

Struktura i ekspresija gena za proteine Rad51 i Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula*

Šimatović, Ana

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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:933768>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Šimatović

**Struktura i ekspresija gena za proteine Rad51 i Rad51D
iz morske spužve *Suberites domuncula***

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Helene Etiković predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Zahvala

Ponajprije se iskreno zahvaljujem dr. sc. Heleni etkovi koja mi je omoguila izradu diplomskog rada u Laboratoriju za molekularnu genetiku Instituta Ruđer Bošković i priliku za stjecanje novih znanja i vještina. Zahvaljujem na korisnim savjetima, usmjeravanju i strpljenju tokom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dipl. ing. Mirni Imešek i ostalim članovima Laboratorija za molekularnu genetiku koji su mi pomagali pri provedbi eksperimentalnog dijela rada i tokom njegovog pisanja.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji, mami i baki, koje su mi uvijek pružale podršku i tokom izrade diplomskog rada i tokom cijelog studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Struktura i ekspresija gena za proteine Rad51 i Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula*

ANA ŠIMATOVIĆ

Institut "Ruđer Bošković", Laboratorij za molekularnu genetiku,
Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Proteini od interesa, Rad51 i Rad51D, imaju vrlo važnu ulogu kod sisavaca u održavanju integriteta genoma. Postojanje ovih proteinova utvrđeno je i kod drugih kralježnjaka, te kod beskralježnjaka. Modelni organizam, morska spužva *Suberites domuncula* pripada koljenu Porifera, najstarijim danas živu im mnogostani drugi organizmima, i stoga je vrlo zanimljiva za istraživanje evolucijskih uvanja gena/proteina. Metodama umnožavanja DNA lanac anom reakcijom polimeraze i određivanja slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksimetodom utvrđen je nukleotidni slijed gena *rad51* i *rad51D* te položaj introna. Pomoći u algoritma BLAST i programa Clustal X i GeneDoc uspoređene su dobivene proteinske sekvene s njihovim ortologozima u drugim organizmima. Proteinske sekvene i položaj introna otkrivane pokazuju veću homologiju s ortologozima iz kralježnjaka, nego iz beskralježnjaka. Gen *rad51D* ukloniran je u ekspresijski vektor kojim su transformirane stanice BL21. Nedovoljna koncentracija proteina se zadržava u topljivoj fazi, većina odlazi u talog gdje se agregira u obliku inkluzijskih tijela.

(90 stranica, 35 slika, 7 tablica, 78 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: spužva, *Suberites domuncula*, Rad51, Rad51D, introni, evolucija

Voditelj: dr. sc. Helena Četković

Ocenitelji: dr. sc. Mirjana Kalafatić, prof.

dr. sc. Maja Matulić, doc.

dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, doc.

Rad prihvoren: 01. srpnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Structure and expression of genes for proteins Rad51 and Rad51D from marine sponge *Suberites domuncula*

Ana Šimatovi

Institute "Ruđer Bošković", Laboratory for Molecular genetics,
Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

The proteins of interest, Rad51 and Rad51D play a very important part in maintaining mammalian genome integrity. The existence of these proteins was detected in other vertebrates, as well as in invertebrates. The model organism, marine sponge *Suberites domuncula* belongs to the phylum Porifera, the oldest living Metazoa. Therefore, the study of its genes/proteins that have been conserved through evolution is very interesting. Polymerase chain reaction for multiplying DNA and Sanger dideoxynucleotide sequencing method were used in order to determine the nucleotide sequence for genes *rad51* and *rad51D* and their intron position. Using BLAST searches of GenBank database and Clustal X and GeneDoc programmes, the obtained protein sequences were compared to their orthologs in other organisms. As expected, the protein sequences and intron position show more homology with their vertebrate orthologs than with their invertebrate orthologs. The *rad51D* gene was cloned into the expression vector which was used to transform BL21 cells. Insufficient protein concentration is contained in the supernatant, due to the fact that most proteins sediment and aggregate to form inclusion bodies.

(90 pages, 35 figures, 7 tables, 78 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library.

Key words: sponge, *Suberites domuncula*, Rad51, Rad51D, introns, evolution

Supervisor: dr. sc. Helena Četković

Reviewers: dr. sc. Mirjana Kalafatić, Prof.

dr. sc. Maja Matulić, Doc.

dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, Doc.

Thesis accepted: 01. July 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Spužve	1
1.1.1. Op a obilježja.....	1
1.1.2. Osnovni plan gra e tijela.....	2
1.1.3. Razmnožavanje i embrionalni razvoj	4
1.1.4. Filogenija.....	4
1.1.6. Obilježja genoma.....	6
1.2. Rad 51 i njegovi paralozi	7
1.2.1. Rad51 je homolog proteina RecA	7
1.2.2. Uloga Rad51 i njegovih paraloga u stanici	9
1.3. Introni	11
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
2.1. HIPOTEZA	14
2.2. CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJAL I METODE.....	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Pokusni organizam	15
3.1.2. Osnovne kemikalije.....	16
3.1.3. Osnovne puferske otopine	17
3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline.....	17
3.1.5. Plazmidi.....	18
3.1.6. Proteini i enzimi	18
3.1.7. Boje	18
3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija.....	18
3.1.9. Bakterijski sojevi.....	19
3.1.10. Ostali materijali	19
3.2. Metode	20
3.2.1. Izolacija ukupne DNA iz spužve <i>Suberites domuncula</i>	20
3.2.2. Umnožavanje DNA lan anom reakcijom polimeraze (PCR).....	21
3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	24
3.2.4. Izolacija DNA iz agarognog gela	25
3.2.5. Odre ivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom	25
3.2.6. Stvaranje rekombinantne DNA	29
3.2.7. Transformacija bakterijskih stanica.....	33
3.2.8. Izolacija plazmidne DNA	34

3.2.9. Indukcija ekspresije gena	35
3.2.10. Pro iš avanje proteina.....	36
3.2.11. Bioinformati ka obrada.....	45
4. REZULTATI.....	46
4.1. Pretraživanje cDNA biblioteke	46
4.2. Izolacija genomske DNA	47
4.3. Analiza nukleotidnih sljedova cDNA koje kodiraju za proteine Rad51 i Rad51D	48
4.3.1. Rad51.....	48
4.3.2. Rad51D.....	55
4.4. Odre ivanje nukleotidnog slijeda i položaja introna u genima <i>rad51</i> i <i>rad51D</i>	61
4.5. Stvaranje rekombinantne DNA i ekspresija gena za protein Rad51D	68
4.6. Western analiza proteina	72
5. RASPRAVA.....	73
6. ZAKLJU CI.....	80
7. LITERATURA.....	82

1. UVOD

1.1. Spužve

1.1.1. Op a obilježja

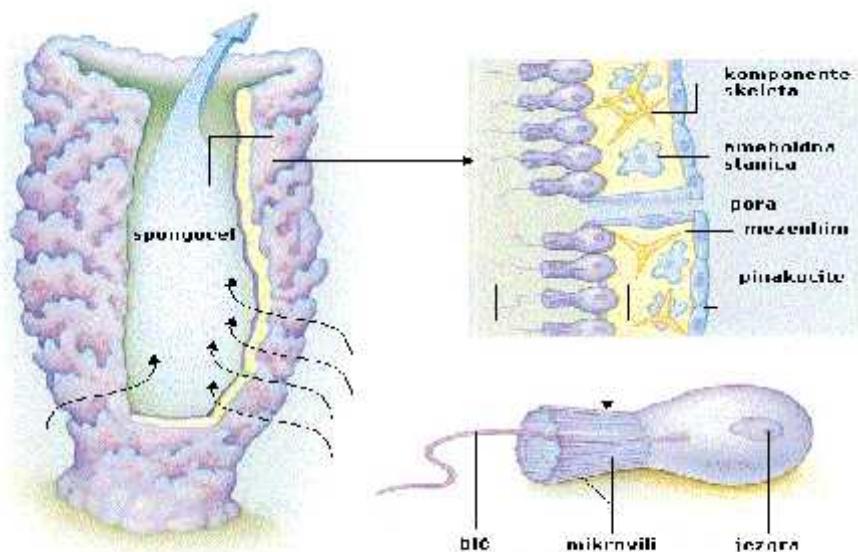
Spužve, koljeno Porifera, su najstarije žive e koljeno Metazoa. Sesilni su organizmi, gra eni od mnoštva pora i kanala koji ine sustav za filtriranje i prehranu što je u skladu s njihovim sjedila kim na inom života (Hickman i sur. 2000).

Poznato je više od 5000 vrsta spužvi koje žive u moru i oko 150 vrsta koje žive slatkim vodama. Ve inom su kolonijalne, variraju u veli ini od nekoliko milimetara pa i do dva metra. Manji broj je radijalno simetri an, redovito one manje, dok je ve ina ipak nesimetri na i razgranjena. U površinskim, ali i u ostalim dijelovima tijela nalaze se razli iti pigmenti pa postoje i naran asto, crveno, žuto, zeleno ili ljubi asto obojene spužve (Matoni kin i sur. 1998).

Mnoge životinje žive kao komenzali ili paraziti na ili u spužvama, jednostani ne alge i bakterije nalaze se u velikim koli inama u mezenhimu nekih spužava. S druge strane spužve žive na drugim životinjama: na hidrama, školjkašima, koraljima i ramenonošcima. Mnogi rakovi, koluti avci, li inke kukaca i druge životinje služe se spužvama kao zaklonom (Pechenik 2000).

1.1.2. Osnovni plan gra e tijela

Kod spužvi kao posebnog organizacijskog tipa Metazoa nije došlo do razvoja tkiva, organa i organskih sustava ve životne funkcije obavljaju specijalizirane stanice.



Slika 1. Shematski prikaz funkcionalne gra e spužvi. Preuzeto s www.trc.ucdavis.edu.

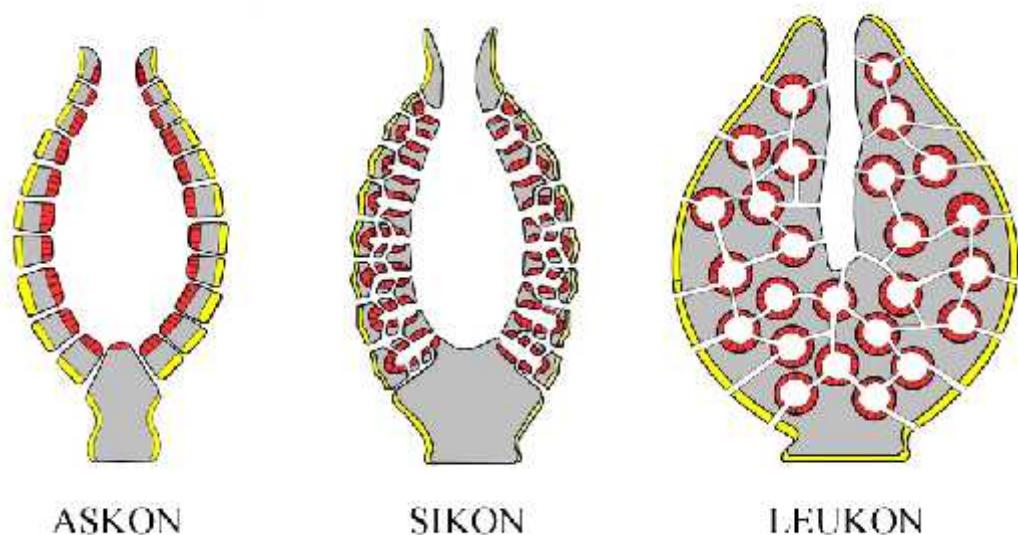
Imaju nekoliko tipova stanica koje su uklopljene u želatinozni matriks-mezenhim:

- pinakocite su epitelne plosnate stanice koje prekrivaju vanjsku površinu i dio unutrašnjosti. Rubovi nekih pinakocita mogu se stezati i rastezati i na taj na in regulirati veli inu površine.
 - porocite su stanice sli ne cjev icama, prostiru se od vanjske površine do spongocela.
 - hoanocite su stanice jednim dijelom pri vrš ene za mezenhim, a drugim slobodno strše u spongocel. Slobodni dio ima bi koji je okružen ovratnikom gra enim od mikrofibrila. Bi em stvaraju struju vode koja estice nosi prema ovratniku gdje se filtriraju.
 - arheocite su ameoboidne stanice koje obavljaju mnoštvo funkcija i mogu se razviti u specijaliziran tip stanica: skleroblasti (prema vrsti skeleta koji izgra uju razlikuju se: kalkoblasti, silikoblasti i spongoblasti), miociti, kromociti i spolne stanice.
- Skelet je gra en od iglica (spikula) razli itog oblika i mineralnog sastava ili bjelan evinastih vlakanaca (spongina) (Matoni kin i sur. 1998; Hickman i sur. 2000).

