodištu replikacije i kada na molekulama keri nastanu 3'-OH slobodni krajevi spremni za invaziju u komplementarne regije koje se mogu nalaziti bilo gdje u genomu [6]. Esencijalni proteini za RDR su Gp46/47 (kompleks helikaza/nukleaza koji priprema krajeve DNA za invaziju) i Gp59 (stavlja helikazu Gp41 na D-om u ili na strukturu koja li i na D-om u, tj. na varijabilna replikacijska mjesta uključujući i ishodišta, replikacijske vilice u regijama udaljenima od ishodišta i na rekombinacijske intermedijere) [6,20]. UvsX je analog proteina RecA kojeg UvsY (protein medijator) stavlja na lanac DNA omotan s Gp32 koji je analog proteina SSB (*engl.* single-strand binding protein, protein koji se veže na jednolananu DNA). Budući da proteini UvsX i UvsY nisu esencijalni za odvijanje RDR-a, smatra se da se u nedostatku tih proteina događaje SSA put (*engl.* single-strand annealing, sparivanje jednolanane DNA).

4.2. „Stabilna replikacija DNA“ u bakteriji *E. coli*

„Stabilna replikacija DNA“ (SDR) označava replikaciju u uvjetima kada nije potrebna pratnja sinteza proteina u bakteriji *E. coli*. Takva replikacija u normalnim je uvjetima utišana, a inducira ju SOS odgovor. Tada se replikacija u *E. coli* odvija preko intermedijera D-om e, a takav tip SDR-e naziva se inducirana stabilna replikacija DNA (iSDR). Postoje mutanti *E. coli* koji konstitutivno ekspimiraju SDR i takav se tip replikacije naziva konstitutivna stabilna replikacija DNA (cSDR). Ukoliko divlji tip ekspimirira stabilnu replikaciju DNA bez indukcije SOS odgovora pri prijelazu iz ekspanzijske u stacionarnu fazu rasta, tada se radi o neutralnoj stabilnoj replikaciji DNA (nSDR) [5].

4.2.1. Inducirana stabilna replikacija DNA

Za odvijanje iSDR-e nije potrebna prisutnost ishodišta *oriC*, a ako ono postoji odvija se u njegovoj blizini. Štoviše, aktivnost replikacije pojačana je u odsustvu ishodišta *oriC*. Inducirana je SOS odgovorom ili dvolananim lomom DNA. Zahtijeva aktivni enzim RecA s koproteolitičkom funkcijom (RecA*). Mutant *recD* stimulira iSDR-u, a mutant *recBC* ju blokira nakon SOS odgovora jer je nužna helikazna aktivnost proteinskog kompleksa RecBC. Za aktivnost iSDR-e nužni su helikaza DnaB i primaza DnaG te protein PriA, a protein DnaA nije potreban [5].

SDR može biti aktivirana i bez indukcije SOS odgovora u mutantima *recD* ime se inaktivira nespecifi na nukleazna aktivnost RecBC, uključujući sekvence koja bi utišala nukleaznu aktivnost RecBCD ili pak u mutantima *recBCsbcA* u kojima se uključuje i RecE put, a odvija se preko intermedijera D-om e. Naravno, potreban je dovoljan lom da bi se izvela homologna rekombinacija ili jednostavno procesiranje krajeva dovoljan ane DNA. RDR se u divljem tipu inducira na mjestu gdje je moguće formiranje D-om e – na sekvenci ili oko nje [5].

4.2.2. Konstitutivna stabilna replikacija DNA

Budući da konstitutivna SDR ovisi o transkripciji, događa se preko intermedijera R-om e na mjestima *oriK* (ishodišta do šesnaest puta manje aktivna od ishodišta *oriC*). Ipak, pokazalo se da za cSDR-u nisu potrebna ishodišta jer mutanti prežive. Za aktivnost cSDR-e nužni su enzimi DnaB, DnaG, DnaC i PriA, a posebice protein RecA koji je potreban za homologno sparivanje i izmjenu lanaca te inaktivirana RNaza HI, jer njezina aktivnost osigurava replikaciju s ishodišta *oriC*, a ometa stabilnost početnice u R-om i [5].