Život spužve ovisi o struji vode koju stvaraju hoanocite. Struja vode donosi im hranu i kisik, a odnosi metabolički otpad. Hrane se prenose veličine od 0,1 do 50 µm. Prehrana se sastoji od bakterija, algi, protista i različitih suspendiranih organskih restica (Miller i Harley 1999).

Strukturalno najjednostavnije spužve su askonoidnog tipa. Voda kroz mnogobrojne pore na površini ulazi u veliku šupljinu, spongocel, obloženu hoanocitima. Na kraju se izbacuje kroz jedan veliki otvor, oskulum. Askonoidni plan građe nije dovoljno uspješan u pokretanju vode kroz spongocel stoga su spužve tog tipa građe redovito malene. Tijekom vremena došlo je do razvoja oblika koji povećavaju protok vode kroz spongocel i imaju povećanu površinu dostupnu za prikupljanje hrane.

Spužve kod kojih je nabiranje stjenke tijela još jednostavno nazivaju se sikoidne spužve. Vodu primaju dolaznim kanalima koji se granaju u radikalne kanale obložene hoanocitama. Radikalni kanali se ulijevaju u spongocel, obložen epitelnim stanicama. Najveći stupanj nabiranja postignut je kod leukonoidnih spužava. To je najsloženiji tip i najbolje adaptiran za povećanje veličine spužve. Tu je potpuno nestala radikalna simetrija, a oblik spužve je nepravilan. Spongocel je nestao, a voda se filtrira u bistim komoricama.



Slika 2. Tri osnovna oblika spužvi, prema unutrašnjoj građi i rasporedu unutrašnjih prostora. Preuzeto s www.zipcodezoo.com.

1.1.3. Razmnožavanje i embrionalni razvoj

Spužve se razmnožavaju spolno i nespolno. Djelomično su dvospolci, djelomično razdvojenog spola. Nespolno se razmnožavaju fragmentacijom, imaju veliku moć regeneracije, i unutrašnjim pupanjem primjerice stvaraju rasplodna tijela koja nazivamo gemule. Spolne stanice nastaju iz amebocita, ali i iz hoanocita. Oplodnja je unutrašnja, što je odvedena osobina za ovo koljeno koje se smatra jednostavnim, ili rječice vanjska.

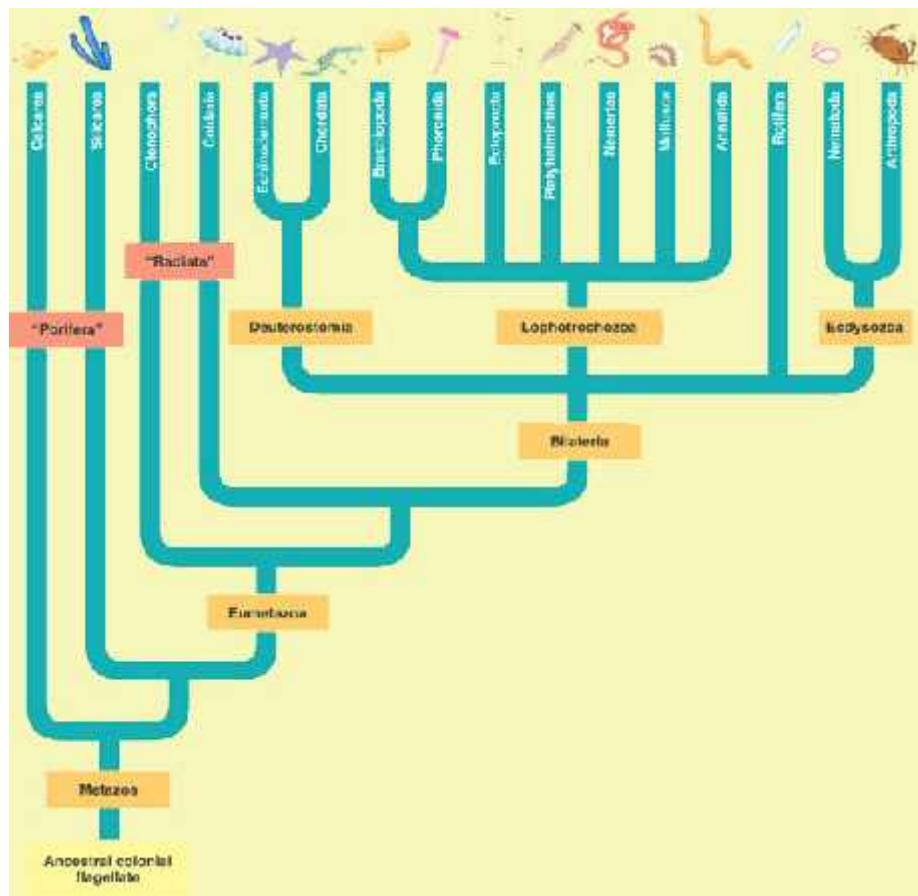
U embriogenezi spužve poznate su dvije vrste lili ink. Kod liliinke amfiblastule tretpetljikave stanice predodrene za razvoj sloja hoanocita nalaze se na jednom njenom kraju. Kod najveće dijela spužava unutrašnjost blastule je mnogobrojnim dijeljenjima stanica potpuno ispunjena, pa se takva liliinka naziva parenhimula (Habdia i sur. 2004).

1.1.4. Filogenija

Mnoštvo fosilnih podataka datira iz kambrija, a neki smatraju da su spužve bile prisutne i u prekambriju. Do njihovog ubrzanog razvoja dolazi u razdoblju devona.

Zbog specifične organizacije, diferencijacije stanica i embriogeneze, njihova je sistematika složena. Često su smatrane prijelaznim koljenom između Protostista i Metazoa. U brojnim sistematskim odvojenjem su od ostalih Metazoa u skupinu pod nazivom Parazoa ili Archaemetazoa. Mnogi znanstvenici smatraju da su se spužve razvile iz okovratnih生物. Neki se protive toj hipotezi jer se okovratna struktura javlja kasnije u embriološkom razvoju spužve. Vanjske stanice larve imaju bićeve, ali ne i ovratnike. One postaju hoanocite tek kada dođu u unutrašnjost (Hickman i sur. 2000).

Sekvenciranjem ribosomske RNA dobiveni su podaci koji podupiru hipotezu zajedničkog pretka Metazoa i okovratnih生物. Pretpostavlja se da spužve i Eumetazoa imaju zajedničkog pretka koji se naziva *Urmetazoa*, ali su se spužve odvojile ranije. Novija istraživanja pokazuju da s višim koljenima dijele osnovne receptor-ligand sustave, posebice one vezane za izgradnju tijela i imunološko prepoznavanje (Hickman i sur. 2000).



Slika 3. Filogenetski položaj koljena Porifera.

Preuzeto s www.biology.lsu.edu.

1.1.5. Biološka raznolikost spužvi, klasifikacija

Danas živu e vrste možemo svrstati u tri razreda. Podjela se temelji velikim dijelom na kemijskom sastavu i morfologiji potpornih elemenata.

Demospongia- kremenorožnja e

Najve i razred koji obuhva a oko 80% vrsta. Nalazimo ih na svim dubinama i na razli itim površinama. Prvi put se javljaju u kambriju. Spikule su uglavnom gra ene od silicija i povezane nitima spongina. Naj eš e su svjetlo obojene. Površina je meka, elasti na, ali tako er može biti lomljiva ili vrsta. Ve inom su leukonoidnog tipa gra e, variraju u obliku. Ovoj skupini pripadaju i slatkovodne spužve zastupljene porodicom *Spongillidae*.

Hexactinellida- stakla e

Ovo je razred dubokomorskih spužvi. Skelet je gra en od šesterozrakastih silicijevih iglica. Neobi ne su zbog svog sincijalnog tipa tkiva. Sikonoidnog su ili leukonoidnog oblika. Uglavnom su bijedo žute do bijele boje. Najstariji ostaci mnogostani nih organizama upravo su spikule ove porodice iz perioda kasnog proteozoika.

Calcarea- vapnenja e

Skelet vapnenja a sastavljen je od spikula gra enih od kalcijeva karbonata. Ovdje su uklju ena sva tri gra evna plana spužava: askonoidni, sikonoidni i leukonoidni. Uglavnom su male, od nekoliko milimetara do 30 cm, raznih su oblika. Sve vrste su morske (Hutchins i sur. 2003).

1.1.6. Obilježja genoma

Sve nukleinske kiseline, kod koljena Porifera, vrsto su povezane s polisaharidima i takvi kompleksi ine više od 23-92 mg/10 g žive tvari (Matoni kin i sur. 1998). Veli ina haploidnog genoma morskih spužvi *Suberites domuncula* i *Geodia cydonium* je otprilike 1,7 pg, što odgovara 1670 Mb (Imsiecke i sur. 1995). To je u rangu s nekim kralježnjacima, na primjer *Gallus domesticus* ima veli inu genoma 1200 Mb, a *Cyprinus carpio* 1700 Mb. Za usporedbu, veli ina ljudskog haploidnog genoma je 3400 Mb (Li i Graur 1991). Genom spužve sadrži oko 30 000 gena.

Introni su vrlo kratki, ve ina ih pripada u razred introna veli ine 0, 1 – 2 kb. Do sada nisu prona eni introni ve i od 5 kb (Müller W. E. G. 2003).

Fahey i sur. (2008) su usporedbom nekodiraju ih regija (nekada zvane engl. junk DNA) kod spužve *Amphimedon*, žarnjaka *Nematostella vectensis* i nekoliko drugih bilaterija, razli ite veli ine genoma, uo ili kako geni kod vrste *Amphimedon* imaju izrazito kra e sljedove izme u gena u odnosu na druge prethodno spomenute vrste. Nikakve druge ve e razlike kod regulatornih gena koje su prou avali nisu uo ene. To je dovelo do pretpostavke kako je upravo ta razlika u duljini nekodiraju e regije klju na za razlike u ekspresiji regulatornih gena koje su uo ene tijekom embriogeneze. Takve podatke dobili su i Breter i sur. (2003) za genome spužvi *Suberites domuncula* i *Geodia cydonium*, iji se genom

tako er sastoji od klastera tjesno poredanih gena, što upu uje da je to možda zajedni ka osobina genoma kod Demospongia.

Poznato je kako su funkcije proteina visoko konzervirane od spužvi do protostomi nih/deuterostomi nih organizama. Takav primjer su i integrini i adhezijske molekule (Wimmer i sur. 1999), te stresom inducirani enzimi i neke protein kinaze (Böhm i sur. 2001). Spužve posjeduju transkripcijiske faktore i signalne putove iji ortolozi imaju ulogu u genskoj regulaciji embriogeneze kod bilateralnih organizama (Davidson, 2006). Taj set regulatornih gena morao je nastati prije divergencije linija iz koje su se zatim razvile spužve, odnosno Eumetazoa.

Gamulin i sur. (2000) usporedili su 42 filogenetski o uvana proteina iz etiri morske spužve sa setom proteina iz *Caenorhabditis elegans* i ovjeka. Ve ina proteina je izrazito sli nija ortolozima kod ovjeka nego kod *Caenorhabditis elegans*, iako su se spužve prve odvojile od zajedni kog pretka, i to prije 580 milijuna godina. Spužve, kao i sisavci, imaju nižu stopu promjene proteinske sekvene tijekom evolucije u odnosu na vrste *Drosophila melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*.

1.2. Rad 51 i njegovi paralozi

1.2.1. Rad51 je homolog proteina RecA

Sve stanice u organizmu podložne su djelovanju endogenih i egzogenih mutagena koji ošte uju DNA. Me u najopasnijim ošte enjima su dvolan ani lomovi (van Gent i sur. 2001). Nakupljanje takvih ošte enja vodi ka promijenjenoj funkciji stanica, onkogenezi ili stani noj smrti, stoga su sustavi za popravak DNA vrlo važni za preživljavanje stanica (Thompson i Schild 2002). Kako ovaj tip ošte enja poga a oba lanca, DNA osobito je težak za popravak. Rekombinacija s homolognim slijedom DNA u neošte enom kromosomu osigurava mehanizam za popravak kojim ne e do i do nastanka delecija, supsticije baza, translokacija ili insercija. Osim za popravak ošte enja, homologna rekombinacija klju na je za stvaranje geneti ke raznolikosti, koja je osobito važna s evolucijskog stajališta (Thacker 1999; Cooper i Hausman 2004).

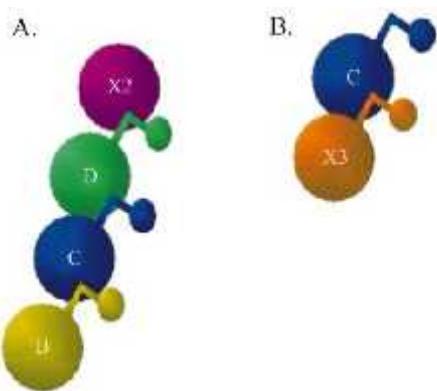
Kod bakterija centralnu ulogu u homolognoj rekombinaciji ima protein RecA koji katalizira invaziju lanca i njihovu izmjenu u ranoj fazi homologne rekombinacije (Cox i Lehman 1982; West i sur. 1981). Kod eukariota strukturalni i funkcionalni homolog proteina RecA je protein Rad51 (West 2003). Lanovi ove obitelji o uvanici su kod svih organizama, od bakterija do sisavaca, što ukazuje na njihovu esencijalnu ulogu u procesu homologne rekombinacije (Brendel i sur. 1997). Eukariotski RecA homolozi prvi put su otkriveni kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Shinohara i sur. 1992).

Homolog RecA otkriven je i kod halofilnih i termofilnih arheja (Sandler i sur. 1996). Za razliku od eubakterija, arhebakterije imaju dva proteina koji se nazivaju RadA i RadB (DiRuggiero i sur. 1999; Komori i sur. 2000). Kod ovjeka i kod drugih viših eukariota je do danas uz Rad51 otkriveno još pet njegovih paraloga: Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3. Svaki od tih paraloga pokazuje određenu razliku u odnosu na Rad51, ali svi imaju domenu kojom se vežu za oštete DNA i Walker A i B motive, domene za vezanje i hidrolizu ATP-a (Albala i sur. 1997; Dosanjh i sur. 1998; Liu i sur. 1998; Pittman i sur. 1998). Najvjerojatnije su nastali od zajedničkog gena pretka, a zatim je došlo do diferencijacije u njihovoj funkciji (Kawabata i sur. 2005).

Paralozi se javljaju u obliku dva različita kompleksa koji pomažu Rad51 u izmjeni lanaca tokom homologne rekombinacije:

- Rad51B-Rad51C-Rad51D-Xrcc2 (BCDX2)
- Rad51C-Xrcc3 (CX3)

(Masson i sur. 2001; Liu i sur. 2002)



Slika 4. Građa kompleksa BCDX2 (A) i CX3 (B) koji sudjeluju u procesu homologne rekombinacije. Preuzeto od Masson i sur. 2001; Liu i sur. 2002.

Promjene u funkciji Rad51 dovode do

stani ne smrti, dok nedostatna funkcija nekog od paraloga nije važna za vijabilnost stanica, ali dolazi do promjena u fenotipu (Kawabata i sur. 2005).

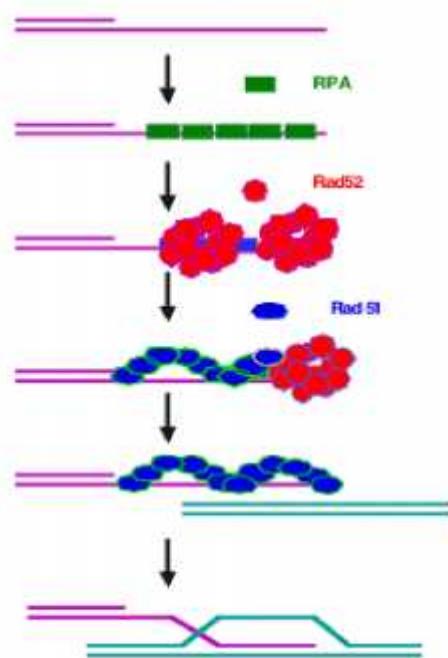
1.2.2. Uloga Rad51 i njegovih paraloga u stanici

Protein Rad51 je ključni protein u procesu homologne rekombinacije kod eukariota. Na N-terminalnom kraju proteina nalazi se domena koja omogućuje vezanje na DNA na mjestu loma, vezanje je neovisno o DNA nukleotidnoj sekvenci (Arber i sur. 2005). Jedan monomer veže se na tri bazna para, a nastali nukleoproteinski filament ima aktivnost hidrolize ATP-a. Susjedne podjedinice povezane su preko visoko očuvanih segmenata koji imaju strukturu -ploče. Filament ima strukturu desno orijentirane zavojnice u kojoj je

DNA izdužena za oko 50% u odnosu na njenu duljinu u B-formi (Bianco i sur. 1998). Kompleks katalizira homologno sparivanje jednolanane DNA s dvolanom anom i izmjeničnim lanaca.

Migracija nastalog DNA heterodupleksa je spora, ali se povećava prisustvom drugih proteina kao što su Rad51 paralizi, Rad52 i Rad54 (West 2003). Utjecaj hidrolize ATP-a na stvaranje kompleksa za popravak DNA važan je za razumijevanje popravka dvolanog loma DNA. Uočeno je da RecA i Rad51 prolaze konformacijske promjene nakon vezanja ili hidrolize ATP-a koji su važni za regulaciju njihove polimerizacije na DNA. Neka istraživanja pokazuju da su i Rad51 kompleksi regulirani ovom efektorskom molekulom (Menetski i Kowalczykowski 1985; Kim i sur. 2002).

Kompleksi imaju ulogu u ranoj fazi homologne rekombinacije: pomaju polimerizaciju Rad51 tako što uklanjaju RPA protein (replikacijski protein A) koji se veže na jednolanu DNA i sudjeluju u invaziji lanca. Neki podaci govore o njihovoj ulozi i u kasnijim fazama homologne rekombinacije. U tom pogledu je zanimljiv BX3 kompleks jer



Slika 5. Polimerizacija proteina Rad51 na DNA, na mjestu loma. Preuzeto s www.protein.osaka-u.ac.jp.

mutante za Xrcc3 ili Rad51C, podjedinice ovog kompleksa, imaju poteško e kod razrješenja Hollidayeve veze (Liu i sur. 2007).

Prvi otkriveni paralog proteina Rad51 je protein Rad51C. Javlja se u oba kompleksa, BCDX2 i BX3. Na C-terminalnom kraju ima signalnu sekvencu koja mu omogu uje ulazak u jezgru. Neka istraživanja pokazuju kako Xrcc2 nema signalnu sekvencu, te da mu pri ulasku pomaže Rad51C (French i sur. 2003).

Paralozi Rad51B, Rad51C, Rad51D i Xrcc2 grade kompleks koji se skra eno naziva BCDX2 kompleks. Yokoyama i sur. pokazali su u pokusima s raznim tipovima DNA i ovim kompleksom kako on preferira vezanje na razgranate strukture uklju uju i i Hollidayevu vezu, pa je mogu e da ima ulogu u pomicanju mjesta ukriženja.

Rad51D je jedinstven izme u Rad51 paraloga, osim u popravku dvolan anih lomova DNA sudjeluje i u o uvanju duljine telomera i spre avanju njihove fuzije (Tarsounas i sur. 2004). Reverzna transkriptaza replicira telomerne sljedove, a specifi ni proteini vežu se i štite krajeve (Yanowitz 2007).

Kod ioniziraju eg zra enja i radijacije dolazi do prekomjerne ekspresije Rad51B. On fosforilira proteine važne u kontroli stani nog ciklusa, kao što su cdk2, ciklin E, p53 što dovodi do zaustavljanja ciklusa u G1 fazi (Havre i sur. 2000). Protein tako er stupa i u interakciju s histonima (Coleman i sur. 2003).

Zahvaljuju i svojoj centralnoj ulozi u procesu rekombinacije Rad51 je meta mnogih regulacijskih faktora koji koordiniraju DNA popravak, transkripciju, replikaciju i stani ni ciklus. Rad51 stupa u interakciju s mnogim drugim proteinima u stanici uklju uju i i tumor supresor proteine p53, BRCA1 i BRCA2 koji igraju važnu ulogu u održavanju integriteta genoma (Scully i sur. 1997; Yuan i sur. 1999). Protein p53 veže se na Rad51 i inhibira njegovu ATP-aznu aktivnost i izmjenu lanaca u procesu homologne rekombinacije (Sturzbecher i sur. 1996). Protein BRCA2 regulira aktivnost proteina Rad51 tako što ga prenosi do mjesta DNA ošte enja. Uloga BRCA1 za sada je još nepoznata.

Rad51 je esto prekomjerno eksprimiran u stanicama raka i povezan je s njihovom rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju, te s njihovom pove anom proliferacijom (Henning i Sturzbecher 2003). Stoga je potencijalna meta za lijekove, kao i homologna rekombinacija koja bi se mogla iskoristiti za popravak gena (Ohnishi i sur. 1998, Ito i sur. 2005, de Semir i Aran 2006). Zbog važnosti u fundamentalnoj biologiji i mogu e primjene

u medicini cijela skupina ovih proteina predmet je brojnih istraživanja, ali to an mehanizam njihovog djelovanja još nije otkriven (Renodon-Cornière i sur. 2008).

1.3. Introni

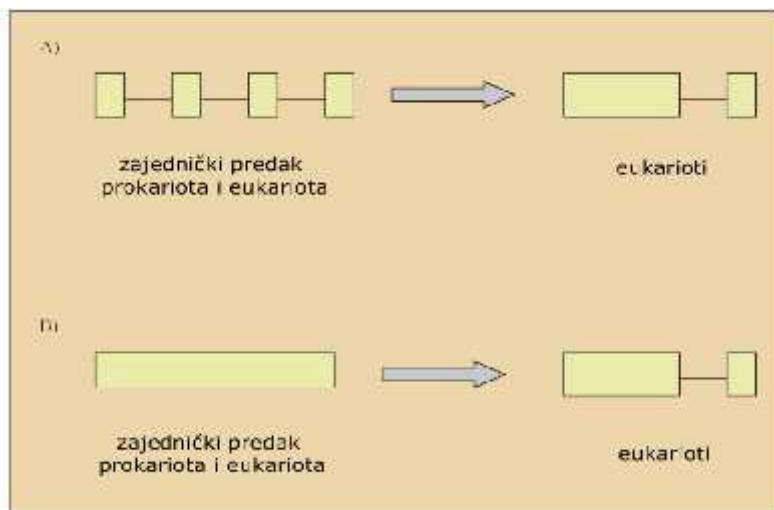
1977. godine otkriveno je da su geni eukariota isprekidani nekodiraju im regijama-intronima, koji se uklanjujaju kompleksom RNA i proteina. Sekvence koje prekidaju gene pronaene su i kod bakterija i u genomima organela (mitohondrij, kloroplast), no one se same izrezuju, a nazivaju se parazitski elementi.

Broj i veličina introna varira između organizama i gena. Tako je kod npr. kvasca većina gena neprekinuta, dok geni kod sisavaca imaju puno introna.