Konstitutivna SDR pokazala se aktivnom u mutantima *sdrA*. $SdrA^+$ je represor RNaze HI. Lindahl i Lindahl su pokazali da protein DnaA i ishodište *oriC* nisu potrebni za replikaciju DNA ukoliko se inaktivira enzim RNaza HI te da DnaA štiti početnicu u *oriC* od degradacije RNaz-om HI. Ustanovljeno je da inaktivacija RNaze HI nije nužna za aktivnost iSDR-e, te da njezina aktivnost tijekom SDR-e nije smanjena. Dakle, cSDR nije konstitutivna ekspresija iSDR-e, budući da se iSDR odvija u prisutnosti RNaze HI. Očito je da su iSDR i cSDR potpuno različiti i neovisni mehanizmi inicijacije replikacije u bakteriji *E. coli* [5].

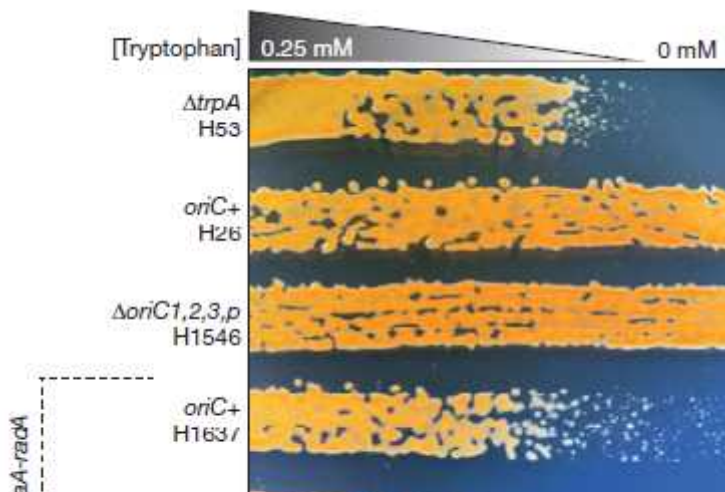
Zanimljivo je napomenuti kako se već ranije uočilo nagomilavanje R-om i na mjestima operona *rrnB* *in vitro* i *in vivo* te da formiranje R-om i uvelike ovisi o sastavu baza - R-om e favoriziraju mjesta bogata purinima. Ustanovljeno je da protein RecG inhibira stvaranje R-om i jer je sposoban ukloniti lanac RNA s hibrida DNA-RNA te da kompenzira nedostatak RNaze HI. Ipak, na temelju dosadašnjih istraživanja, znanstvenici su zaključili da postoji mogućnost da proteini RecG i RNaza HI djeluju na različite tipove R-om i. Nadalje, danas se zna da RNaza HI biva inaktivirana „heat shock proteinima“, tj. šaperonima DnaK, DnaJ i GrpE [5].

4.2.3. Mutanti *sdrT*

Najmanje istraženi mutanti su mutanti *sdrT* u kojima inicijacija replikacije i rast ovisi o aktivnosti proteina RecA, a enzim RNaza HI prisutan je u stanici u koncentraciji jednakoj kao i u divljem tipu. Ne zna se da li mutanti toleriraju deleciju ishodišta *oriC* i inserciju *dnaA::Tn10* [5]. Ovaj mutant ostavlja dovoljno prostora za budu a istraživanja.

5. Uloga proteina RadA u replikaciji DNA u *H. volcanii*

Arhealni protein RadA lan je obitelji rekombinacijskih proteina u koju spadaju protein RecA iz bakterije *E. coli* i protein Rad51 iz kvasca *S. cerevisiae*. RadA je DNA ovisna ATP-aza, a za takvu aktivnost ovog enzima potreban je Mg^{+} , jednolan ana DNA i visoka



Sl. 8. Rekombinaza RadA esencijalna je u mutantu *oriC1,2,3,pHV4*. Gen *radA* stavljen je pod kontrolu inducibilnog promotora kojeg inducira triptofan u sojevima *oriC*⁺ i *oriC1,2,3,pHV4* (H1637 i H1642). Soj H1637 raste sporije u odsutnosti triptofana, dok soj H1642 nije vijabilan jer nema sinteze proteina RadA. Odsutnost triptofana ne utje e na rast kontrolnih sojeva *oriC*⁺ i *oriC1,2,3,pHV4* (H26 i H1546); Soj H53 je triptofanski auktrotrof i služi kao kontrola [13].

temperatura (65-85 °C). Potreban je za sparivanje i izmjenu homolognih DNA lanaca. Po svojstvima je sli niji eukariotskom proteinu Rad51, što pokazuju filogenetske analize i analize sekvenci [20].