Većina introna je nevažna za funkciju gena, no kod nekih su unutar introna prisutne regulacijske sekvene ili njihova prisutnost osigurava nastanak više različitih transkriptata (Pagel i sur. 2002).

Iako nukleotidna sekvenca introna brzo evoluira, lokacija introna unutar gena može biti visoko očuvana između udaljenih vrsta ili paraloga nastalih duplikacijom unutar genoma (Federov i sur. 2002).

Nedavne studije pokušale su rekonstruirati povijest gubitka i nastanka introna tijekom evolucije eukariota. Jedni smatraju da su introni naslijedeni zajedno s genima od prokariotskog pretka, a razlike koje danas vidimo u strukturi homolognih eukariotskih gena su posljedica gubitka nekih introna (Roy i Gilbert 2005). S druge strane postoji teorija kako su se introni pojavili tek s eukariotima i pojavljuju se konstantno tijekom evolucije eukariota (Qiu i sur. 2004). Nekoliko je mehanizama evolucije introna i njihove distribucije unutar kodirajućeg regije. Migracija introna označava pomicanje granice intron-egzon za nekoliko baza (1-15 nukleotida). No statističke metode pokazuju kako su tih događaja vrlo rijetki, pravi evolucijski fenomeni. Dokazi o migriranju introna na veće udaljenosti nikad nisu pronađeni.



Slika 6. Introni-prije (A) i introni-poslje (B) hipoteza. Preuzeto od Rogozin i sur. 2003.

Tako je glavni mehanizam evolucije introna: gubitak ili pojava novih introna. Neki eukarioti su, kao npr. *Saccharomyces cerevisiae*, izgubili gotovo sve introne naslike ene od zajedni kog pretka (Rogozin i sur. 2003). Nedavne komparativne analize na genomima kralježnjaka utvrdile su samo gubitke introna kod sisavaca, ali ne i pojavu novih (Roy i sur. 2003). Ti rezultati upu uju na pretpostavku da gubitak introna dominira u kratkom evolucijskom periodu, dok bi insercije introna mogle biti povezane s velikim promjenama u evolucijskoj prošlosti (Rogozin i sur. 2005). S druge strane Coghlan i Wolfe (2004) identificirali su 81 intron kod *Caenorhabditis elegans* i 41 intron kod *C. briggsae* za koje smatraju da su se nedavno pojavili u njihovim genomima. 28 introna ima značajnu sličnost u sekvenci s drugim intronima, uključujući i tri introna koji su slični drugim intronima u istom genu. Ovi rezultati upu uju na mogućnost da su barem neki od novonastalih introna posljedica reverznog izrezivanja već postojećeg introna.

Analizom većeg broja podataka uočeno je da introni nisu raspoloživi s obzirom na kodon, pojavljuju se u tri faze koje se definiraju s obzirom na njihov položaj u odnosu na kodon. Introni faze 0 nalaze se između dva kodona, introni faze 1 nakon prve pozicije u kodonu, a faze 2 nakon druge pozicije. U svim analiziranim genomima

prevladavaju introni faze 0 (Long i Rosenberg 2000). Detaljnijim promatranjem uo eno je da se takvi introni nalaze u visoko o uvanim dijelovima gena, pa se smatra da su introni faze 1 i faze 2 možda podložniji mutacijama i delecijama koje su onda uzrokovale gubitak takvih introna (Ruvinsky i sur. 2005).

Položaji introna uspješno se koriste kao filogenetski marker kod kra ih evolucijskih udaljenosti, ali se ne smatraju dobrim izvorom informacija za prouavanje filogenetskih odnosa udaljenih vrsta (Vanketesh i sur. 1999; Rogozin i sur. 2003).

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

Spužve, iako najstarije živu e koljeno Metazoa kod kojeg nije došlo do razvoja tkiva i organa, posjeduju brojne evolucijski sa uvane gene i proteine uklju ene u odvedene funkcije i predstavljaju zanimljiv modelni organizam za evolucijsko istraživanje.

Dosadašnja istraživanja na spužvi pokazala su da u na elu geni/proteini spužava pokazuju ve i stupanj konzerviranosti strukture s homolognim/ortolognim genima i proteinima kralježnjaka, nego s homolozima/ortolozima iz beskralježnjaka. Stoga o ekujemo da e i proteini Rad51 i Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula*, s obzirom da su važni za vijabilnost i normalnu funkciju stanicu, tako er imati nisku stopu promjene aminokiselinske sekvence i najvjerojatnije pokazivati najve u sli nost s homolognim proteinima kralježnjaka.

Prepostavljamo tako er da e kod gena za te proteine i položaj i faza introna biti evolucijski o uvana. U dosadašnjim istraživanjima na genomu spužvi uo eno je kako njezini geni ne posjeduju duge introne. Stoga za introne u genima *rad51* i *rad51D* o ekujemo da ne e biti dulji od 2 kb.

2.2. CILJ ISTRAŽIVANJA

- izolacija ukupne DNA iz morske spužve *Suberites domuncula*
- odre ivanje i analiza nukleotidnog slijeda i strukture gena *rad51* i *rad51D*
- analiza proteinske sekvence Rad51 i Rad51D
- stvaranje ekspresijskog konstrukta i sinteza proteina

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusni organizam

Istraživanja su provo ena na genomu vrste *Suberites domuncula* Olivi, 1792.

Klasifikacija: Kraljevstvo: Animalia

Koljeno: Porifera

Razred: Demospongia

Red: Hadromerina



Slika 7. Spužva *Suberites domuncula* u svom prirodnom okruženju. Preuzeto s www.geologischevereniging.nl.

Suberites domuncula, odnosno naran asta pluta a, je vrsta spužve široko rasprostranjena na Mediteranu, a nalazimo je još i u Crnom moru. Jedinke su sferi ne, maksimalnog promjera do 10 cm. Površina je ve inom glatka, sadrži samo male kanale koji su esto ravni i javljaju se pojedina no. Razli ito su obojene: od naran aste do svijetlo plave boje.

Materijal i metode

Obojene su zahvaljuju i složenoj mješavini ugljikohidrata s pigmentima sli nim alfa-karotinu, beta-karotinu, likopenu i torulenu (Matoni kin i sur. 1998).

Primarno nastanjuju muljevita i pjeskovita dna, a esto ih nalazimo i u simbiozi s rakom *Paguristes eremita*. Ova vrsta raka nastanjuje prazne školjke na koje se onda prihvati spužva. Spužvama ova simbioza omogu uje bijeg od sjedila kog na ina života što onda zna i rasprostranjenje gameta na širem prostoru i ve i donos hrane. Zauzvrat lu e i toksine odbija mogu e predatore i na taj na in štiti raka.

Primjerici korišteni u ovom istraživanju skupljeni su u Jadranskom moru, u blizini Rovinja. Razdijeljeni su na manje komade i pohranjeni na -80°C.

3.1.2. Osnovne kemikalije

U ovom radu korišten je sljede i materijal: agar (Difico), agaroza (Sigma), akrilamid (Sigma), ampicilin (Boehringer Mannheim), amonijev persulfat, APS (Serva), dimetil sulfoksid (DMSO) (Sigma), ditiotreitol (DTT) (Sigma), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA) (Sigma), etanol (Kemika), fosfatna kiselina (Kemika), glicerol (Merck), glicin (Merck), D-glukoza (Kemika), N-2-hidroksietilpirazin-N'-2-etansulfonska kiselina (HEPES) (Amersham Bioscience), imidazol (Boehringer Mannheim), izopropil-β-D-thiogalaktopiranozid (IPTG) (Sigma), kalijev klorid (Alkaloid), metanol (Kemika), N,N'-metilbisakrilamid (Merck), natrijev acetat (Kemika), natrijev dodecilsulfat (SDS) (Merck), natrijev hidrogenkarbonat (Kemika), natrijev klorid (Kemika), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (Sigma), N,N,N',N'-tetraetylendiamin (TEMED) (Kemika), Tris(hidroksimetil)-aminometan (Kemika).

3.1.3. Osnovne puferske otopine

Korišteni su puferi:

- TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)
- TAE (0,04 M Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.3)
- TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1% Tween 20)
- CMFSW+EDTA (400 mM NaCl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 2,5 mM Na-EDTA)
- pufer za proteine (50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 15% glicerol, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, pH 7.5)

3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline

- dNTP Mixture (TaKaRa)
- DNA-biljeg
1kbDNA Ladder (NEBL)
- Po etnici za kloniranje:

Univerzalni oligonukleotidi koji služe kao klice za po etak sinteze DNA ugra ene u plazmidni vektor:

T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	(MWG-Biotech AG)
T7	5'-TAATACGACTCACTATAAGGG-3'	(MWG-Biotech AG)

Po etnici osmišljene i sintetizirane za istraživanja na genima *rad51* i *rad51D*:

Po etnici za gen *rad51*

rd1	5'-GTACACAAAATCTGAGATG-3'	(Sigma)
rd2	5'-CTGAGCAAAGTTCTGAG-3'	(Sigma)
rd3	5'-CAGTACCAATGATGTAAAGAAC-3'	(Sigma)
rd4	5'-GCCACGGCATTATATCGCAC-3'	(Sigma)
rdrv	5'-CCCAGTTCTTAATTCTCCG-3'	(Sigma)

Materijal i metode

Po etnici za gen *rad51D*

fw1	5'-CGCATATGCAAACGCATGTGAAC-3'	(Invitrogen)
fw2	5'-CATGCCATATGAATAAGTCTGTC-3'	(Invitrogen)
rv	5'-AGATGATTCGGGATCCTAGC-3'	(Invitrogen)

Po etnici su osmišljene pomo u programa za kreiranje po etnica NetPrimer.

Ne posjeduju os simetrije drugog reda i nisu komplementarne vektorskoj DNA ili podru jima DNA koja su pro itana.

3.1.5. Plazmidi

Vektor pET15b dio je ekspresijskog sustava vektora pET (Novagen) i korišten je za prekomjernu ekspresiju gena *rad51D* u *E. coli*. Kodiraju a regija klonirana je unutar restriktivskih mjesta *Bam* HI i *Nde* I.

3.1.6. Proteini i enzimi

Albumin gove eg seruma (BSA) (Sigma), Taq polimeraza (Amersham Biosciences), *Bam* HI (NEB), *Nde* I (NEB), DNA-ligaza faga T4 (NEB), lizozim (Sigma), proteinski biljeg širokog raspona (Amersham Biosciences).

3.1.7. Boje

Korištene su boje Bromphenol Blue (BPB) (Serva), Coomassie Briliant Blue R-250 (Sigma), etidij-bromid (Rosche).

3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je:

- LB teku a podloga (5g/L kvaš ev ekstrakt, 10g/L tripton, 5g/L NaCl, 0,1g/L MgCl₂)
- LB kruta podloga (12g/L agar)
- Selektivne podloge su sadržavale 100 µg/mL ampicilina.

3.1.9. Bakterijski sojevi

E. coli kompetentne stanice, soj BL21, omogu uju kontroliranu ekspresiju željenih proteina ugra enih u vektore kao što su pCAL i pET vektori.

Genotip: *E. coli* B F⁻ *dcm* *ompT* *hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *gal*

3.1.10. Ostali materijali

Korišteni su komercijalni paketi:

- za izolaciju genomske DNA
Qiagen Genomic DNA, Qiagen Blood and cell culture DNA (Qiagen)
- za izolaciju plazmidne DNA
QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)
- za pro iš avanje fragmenata DNA iz agaroznog gela
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- za sekvenciranje DNA
ABI-PRISM Big Dye Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

Za Western-analizu proteina korišteni su:

- poliviniliden fluoridna membrana (Amersham Biosciences)
- primarna antitijela Anti-His iz miša (Amersham Biosciences)
- sekundarna antitijela Anti-mouse IgG, u kompleksu s peroksidazom (Amersham Biosciences)
- luminol (Amersham Biosciences)
- poja iva (Amersham Biosciences)

Za PCR reakciju korišten je PCR Ready Mix (Sigma)

sastav: 1,5 U Taq DNA polimeraza, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,001% *gelatin*, stabilizatori

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupne DNA iz spužve *Suberites domuncula*

Do nedavno je ovaj korak u molekularnoj biologiji bio vrlo kompleksan, podrazumijevao je mnogobrojne različite metode od kojih su neke vrlo dugotrajne, teške i nespretnе. Unatrag desetak godina cijela tehnologija je revolucionizirana uvojem purifikacijskih metoda koje se baziraju na selektivnom vezanju nukleinskih kiselina na silikagel membrane ili na ionskoj izmjeni. NK se prošavaju iz smjese bez potrebe za organskim dugotrajnim ekstrakcijama i selektivnim taloženjem.