Delecijom gena *radA* u *Haloferax volcanii* nastaju mutanti u kojima je nemogu e odvijanje homologne rekombinacije, smanjena je sposobnost popravka DNA i smanjen je rast stanica. Ne ekivano je otkri e u istoimenim mutantima da se plazmid pHV2 ne može replicirati. Dakle, protein RadA je

nužan za replikaciju plazmida pHV2 koji ne sadrži sustav replikator-inicijator. Smatra se da se plazmid replicira replikacijom, budu i da ima sli ne sekvence kao i bakterijski

replikoni te da protein RadA služi za razrješenje multimera [21]. Za razliku od proteina RecA, protein RadA ne sudjeluje u aktivaciji SOS odgovora, ali mu je potrebna koncentracija za vrijeme oštećenja DNA [13,4].

Autori su pokušali ukloniti gen *radA* iz sojeva s uklonjenim ishodištima *oriC*. Nisu mogli ukloniti gen *radA* iz soja *oriC1,2,3,pHV4* pa su zaključili da je rekombinacija esencijalna u odsustvu ishodišta *oriC*. Kako bi potvrdili zaključak stavili su gen *radA* pod kontrolu triptofanskog promotora. Sl. 8. prikazuje rezultate eksperimenta [13]. U odsustvu triptofana, kada je triptofanski promotor utišan, stanice divljeg tipa s inducibilnim genom *radA* rastu sporije, dok stanice bez ishodišta replikacije nisu vijabilne [13].

6. Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije u arheji *Haloferax volcanii*

Rezultati prethodnog eksperimenta potvrdili su da se replikacija cijelog genoma bez ishodišta replikacije odvija rekombinacijom, budući da mutanti *oriC1,2,3,pHV4* s utišanim genom *radA* nisu vijabilni. Da bi pokušali predložiti mehanizam ovakvog tipa inicijacije replikacije, autori su se pozvali na dosadašnja istraživanja. Poznato je da mutanti *oriC* u bakteriji *E. coli* koriste homolognu rekombinaciju da bi inicirali replikaciju genoma, no stanice su pokazale slabiji rast od divljeg tipa [5,13]. Nadalje, takav tip replikacije moguće je jedino u sojevima sa supresorskim mutacijama (npr. u mutantima *sdrA* protein RNaza HI je inaktiviran i ne stabilizira R-omera) [5,13].

U *Haloferax volcanii* nije pronađena niti jedna mutacija RNaze HI, a nema ni dokaza o supresorskoj mutaciji. Štoviše, mutanti *oriC* u *H. volcanii* pokazuju bolji rast od divljeg tipa [13].

6.1. Kako se odvija replikacija u mutantima *oriC1,2,3,pHV4* arheje *Haloferax volcanii* ?

U ljudskim stanicama, u cijelom genomu nedostaju ishodišta replikacije, pokazalo se da se protein ORC1 veže nespecifično po cijelom genomu. To se vjerojatno događa i u arheji *H. volcanii* kada joj nedostaju sva ishodišta replikacije. Vežanjem proteina ORC1 na ishodište replikacije, ORC1 privlači helikazu MCM da se veže na ishodište replikacije. Autori smatraju da je aktivnost ishodišta replikacije proporcionalno ovisna o količini vežanja helikaze MCM