U radu je korišten *Qiagen Genomic DNA, Qiagen Blood and cell culture DNA* paket.

Ovaj komercijalni paket omogućuje direktnu izolaciju visokomolekularne DNA veličine 20-150 kb. Procedura se temelji na optimiziranim puferima sustavima za lizu stanica, nakon čega slijedi vezanje genomske DNA na membranu kod niske koncentracije soli i određenih pH uvjeta. RNA, proteini, boje i nisko molekularne ne istoče se ispiru. Genomska DNA se eluira puferom s visokom koncentracijom soli, a zatim se koncentrira i rješava soli taloženjem izopropanolom.

S obzirom da se radi o vrstom i smrznutom tkivu gdje bi djelovanje pufera za lizu bilo vrlo otežano napravljeni su slijedeći predkoraci:

- 100 mg tkiva homogenizirano je u tekućem dušiku i ostavljeno sat vremena u CMFSW+EDTA otopini, uz miješanje, da se razgradi na pojedinačne stanice
- nakon toga ostavljeno je nekoliko minuta na sobnoj temperaturi kako bi tkivo i iglice pali na dno
- supernatant je izoliran i centrifugiran na 100 g, 10 minuta.
*centrifugira se pri maloj g vrijednosti kako ne bi došlo do denaturacije DNA
- talog u kojem se nalazi DNA dalje je obraćen po protokolu koji je priložen u paketu

3.2.2. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Ako je poznat dio slijeda nukleotida u nekoj molekuli nukleinske kiseline moguće je *in vitro* pripraviti goleme količine te molekule. Tako dobivene velike količine DNA mogu se koristiti za molekularno kloniranje, analizu razgradnjom restriktičkim endonukleazama ili za određivanje slijeda nukleotida.

Neophodno je poznavati slijed DNA koji se umnaže. To će poslužiti za odabir po etnici, to jest para kraćih oligonukleotida koji predstavljaju granice (lijevo i desno) odsječka DNA koji se umnaže. Osim po etnici za samu reakciju potrebna su i petiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), te termostabilna DNA-polimeraza.

Reakcija započinje zagrijavanjem kalupa na visokoj temperaturi (95°C) da bi došlo do razdvajanja dva lanca DNA. Nakon toga se temperatura snižava kako bi se po etnicama omogućilo da se specifično povežu s komplementarnim slijedom na lancima kalupa. Treći korak je zagrijavanje reakcijske smjese na temperaturu od $70\text{-}75^{\circ}\text{C}$ pri kojoj se odvija sinteza lanaca. Kontinuiranim ponavljanjem denaturacije, sparivanja i produljivanja u nekoliko ciklusa (obično 20-40 ciklusa) količina umnožene DNA eksponencijalno raste. Enzimi koje koristimo su stabilni na visokim temperaturama, a izolirani su iz bakterija poput *Thermus aquaticus* koje žive u termalnim izvorima na temperaturi od približno 75°C .

Uspješnost reakcije PCR provjerava se elektroforezom produkta reakcije u agaroznom gelu.

Osobine po etnici koje će osigurati njihovo snažnije sparivanje s kalupom:

- duljina po etnici 18-24 pb
- temperatura sparivanja između $50\text{-}65^{\circ}\text{C}$
- udio G i C nukleotida 45-55%
- 5' i 3' krajevi završavaju s nukleotidom G ili C, ili GC odnosno CG dinukleotidom

Materijal i metode

Tablica 1. Volumeni i koncentracije potrebnih kemikalija za umnažanje gena *rad51* PCR reakcijom.

Reagensi	Po etna koncentracija	Kona na koncentracija	Volumen (μ L)
PCR Ready Mix	2x	1x	12,5
Po etnica 1	10 pmol/ μ L	0,2 pmol/ μ L	0,5
Po etnica 2	10 pmol/ μ L	0,2 pmol/ μ L	0,5
Kalup	20 ng/ μ L	1,6 ng/ μ L	2
Voda	-	-	9,5

Ukupni volumen PCR reakcija je 25 μ L.

Po etnica 1 ozna ava T3 po etnicu, a po etnica 2 po etnice rd1 ili rd2. Sekvence svih po etnica su navedene u poglavlju 3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline. Za DNA kalup korištena je cDNA biblioteka i genomska DNA. Kao pozitivna kontrola korišten je plazmid s ukloniranim fragmentom gena *rad51*.

Tablica 2. Program PCR reakcije za umnažanje slijeda gena *rad51*.

Koraci	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Po etna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	94	1	30
Sparivanje po etnica	54	1,5	5
	52	1,5	5
	50	1,5	20
Produljivanje lanca	72	3	1
Završno produljivanje lanca	72	10	1

Materijal i metode

Tablica 3. Volumeni i koncentracije potrebnih kemikalija za umnažanje gena *rad51D* PCR reakcijom.

Reagensi	Po etna koncentracija	Kona na koncentracija	Volumen (μ L)
dNTP	2 mM	0,2	5
pufer	10 x	1 x	5
MgCl ₂	25 mM	2,5	3
Taq polimeraza	5 U/ μ L	1 U	0,5
Po etnica 1	10 pmol/ μ L	0,4 pmol/ μ L	2
Po etnica 2	10 pmol/ μ L	0,4 pmol/ μ L	2
Kalup	20 ng/ μ L	0,2 ng/ μ L	0,5
Voda	-	-	32

Ukupni volumen PCR reakcija za umnažanje gena *rad51D* je 50 μ l.

Po etnica 1 oznaava po etnice fw1 ili fw2, a Po etnica 2 oznaava po etnicu rv.

Za DNA kalup korištena je cDNA biblioteka i genomska DNA.

Tablica 4. Program PCR reakcije, umnažanja gena *rad51D*.

Koraci	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Broj ciklusa
Po etna denaturacija	95	2	1
Denaturacija	94	1	
Sparivanje po etnica	45	2	29
Produljivanje lanca	72	3	
Završno produljivanje lanca	72	10	1

3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Većina bioloških makromolekula je električno nabijena, te će se stoga gibati u električnom polju. Elektroforeza nukleinskih kiselina temelji se na unikatnom molekulskom sítu. Omjer naboja i mase gotovo je jednak za sve polinukleotide stoga se male molekule gibaju brže od velikih. Razdvajanje nukleinskih kiselina u agaroznom gelu provodi se u svrhu restrikcijske analize, određivanje veličine DNA-fragmenta i plazmida, određivanje količine, istočno izolirane DNA ili produkta reakcije PCR te izolacije fragmenata za potrebe kloniranja. Kako su molekule DNA velike potreban je gel sa velikim porama. U tu svrhu najčešće se koriste agarozni gelovi. Elektroforezom DNA u gelu agaroze moguće je razdvojiti fragmente veličine 50 pb-50 kb. Agaroza je linearni polimer u kojem se izmjenjuju ostaci D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Gel se priprema uje otapanjem agaroze u puferu i zagrijavanju do varenja. Polimerne molekule hla enjem tvore gel međusobno se povezuju i vodikovim vezama. Veličina pora, a time i raspon molekulskih masa molekula koje se mogu uspješno odijeliti, kontrolira se mijenjanjem koncentracije agaroze u gelu. Uzorcima je potrebno dodati boju koja omoguće pravljene fronte uzoraka tijekom elektroforeze. Radi određivanja veličine fragmenata, u zasebnu jažicu dodaje se smjesa DNA biljega. Vizualizacija razdvojenih fragmenata DNA postiže se pomoću etidij-bromida, uključujući u pufer za izradu agarognog matriksa. Etidij-bromid se interkalira u DNA i podstavljen UV svjetlom fluorescira u narančastom dijelu spektra.

Jedan postotni agarozni gel je pripremljen zagrijavanjem agaroze u TAE puferu s etidij-bromidom i izlijevanjem otopine u odgovarajući kalup. U otopinu se odmah umetnuo ešalj za formiranje jažica u koje se nanose uzorci. Gel je bio uronjen u TAE pufer. Koristeni su DNA biljeg u rasponu od 0,1 do 10 kb. Uzorci su pripremljeni dodavanjem pufera za nanošenje uzoraka na gel (1/6 ukupnog volumena). Elektroforeza je teklila u električnom polju jakosti 8-10 V/cm tijekom 30-60 minuta. Vrpce DNA vizualizirane su promatrano gela na transluminatoru pri 312 nm.

Gelovi su snimljeni pomoću uređaja GBOX EF Gel Documentation System (Syngene).

3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela

QIAquick Gel Extraction Kit koristi se za prošavanje DNA fragmenata, veličine 70 pb do 10 kb, iz agaroznog gela. Kombinacijom centrifugiranja i selektivnog vezanja na silikagel matriks može se prostirati i do 10 µg DNA.

Puffer za vezanje otapa agarozu i osigurava točnu koncentraciju soli i pH kod kojih dolazi do adsorpcije DNA na silikagel membranu. DNA se veže na matriks kod visoke koncentracije soli, a optimalni pH je pH 7.5 kod kojeg onda dolazi do vezanja oko 95% DNA. Neželjene ne isto su kao što su soli, enzimi, agarozna, etidij bromid, deterdženti ne vežu se za matriks već se ispiru s kolone. Elucija je takođe ovisna o koncentraciji soli i pH elucijskog pufera. Suprotno adsorpciji, uspješnoj eluciji pogoduju niska koncentracija soli i baza ni pH. DNA prošavna na ovaj način pogodna je za različite primjene, kao što su restrikcija, PCR, hibridizacija, ligacija i transformacija ili sekvenciranje.

3.2.5. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksimetodom

Metodu za određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) u molekuli DNA koja je danas u upotrebi razvio je sredinom sedamdesetih godina 20. stoljeća Frederic Sanger sa suradnicima u Cambridgeu. Za svoje otkriće 1980. godine dobio je Nobelovu nagradu. Metoda sekvenciranja molekule DNA zasniva se na zaustavljanju enzymatske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-trifosfata pa se ova metoda, osim Sangerova, naziva i još i enzymatskom dideoksi-metodom.

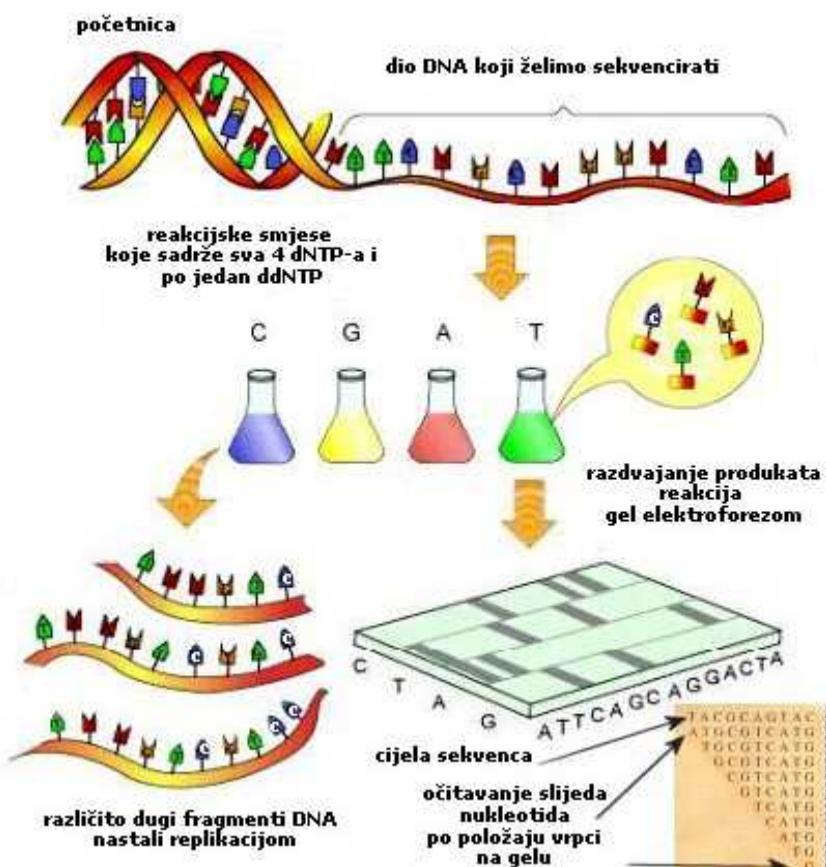
Prirodni supstrati za sintezu DNA su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Sintesa DNA ide u 5'-3' smjeru, a preduvjet za sintezu je postojanje poljnica koja pronađe sebi homologan slijed i u njim produžavanjem nastaje novi DNA lanac. DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu ugraditi u rastući lanac i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji nemaju hidroksilnu

Materijal i metode

skupinu na 3'-položaju deoksiriboze, pa nakon njihove ugradnje, zbog nemogunosti uspostavljanja fosfodiesterske veze, dolazi do zaustavljanja daljne sinteze DNA.