na ishodište replikacije. Također, smatraju da se helikaza MCM oslobađa s ishodišta *oriC* ako se to isto ishodište replikacije ukloni. Tada je helikaza MCM slobodna za vezanje drugdje po genomu gdje je nespecifično vezan protein ORC1. Stoga, ako se ukloni najaktivnije ishodište replikacije, najviše se helikaze MCM oslobađaju i veća se količina helikaze može vezati po genomu na mjestima gdje se induciraju inicijaciju replikacije pomoću rekombinacije. U arheji *Pyrococcus abyssi* helikaza MCM veže se za ishodište replikacije te za regiju koja sadrži gene za rRNA i tRNA. Ta regija postaje glavno vezno mjesto helikaze MCM u stacionarnoj fazi rasta, jer se tada helikaza MCM otko oslobađa s ishodišta replikacije. Opažanje da je rast stanica veći u *H. volcanii* ako sadrži ishodišta slabije aktivnosti, navodi na zaključak da je replikacija ovisna o proteinu RadA uspješnija od replikacije ovisne o ishodištu [13].

7. Koja je uloga ishodišta replikacije?

Nedavno se otkrilo da je *Haloferax volcanii* poliploidna arheja koja u eksponencijalnoj fazi rasta sadrži skoro 20 kopija genoma, a u stacionarnoj fazi rasta sadrži oko 12 kopija kao rezultat gubitka sustava kontrole pravilnog broja kopija genoma [23]. Dakle, divlji tip *Haloferax volcanii* poliploidna je vrsta kod koje je broj kopija genoma reguliran na nivou faze rasta.

Poliploidija je prisutna kod biljaka, gljiva, beskralježnjaka i nižih kralježnjaka, npr. kod riba [24]. Smatra se da su diploidni kralježnjaci nastali redukcijom broja kopija genoma kod poliploida [23]. Poliploidija se može dogoditi i u euploidnim organizmima pod određenim fiziološkim uvjetima ili je uzrok patološki (tumorske stanice) [24]. *Escherichia coli* spontano postaje poliploidan organizam ako raste na siromašnom hranidbenom mediju. U tom slučaju, poliploidija predstavlja prednost jer poboljšava metabolizam vrste [24]. Poliploidija može biti korisna, također, ako stanica sadrži delecije, jer ju štiti od ispoljavanja mutacija [23,24]. No, postoji fenomen letalnosti uzrokovane poliploidijom. To nije, postoje geni koji reguliraju genomsku stabilnost poliploidnog organizma, a ije mutacije su letalne za takav organizam [13,24]. Mutacije u tim genima oslabljuju homolognu rekombinaciju [13,24], koheziju sestrinskih kromatida ili funkciju mitotičkog diobenog vretena [24].

Kao što je slučaj u pupaju em tetraploidnom kvascu [24], tako je i u *Haloferax volcanii* [13] – prirodno poliploidni organizmi strogo ovise o homolognoj rekombinaciji. Mehanizam homologne rekombinacije bitan je kod poliploidne arheje da bi se spriječilo nakupljanje i

nasljeđivanje recesivnih letalnih mutacija [13]. Autori predlažu da poliploidija *H. volcanii* omogućava ubrzan rast sojeva bez ishodišta replikacije [13].

Moguće je da ishodišta replikacije ne nose nikakvu prednost organizmu. Autori predlažu da su ishodišta replikacije sami genetički elementi [13], tj. elementi koji ekspimiraju fenotip koji poboljšava vlastiti prijenos na buduće generacije, a organizam im služi kao „prijevoznik“ [25]. Prema tome, poliploidnost vjerojatno prethodi euploidiji – organizmu je „nametnuto“ ishodište replikacije lateralnim prijenosom gena, a s vremenom se ishodište replikacije uključilo u regulaciju staničnog ciklusa, replikacije, segregacije i stanične diobe [13]. Arheja *Haloferax volcanii* vrši lateralni prijenos gena, a sustav replikator-inicijator [1] pridonosi teoriji samonjih genetskih elemenata, budući da su tako usko povezani sustavi tipični za samonjihne genetske elemente [13]. U potisku je navedeno da sustav replikator-inicijator potječe iz ekstrakromosomalnih elemenata, što se može povezati sa hipotezom po kojoj kromosom doma ina postaje ovisan o ekstrakromosomalnom elementu da bi se mogao replicirati [13].

8. Zaključak

Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije pomoću u homologne rekombinacije ili transkripcije dosada je najpoznatiji mehanizam replikacije kod najjednostavnijih organizama – virusa. Izgleda da su virusi ostali „najotporniji“ na sustav koji nameće u sebi ni genetički elementi – ishodišta replikacije. Zato je potrebno detaljnije proučiti virusni mehanizam replikacije DNA neovisan o ishodištu da bi se mogli shvatiti procesi u složenijim organizmima. Također, istraživanja RDR-e provedena na bakteriji *E. coli* su toliko detaljna i daju pregršt ideja koje bi se mogle primijeniti na ostale organizme.

Otkriće u *Haloferax volcanii* zahtijeva daljnja istraživanja jer postoji velika mogućnost da se inicijacija replikacije odvija preko intermedijera R-om i. Nadalje, smatram da bi mutanti *sdrT* bakterije *E. coli* trebali biti detaljnije proučavani. Imaju veliku sličnost s mutantima *oriC* arheje *H. volcanii* – za replikaciju i rast, uz aktivni protein RNazu HI, potreban je protein RecA, analog proteina RadA. Ne isključuje se mogućnost da je za RDR u *H. volcanii* potrebna mutacija ili utišavanje nekog gena, koji vjerojatno služi za prebacivanje s jednog mehanizma replikacije u drugi.

9. Literatura

1. Zhenfang Wu, Jingfang Liu, Haibo Yang, Hua Xiang (2014). DNA replication origins in archaea. *Frontiers in Microbiology*, **179**:1-7.
2. Nicholas P. Robinson and Stephen D. Bell (2005). Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS Journal*, **272**:3757–3766.
3. Elizabeth R. Barry and Stephen D. Bell (2006). DNA Replication in the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **70**: 876–887.
4. McCready, S. et al. (2005). UV irradiation induces homologous recombination genes in the model archaeon *Halobacterium sp.* NRC-1. *Saline Syst.*, **7**:1-3
5. Kogoma, T. (1997). Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**:212–238
6. Kreuzer, K. N. & Brister, J. R. (2010). Initiation of bacteriophage T4 DNA replication and replication fork dynamics: a review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives. *Virol. J.* **358**:1-16
7. Nozomi Sakakibara, Dan Chen, Alison A. McBride (2013). *Papillomaviruses* Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells. *PLoS Pathog*, **9**:e1003321
8. Dianna E. Wilkinson and Sandra K. Weller (2003). The Role of DNA Recombination in *Herpes Simplex* Virus DNA Replication. *Life*, **55**:451–458
9. Holger Jeske, Martin Lütgemeier and Werner Preiß (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon* mosaic virus. *The EMBO Journal*, **20**:6158-6167
10. Williamson, D. (2002). The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev genet.* **3**:475-81
11. Williamson DH1, Preiser PR, Moore PW, McCready S, Strath M, Wilson RJ. (2002). The plastid DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is replicated by two mechanisms. *Mol. Microbiol.* **45**:533-42.
12. Preiser PR1, Wilson RJ, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MA, Blight KJ, Strath M, Williamson DH. (1996). Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *EMBO J.*, **15**:684-93