Enzimatska sinteza ide u četiri odvojene reakcije, u svakoj reakcijskoj smjesi nalaze se sva četiri dNTP i po jedan od ddNTP-ova. Omjer dNTP-a i ddNTP-a podešen je tako da se ddNTP ugrađuje u DNA s mnogo manjom učestalošću. Na taj način nastaje serija DNA molekula koje završavaju bazom koja odgovara ddNTP-u korištenom u reakciji.

Proučavajući, elektroforezom, sve dobivene dužine novonastale molekule DNA saznajemo na kojim mestima se nalazi određeni nukleotid.



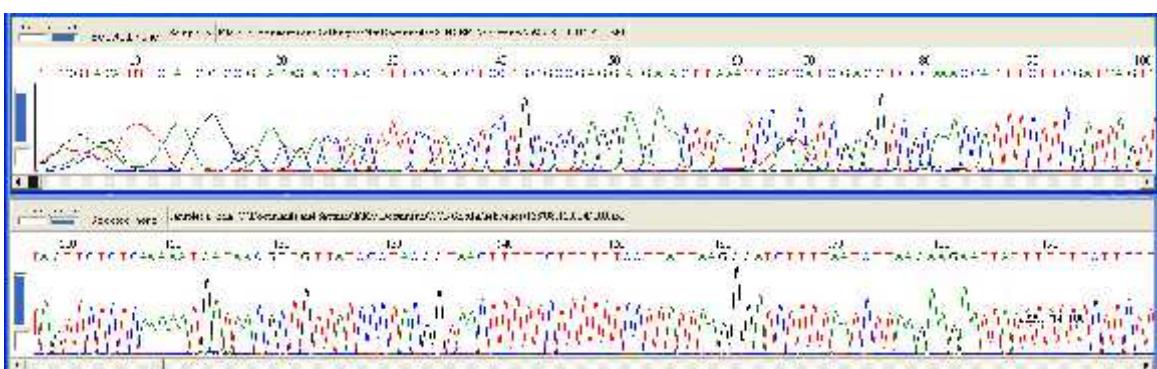
Slika 8. Sekvenciranje DNA, četiri odvojene reakcijske smjese. Preuzeto s www.scq.ubc.ca.

Materijal i metode

Prije desetak godina jedan od etiri nukleotida obilježavao se radioaktivnim fosforom ($-^{32}\text{P}$) ili sumporom ($-^{35}\text{S}$) pa je novonastala DNA bila radioaktivna. U novije vrijeme obilježavanje je neradioaktivno (fluorescentnim bojama) a obilježava se jedan od dNTP-ova, po etnica ili ddNTP-ovi, ovisno o vrsti protokola.

Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer

Potpuno automatizirani ure aj koji umjesto elektroforeze u tankim gelovima poliakrilamida koristi kapilarnu elektroforezu (uzorci se nakon završene reakcije razdvajaju putuju i kroz vrlo dugu i tanku kapilaru ispunjenu polimerom) i "etverobojnu biokemiju" (svaki ddNTP obilježen je drugom fluorescencijskom bojom) tako da se reakcija provodi u istoj mikropruveti. CCD kamera pretvara informaciju o fluorescenciji u elektroni ki signal koji se onda prenosi na ra unalo i obra uje ABI-PRISM-*Avant Genetic Analyzer Data Collection Software Version 2.0* i prikazuje u obliku elektroferograma. Na y-osi prikazuje se relativna koncentracija boje, a na x-osi vrijeme. Svaki pik na elektroferogramu predstavlja po jedan fragment DNA i koristi se u odreivanju nukleotidne sekvene. Rezultati se korisniku prikazuju pomo u programa ABI PRISM *DNA Sequencing Analysis Software Version 5.11*. Kod priprave uzorka za kapilarnu elektroforezu koristi se komplet ABI-PRISM *Big Dye Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Cycle Sequencing Kit*.



Slika 9. Nukleotidna sekvenca određena na instrumentu ABI-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer.

Materijal i metode

Protokol za metodu obilježavanja ddNTP-ova s etiri fluorescentne boje

- za PCR reakciju na ledu dodati slijedeće reagense:
1 µL po etnici, 4 µL reakcijskog pufera, 2 µL reakcijske smjese, DNA kalup 0,5 µg u volumenu od 13 µL vode
- kratko centrifugirati, a zatim započeti PCR reakciju po slijedećem programu:

Tablica 5. Program reakcije sekvenciranja pomoći u PCR-a.

Koraci	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	96	1 minuta	1
Denaturacija	96	10 s	
Sparivanje po etnicama	50	5 s	25
Produljivanje lanaca	60	4 minute	

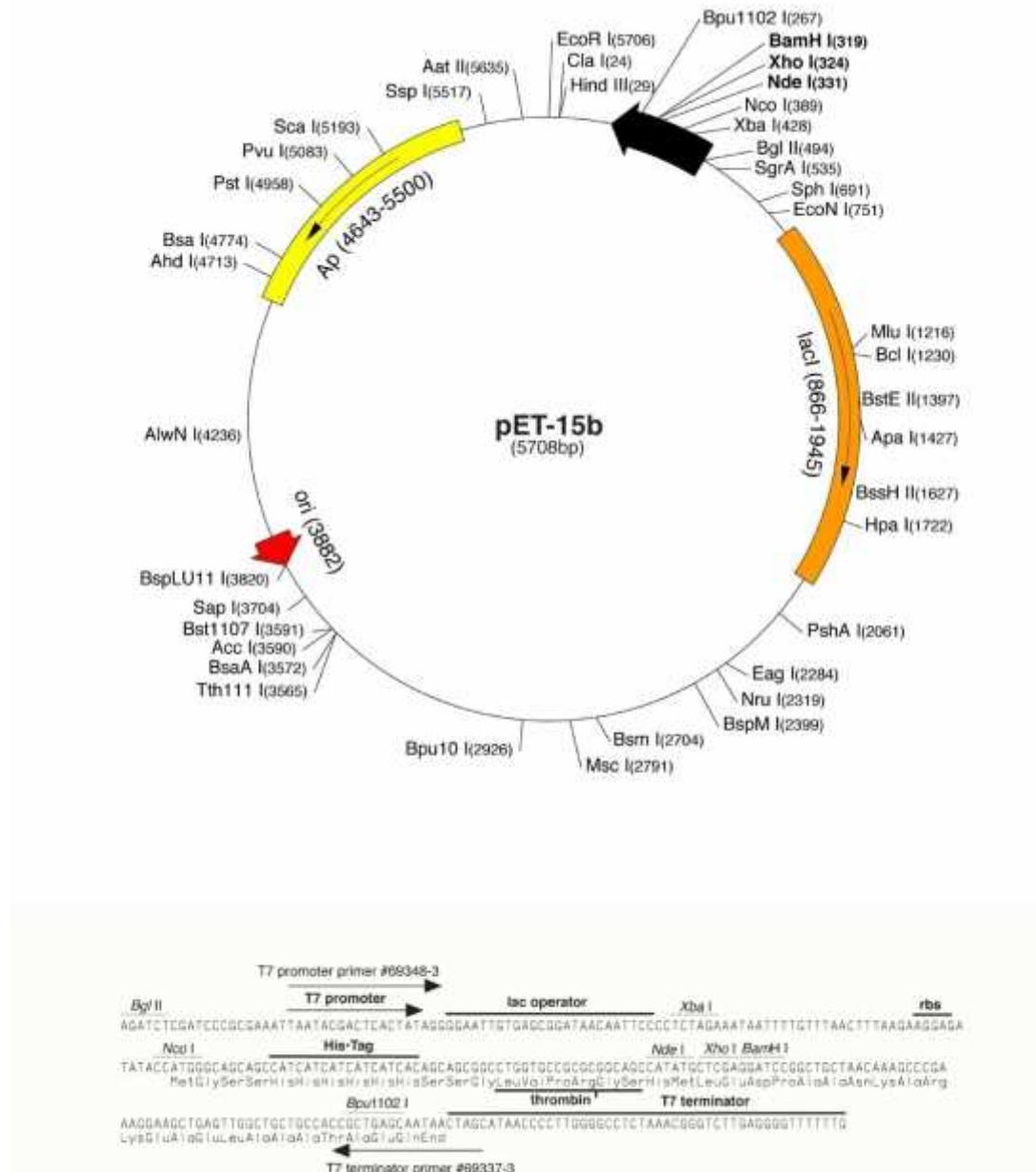
Brzo ohladiti pri 4°C i kratko centrifugirati

- za pranje avanje DNA fragmenta iz reakcijske smjese: dodati 2 µL 3 M natrij-acetata, 2 µL 125 mM EDTA i 50 µL 100% etanola; izmiješati okretanjem mikropruvete i inkubirati 15 minuta na sobnoj temperaturi
- centrifugirati pri najvećoj brzini (16000 g) tijekom 15 minuta na 4°C
- supernatant ukloniti vodenom sisaljkom
- dodati 70 µL ledenog 70% etanola te centrifugirati na 16000 g tijekom 5 minuta
- ukloniti supernatant i talog osušiti u vakuum centrifugi, 5 minuta na sobnoj temperaturi
- resuspendirati talog dodavanjem 10 µL formamida i kratko centrifugirati
- denaturirati uzorak na 95°C 3 minute, a zatim staviti na led, najmanje 2 minute
- programiranje uređaja *Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* za provođenje kapilarne elektroforeze

3.2.6. Stvaranje rekombinantne DNA

Molekularno kloniranje omoguilo je pripravu velikih koli ina proteina za struktura i funkcionalna ispitivanja. Većina proteina prisutna je u malim koncentracijama u stanicama eukariota, stoga je konvencionalnim biokemijskim metodama nemoguće pripraviti veće količine tih proteina. Međutim kad jednom imamo klonirani gen, taj problem možemo riješiti koristeći posebno dizajnirane vektore koji omogućuju snažnu ekspresiju kloniranog gena u bakterijskim ili eukariotskim stanicama. Da bismo eksprimirali eukariotski gen u *E. coli* željenu cDNA kloniramo u plazmidni ili fagmidni vektor (nazivamo ga ekspresijski vektor). Vektor sadrži sljedove koji potiču prepisivanje i prevodjenje umetnutog gena u bakterijskim stanicama. Klonirani gen može biti tako kako eksprimiran da njegov proteinski produkt predstavlja i do 10% ukupnih proteina bakterija.

pET15b vektori (Novagen) dizajnirani su za ekspresiju ciljnih proteina. Novija generacija vektora omogućuje lakše kloniranje, detekciju i purifikaciju proteina.

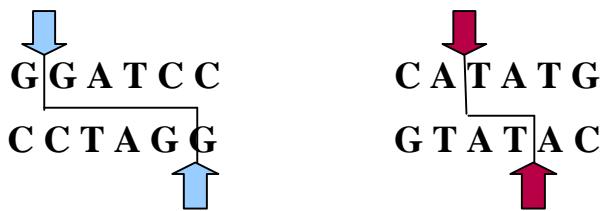


Slika 10. Ekspresijski vektor pET15b. Specifi na mesta prikazana su na cirkularnoj mapi, a na dnu slike je prikazana kloniraju a regija. Preuzeto s <http://deps.washington.edu/>.

3.2.6.1. Razgradnja DNA restriktičkim endonukleazama

Restriktičke endonukleaze su enzimi koji prepoznaju točno određene sljedove nukleotida u dvolančanoj DNA i cijepaju oba lanca dajući 5'- ili 3'-strane ili tipe krajeve. Biološka uloga ovih enzima je zaštita bakterijske stanice od stranih molekula DNA. Restriktičke endonukleaze se nazivaju po bakteriji iz koje su izolirane. Prvo slovo dolazi od roda, druga dva su prva dva slova bakterijske vrste. Iza toga može slijediti slovo koje označava soj ili rimski broj, ukoliko je iz tog organizma izolirano više enzima.

U ovom radu su korišteni restriktički enzimi *Nde* I i *Bam* HI za stvaranje ljepljivih krajeva kod plazmida pET15b i fragmenata gena *rad51D* umnoženog metodom lančane reakcije polimerazom.



Slika 11. Restriktičko mjesto koje prepoznaje *Bam* HI enzim (lijevo), restriktičko mjesto koje prepoznaje enzim *Nde* I (desno).

Za ukloniranje su osmišljene tri početnice:

- početnica fw1 je dizajnirana od prvog metionina na slijedu nukleotida:
CGAGCATGCAAACGCATGTGAAC, s tim da su nukleotidi AGC zamjenjeni s nukleotidima CAT da smo dobili restriktičko mjesto za *Nde* I enzim
- početnica fw2 je od drugog metionina, u slijedu:
CATGCATAATGAATACTCTGTC, ATA je zamjenjeno s CAT (napravljeno je restriktičko mjesto tako da je za *Nde* I enzim)
- početnica rv je dizajnirana na slijedu: GCTACAATCACGAAATCATCT, gdje smo slijed CAATCA zamjenili s GGATCC da dobijemo restriktičko mjesto za *Bam* HI

Reakcije razgradnje izvedene su u volumenima od 20 µL, u odgovaraju im puferima i uvjetima optimalnim za pojedini enzim (po naputku proizvo a a). Po završetku reakcije fragmenti DNA razdvojeni su gel elektroforezom i pro iš eni upotrebom komercijalnog paketa *QIAquick Gel Extraction Kit*.

3.2.6.2. Povezivanje fragmenata DNA

Enzim DNA-ligaza iz bakteriofaga T4 koristi se za povezivanje fragmenata DNA koji nose strše e ili tupe krajeve. Uz utrošak ATP-a, enzim katalizira nastanak fosfodiesterske veze izme u 3'-OH skupine jednog kraja i 5'-fosfatne skupine drugog kraja DNA.

- DNA fragmenti plazmida pET15b (100 µg) i gena *rad51D* (300 µg) razgra eni enzymima *Nde I* i *Bam HI* uneseni su u reakcijsku otopinu koja je sadržavala:
 - pufer za DNA-ligazu T4
 - 0,3 U/µL DNA-ligaze T4
- ligacija je provedena na temperaturi 16°C u trajanju od 12 sati
- molekule DNA istaložene su iz vodene faze dodatkom tri volumena etanola u prisutnosti 0,3 M natrij-acetata, pH 5.2
- otopina je inkubirana 20 minuta na temperaturi od -70°C
- DNA je potom izdvojena centrifugiranjem na 16000 g u trajanju 20 minuta
- talog je ispran 70% etanolom, te ponovno centrifugiran na 16000 g 5 minuta

Sastav pufera za DNA-ligazu T4:

200 mM Tris-HCl, pH 7.6; 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 0,5 mg/mL BSA,
1 mM ATP

3.2.7. Transformacija bakterijskih stanica

Transformacija je proces tijekom kojeg stanica prima istu molekulu strane DNA. Stanice spontano teško primaju stranu DNA iz otopine, jer imaju razvijene obrambene mehanizme koji prije e takav proces. Zbog toga su razvijeni posebni postupci kojima postižemo transformaciju bakterijskih stanica. DNA se može unijeti u stanice pomo u CaCl_2 gdje se stanice inkubiraju na 0°C u otopini kalcijevih kationa i strane DNA, a potom se podvrgavaju toplinskom šoku na 42°C . Alternativni na in je unos DNA infekcijom pomo u bakteriofaga, takav na in naziva se transdukcija.

U ovom je radu korištena metoda elektroporacije, kod koje se otopina koja sadrži stanice i stranu DNA podvrgava jakom, ali kratkotrajnom elektri nom polju ($5000\text{-}7000 \text{ V/cm}$, trajanje 4-5 ms). Tijekom elektroporacije dolazi do pove anja elektri ne provodljivosti i permeabilnosti plazmatske membrane, zbog utjecaja vanjskog elektri nog polja. Kada napon na plazmatskoj membrani postane ve i od njenog elektri nog potencijala nastaju pore na membrani kroz koje može u i DNA.

Bakterije u koje je unesena DNA uzgajaju se na hranjivoj podlozi za odabir transformiranih klonova, koja ovisno o biljegu za odabir sadrži antibiotik ili neku drugu karakteristi nu kemikaliju.

Protokol priprave stanica za elektroporaciju

- svježa no na kultura bakterije *E. coli* BL21 nasa ena je na hranjivu podlogu LB i uzgajana pri 37°C do $A_{600} = 0.5$
- stanice su zatim ohla ene na ledu 30 minuta i centrifugirane 15 minuta na 4000 g kod temperature od 4°C
- talog stanica je dva puta ispran hladnom redestiliranom vodom, a stanice su izdvojene centrifugiranjem pri gore navedenim uvjetima
- talog je otopljen u 10%-tnom glicerolu i ponovno centrifugiran

- supernatant je odba en, a talog stanica otopljen u 1/50 po etnog volumena 10%-tnog glicerola i pohranjen u alikvotima od $40 \mu\text{L}$ na -70°C

Protokol za elektroporaciju bakterijskih stanica

- korišten je ure aj Gene-Pulser (Biorad)

- kivete za elektroporaciju su ohla ene na -20°C
- kompetentne stanice su otopljene i inkubirane u ledu
- u 40 µL kompetentnih stanica dodano je 3 µL taloga ligacijske smjese prethodno otopljene u 20 µL vode
- stanice su prenesene u ohla enu kivetu koja je pomo u hladnog nosa a umetnuta u ure aj za elektroporaciju
- primjenjen je puls 2,5 kV/cm u trajanju 4,5 ms
- stanice su resuspendirane u 1 mL teku eg medija LB i inkubirane 40 minuta na 37°C
- stanice su nasa ene na selektivnu podlogu s ampicilinom

Uspješnost transformacije bakterija plazmidom analizirana je pomo u kolonijskog PCR-a, nakon kojeg je slijedilo sekvenciranje. Svi koraci i potrebne kemikalije za kolonijski PCR navedeni su u priru niku od proizvo a a pET15b vektora, Novagen (*pET System Manual, 11th Edition*).

3.2.8. Izolacija plazmidne DNA

Klasi na metoda za izolaciju manje koli ine plazmidne DNA je metoda alkalne lize. Deterdžent (SDS) razara membranske strukture i denaturira proteine, dok natrijeva lužina denaturira genomsku i plazmidnu DNA. Dodatkom natrijevog ili kalijevog acetata renaturira se u potpunosti plazmidna DNA, dok se SDS, proteini i membranske strukture obore i istalože. Fenol-kloroformom se nadalje plazmidna DNA izdvoji u supernatantu te istaloži natrijevim acetatom i etanolom.

U radu je plazmidna DNA izolirana pomo u komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep* kojim je mogu e izdvojiti do 20 µg plazmidne DNA iz 1-5 mL kulture *E. coli* uzgojene u teku oj podlozi LB. Fenolna ekstrakcija i precipitacija etanolom ovdje su nepotrebne, visoko kvalitetna plazmidna DNA eluira se u malom volumenu Tris pufera. Procedura se

temelji na alkalnoj lizi bakterijskih stanica te kasnije neutralizaciji otopine i podešavanju visoke koncentracije soli kod koje onda dolazi do vezanja plazmidne DNA na silikagel membranu. Ne isto je se ispiru, a zatim se eluira i plazmidna DNA s kolone. Tako pro iš enu DNA može se odmah koristiti u razne svrhe, nema potrebe za taloženjem, koncentriranjem ili odsoljavanjem.

Koli ina plazmida koji je se vezati na membranu ovisi i o faktorima koji utje u na rast bakterijske stani ne kulture, stoga je za uzgoj prekono ne kulture korišten LB medij sastava koji je preporu en u protokolu proizvo a a.

- bakterijske kolonije transformirane plazmidom pET15b s ukloniranim genom *rad51D* nasa ene su u 5 mL teku e podloge LB s dodatkom ampicilina i inkubirane na 37°C tijekom 16-18 sati uz vrtnju od 250 okretaja po minuti
- teku a stani na kultura je centrifugirana na 4000g
- talog je obra en po uputama iz komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep*

3.2.9. Indukcija ekspresije gena

U bakterijskom ekspresijskom sustavu pET klonirani gen je pod kontrolom promotora T7 RNA-polimeraze, ija je ekspresija u stanicama doma ina *E. coli* regulirana *lac* operonom. Vezanjem IPTG-a za represor inducira se ekspresija T7 RNA-polimeraze u stanicama doma ina i omogu uje se transkripcija kloniranog gena. Izuzetno visoka aktivnost ove polimeraze rezultira visokom razinom ekspresije željenog proteina.

Protokol za indukciju ekspresije gena

- bakterijske stanice *E. coli*, soj BL21, transformirane plazmidom pET15b s ukloniranim genom za protein Rad51D inokulirane su u 20 mL teku e podloge LB s 100 µg/mL ampicilina
- inkubacija preko no i na 37°C uz vrtnju od 250 okretaja po minuti
- dobivena zasi ena kultura je razrije ena inkubacijom u 250 mL podloge LB
- nakon što je opti ka gusto a mjerena pri 600 nm (OD₆₀₀) dosegla vrijednost 0.7 inducirana je ekspresija proteina dodatkom 0,8 M IPTG-a

Materijal i metode

- indukcija je provedena na 37°C, na 250 okretaja u minuti, a zaustavljena nakon 2 sata stavljanjem na led
- kultura je centrifugirana 20 minuta pri 4500 g na 4°C
- talozi su resuspendirani u puferu koji je sadržavao: 50 mM HEPES pH 7.2 i 100 mM KCl
- slijedilo je centrifugiranje 12 minuta pri 5000 g na 4°C
- talozi su pohranjeni na -20°C

3.2.10. Pro iš avanje proteina

Cilj pro iš avanja je izdvojiti željeni protein, koji je zadržao svoju strukturu i funkciju, iz lizata stanica. Prije nego što se kreće u postupak potrebno je odrediti isto u kolici proteina kojeg želimo dobiti.

Postoji nekoliko razlicitih načina pripreme bakterijskog stanica nog lizata, postupci uključuju enzimsku ili mehaničku razgradnju bakterijske stjenke i membrane.

3.2.10.1. Sonikacija

Tretiranje stanica u suspenziji ultrazvukom (jačina od 18 kHz) rezultira njihovom inaktivacijom i raspadom. Postupak se primjenjuje za liziranje bakterijske biomase u rasponu od 100-tinjak mg do nekoliko kilograma.

Postupak se provodi na ledu kako ne bi došlo do denaturacije proteina, a razaranje se vrši primjenom uzastopne izmjene ultrazvuka nog titraja i pauze.