13. Michelle Hawkins, Sunir Malla, Martin J. Blythe, Conrad A. Nieduszynski & Thorsten Allers. (2013). Accelerated growth in the absence of DNA replication origins. *Nature*, **503**:544-7
14. Norais, C. et al. (2007). Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genet.* **3**:e77
15. Müller, C. A. & Nieduszynski, C.A. (2012). Conservation of replication timing reveals global and local regulation of replication origin activity. *Genome Res.* **22**:1953–1962
16. Skovgaard, O., Bak, M., Lobner-Olesen, A. & Tommerup, N. (2011). Genome-wide detection of chromosomal rearrangements, indels, and mutations in circular chromosomes by short read sequencing. *Genome Res.* **21**:1388–1393
17. Yuval Benjamini and Terence P. Speed (2011). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* **40**:e72
18. David Sims, Ian Sudbery, Nicholas E. Ilott, Andreas Heger & Chris P. Ponting (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, **15**:121–132
19. McLean MJ, Wolfe KH, Devine KM. (1998). Base composition skews, replication orientation, and gene orientation in 12 prokaryote genomes. *J Mol Evol.* **47**:691-696.
20. Maher RL, Branagan AM, Morrical SW. (2011). Coordination of DNA replication and recombination activities in the maintenance of genome stability. *J Cell Biochem.* **112**:2672-82.
21. Woods, W. G. & Dyall-Smith, M. L. (1997). Construction and analysis of a recombination deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*. *Mol. Microbiol.* **23**: 791–797
22. Lindahl, G., and T. Lindahl. (1984). Initiation of DNA replication in *Escherichia coli*: RNase H-defective mutants do not require the *dnaA* function. *Mol. Gen. Genet.* **196**:283–289.
23. Breuert, S., Allers, T., Spohn, G. & Soppa, J. (2006). Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS ONE*, **1**:e92
24. Storchova, Z. et al. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, **443**:541–547
25. Werren JH. (2011). Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proc. Natl. Acad.*, **108**:10863-70

10. Sažetak

Inicijacija replikacije DNA započinje s definiranih ishodišta replikacije, što je zajedničko trijema domenama života – prokariotima, eukariotima i arhejama. Ishodišta se među domenama razlikuju po broju i strukturi, kao i po mašineriji koja upravlja njome. Virusi, također, iniciraju replikaciju vlastitog genoma s definiranih ishodišta, iako su vrlo zastupljeni alternativni mehanizmi inicijacije – homolognom rekombinacijom ili transkripcijom. Cilj je ovog seminara bio upoznati se s eksperimentalnim pristupom proučavanja dinamike replikacije i karakterizacije ishodišta replikacije, a ponajviše upoznati se s alternativnim načinom inicijacije replikacije u kompleksnijem organizmu od virusa. To su arheje – organizmi strukturno slični prokariotima, a po molekularnoj mašineriji slični eukariotima. Pokazalo se da inicijacija replikacije u mutantima *oriC* arheje *Haloflex volcanii* kao i vijabilnost stanice ovisi o proteinu RadA, koji je uključen u popravak oštećenja DNA homolognom rekombinacijom te u inicijaciju replikacije citavog genoma stanice. Stoga, potrebna su dodatna istraživanja replikacijske mašinerije uključene u ovakav mehanizam replikacije. Također, nužno je proučiti strukturu regija DNA na kojima je moguće stvaranje D-omera ili R-omera koje su zamjena izvorištima replikacije. Nadalje, upitna je svrha postojanja ishodišta replikacije, budući da stanice *Haloflex volcanii* pokazuju bolji rast kada ne sadrže ishodišta u genomu. Velika je vjerojatnost da su ishodišta sebi ni genetski elementi koji su kroz evoluciju preuzeli kontrolu nad prethodno poliploidnim organizmima.

11. Summary

The initiation of DNA replication begins at defined origins of replication, which is common across the three domains of life - prokaryotes, eukaryotes and archaea. Origins differ across the domains in number and structure, as well as in the machinery that controls it. Viruses also initiate replication of the genome using its own defined origins, although alternative mechanisms of initiation are highly represented - homologous recombination or transcription. The aim of this seminar was to become acquainted with the experimental approach of studying the dynamics of replication and characterization of the origin of replication, and mostly to become familiar with alternative ways of initiation of replication in more complex organism than viruses. These are archaea – organisms which are structurally similar to prokaryotes, and which are, by the molecular machinery, similar to eukaryotes. It has been shown that the initiation of replication in *oriC* mutant of *Haloferax volcanii*, as well as the viability, depended on the RadA protein which is involved in DNA damage repair by homologous recombination. This suggested that the initiation of replication was stimulated by recombination. Additional research of the DNA replication machinery involved in this mechanism of replication is required. Also, it will be necessary to analyze the DNA regions where D-loop or R-loop could be created. Furthermore, the purpose of existence of the origin of replication is questionable, since *Haloferax volcanii* cells showed better growth without origins of replication. It is very likely that the origins of replication are selfish genetic elements that took control of previously polyploid organisms throughout the evolution.