Protokol za pripravu lizata bakterijskih stanica

- bakterijska masa je resuspendirana u puferu za lizu (1mg:1ml) i inkubirana 20 minuta (dolazi do razgradnje stanice ne stjenke)
- bakterije su razbijene ultrazvukom
8 ciklusa od po 30 sekundi titraja, 30 sekundi pauze

Materijal i metode

- bakterijski lizat je centrifugiran 15 min u ohla enoj centrifugi pri 10000 g, kako bi se netopljivi dijelovi stanica, u obliku taloga, odvojili od topivih stani nih proteina koji ostaju u supernatantu
- supernatant s topivim stani nim proteinima je centrifugiran pri 16000 g na 4°C kroz jedan sat

Sastav pufera za lizu: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

300 mM NaCl

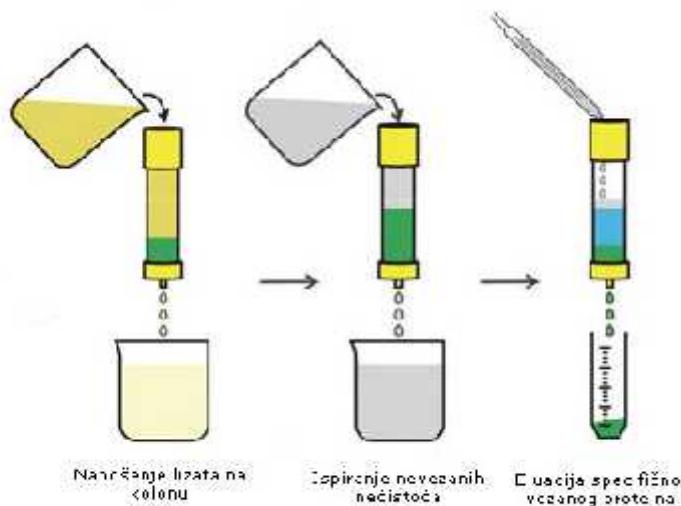
10 mM imidazol

3.2.10.2. Afinitetna kromatografija

Pro iš avanje proteina zasniva se na razli itim fizikalno-kemijskim svojstvima proteina, poput topivosti, veli ine, polarnosti, naboja i vezanja za specifi ne ligande. Afinitetna kromatografija je mo na i rasprostranjena metoda za izolaciju mnogih proteina, posebice enzima, a temelji se na velikom afinitetu proteina prema pojedinim malim molekulama.

Jedan od oblika afinitetne kromatografije je i afinitetna kromatografija na nosa u s imobiliziranim metalom (IMAC). Metalni ioni imobilizirani su na koloni i reverzibilno vežu aminokiseline, primarno histidin, ali i triptofan, tirozin, fenilalanin i cistein, ako su izloženi na površini strukture. Uglavnom se za vezanje koriste ioni Cu^{2+} , Ni^{2+} , ali Zn^{2+} , Co^{2+} , Al^{2+} . Metoda ima najve u ulogu u pro iš avanju rekombinantnih proteina koji na N- ili C-kraju imaju fuzioniranih šest histidina (engl. 6-His tag). Imidazolski prsten histidina veže se za Ni^{2+} imobiliziran tetradentatnim nitril-trioctenim grupama na agarazi. Za svaki ion nikla mogu se vezati po dva histidina. Histidinski nastavak je malen i nenabijen te ne utje e na strukturu i funkciju proteina.

Proteini fuzionirani sa šest histidina vežu se na metalne ione dok ostali proteini silaze s kolone. Željeni protein se eluira pomo u imidazola, EDTA, protonacijom histidina tako da se pH spusti ispod 4,5 ili kombinacijom navedenih metoda.



Slika 12. Shematski prikaz afinitetne kromatografije na nosa u s immobiliziranim metalom. Preuzeto od Drew D. i sur. 2008.

Protokol za pro iš avanje Rad51D proteina iz lizata bakterijskih stanica

- kolona za pro iš avanje proteina puni se s 0.75 mL Ni-NTA agaroze, a zatim ispira s 10 mL pufera za lizu
- 15 mL supernatanta izdvojenog centrifugiranjem nanosi se na kolonu
- uzorak koji je prošao kroz stupac se ponovno nanosi na kolonu
- kolona se ispira s dodatnih 10 mL pufera za lizu
- nespecifično vezani proteini se ispiru s 10 mL pufera za ispiranje
- vezani protein se ispira s 5 mL pufera za ispiranje, a eluat se skuplja u frakcijama od 1 mL

Sastav pufera korištenih za pro iš avanje proteina IMAC metodom

- pufer za lizu:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

10 mM imidazol

Materijal i metode

- pufer za ispiranje nespecifično vezanih proteina:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

30 mM imidazol

- pufer za ispiranje specifično vezanih proteina:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

500 mM imidazol

3.2.10.3. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom

Bradford metoda (Coomasie dye binding) je kolorimetrijska metoda koja se često koristi zbog svoje jednostavnosti i visoke osjetljivosti na gotovo sve proteine. Rezultati se dobivaju vrlo brzo. Coomasie boja (Brilliant Blue G-250) veže se na proteine pri kiselom pH i dolazi do promjene boje otopine od crveno-smeđe do plave. Apsorpcija se održava kod 595 nm. Smatra se da su za vezanje boje na proteine važne elektrostatske sile između sulfatnih aminokiselinskih ostataka u proteinima, te hidrofobne interakcije s ostacima aromatskih aminokiselina. Da bi se odredila koncentracija proteina radi se standardna krivulja s poznatim koncentracijama proteina.

U radu je metoda korištena samo za vizualno prezentiranje promjene boje, kako bi smo frakcije s najvišom koncentracijom proteina (najintenzivnije obojene) analizirali elektroforetski.

Da bi došlo do reakcije pomiješali smo 20 µL purificiranog proteina s 80 µL Bradford otopine i inkubirali 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Sastav Bradford otopine :

2,375% etanol

4,4% H₃PO₄

0,07% Coomassie Brilliant Blue

3.2.10.4. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

Molekulska masa većine proteina može se odrediti mjerjenjem pokretljivosti u poliakrilamidnom gelu koji sadrži deterdžent natrij-dodecilsulfat (SDS). Uz dodatak 2-merkaptoetanola gubi se sekundarna struktura, te kompleksi koji se sastoje od polipeptidnog lanca i molekula SDS zauzimaju konformaciju nasumične klupke. Proteini obično na ovaj način reagiraju se kao da svi imaju isti oblik i jednak omjer naboja i mase. To je zbog toga što je količina SDS vezana po jedinici mase proteina konstantna. Poliakrilamidni gel nastaje ko-polimerizacijom akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida. Velika pora određena je ukupnim sadržajem krutih tvari u gelu i stupnjem umreženja. Da bi došlo do polimerizacije gela najčešće se koristi APS kao inicijator reakcije i TEMED kao katalizator. Vertikalni gelovi se izljevaju između para staklenih predložaka koji služe kao potpora i zaštita od kisika. Predlošci se razdvajaju pomoću para razmaka i omogućuju izbor debeljine gela, između 0,5 i 2 mm.

Protokol za razdvajanje proteina u poliakrilamidnom gelu

- 10 mL 12%-tnog gela za razdvajanje, pomoću pipete, uliti između stakala
- na rub nepolimeriziranog gela nanijeti tanki sloj izopropanola
- ostaviti gel da polimerizira (jedan sat)
- izliti izopropanol kojim je gel bio naduvan, štrcaljkom isprati gornju površinu gela s deH₂O i odstraniti višak tekućine filterom
- nanijeti 5 mL 4% gela za sabijanje i umetnuti ešalj za formiranje jažica, ostaviti da polimerizira
- proteinske uzorke pomiješati s puferom za nanošenje uzorka u omjeru (1 V uzorka: 1/4 V pufera)
- uzorke s puferom kratko izmiješati i denaturirati 5 minuta na 95°C
- nakon hlađenja istaložiti neotopljene proteine 2 minute na 10000 g pri sobnoj temperaturi
- izvaditi ešalj iz polimeriziranog gela, te jažice isprati deH₂O

Materijal i metode

- gel smjestiti u aparatu za elektroforezu (korišten ure aj Mini-Protean II (Biorad))
*ako se koristi samo jedan gel potrebno je s druge strane elektrode u vrstiti stakleni predložak, da bi se sprije io mogu i kratki spoj
- uliti pufer za elektroforezu u komoru kadice i u prostor izme u gela i elektrode
- nanijeti uzorce, 5 µL uzorka po jažici; u jednu jažicu nanijeti biljeg (korišten je proteinski biljeg širokog raspona)
- dodati pufer za elektroforezu u gornji spremnik, poklopiti poklopcem i priklju iti elektrode

Uvjeti elektroforeze:

- sabijanje u gornjem dijelu gela 7,5 V/cm
- razdvajanje u donjem dijelu gela 12 V/cm

- kada boja do e do donjeg ruba isklju iti napajanje

- ✓ Recept za pripravu 10 mL 12%-tnog gela za razdvajanje

diH ₂ O	3,05 mL
1 mM Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL
10 % SDS	100 µL
30% otopina akrilamid-bisakrilamid (maseni omjeru 29:1)	4,0 mL
10% APS	50 µL
TEMED	10 µL

- ✓ Recept za pripravu 5,0 mL 4% gela za razdvajanje

diH ₂ O	2,87 mL
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 mL
10% SDS	50 µL
30% otopina akrilamid-bisakrilamid (maseni omjeru 29:1)	0,83 mL
10% APS	25 µL
TEMED	5 µL

Materijal i metode

- ✓ Recept za pripravu 10x pufera za elektroforezu (pH 8.3)

Tris	24 g
glicin	114 g
<u>SDS</u>	<u>10 g</u>
do 1 L dopuniti reH ₂ O	

- prije upotrebe pufer razrijediti 10 puta

- ✓ Pufer za nanošenje uzorka

1 M Tris (pH 6.8)	0,5 mL
glicerol	1 mL
<u>bromfenol plavilo</u>	<u>5 mg</u>
Nadodati deH ₂ O do 10 mL	

3.2.10.5. Bojanje proteina u gelovima

Postupak se koristi za detekciju proteinskih pruga u gelu.

Najčešće se koriste Coomassie briljant plavo R-250 ili G-250, boje koje se u kiseloj sredini elektrostatskim silama vežu za amino skupine proteina.

Prag osjetljivosti za Coomassie briljant plavo R-250 je 50 ng po pruzi proteina.

- boja (Coomassie briljant plavo R-250) se otopi u smjesi metanola, deH₂O i octene kiseline u omjeru (5V:4V:1V) do 0,1% koncentracije
 - poliakrilamidni gel se stavi u plastičnu posudu, prelije otopinom za bojanje i stavi na lagano miješanje
 - vrijeme potrebno za bojanje je oko sat vremena, nakon čega se gel oboji intenzivno plavom bojom
- otopina za bojanje se ukloni, a gel se ispere deH₂O kako bi se uklonio višak boje
- u posudu s poliakrilamidnim gelom doda se otopina za odbojavajuće i polaganje se miješa

-priprema otopine za odbojavanje:

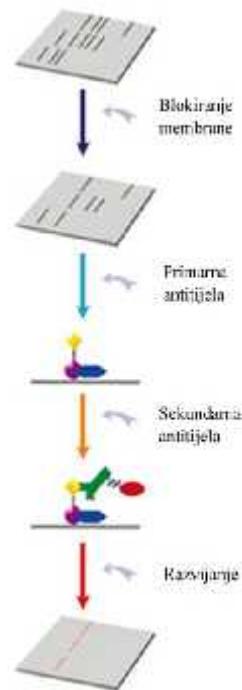
metanol, deH₂O i octene kiseline u omjeru (5V:8V:1V)

* kako bi se proces odbojavanja ubrzao može se mijenjati otopina za odbojavanje

- odbojavanje je završeno kada je pozadina gela gotovo prozirna, a intenzivno su obojene samo proteinske pruge

3.2.10.6. Western-analiza proteina

Western blot je analitička metoda koja omoguće prijenos proteina razdvojenih elektroforezom s poliakrilamidnog gela na nitrocelulozu ili najlon, podloge na koje se proteini vrsto vežu, i njihovu detekciju. Na gel se stavlja membrana, a zatim filter papir. Sve zajedno se zatim prenosi u pufersku otopinu koja se djelovanjem kapilarne sile pomije po filter papiru prema gore i prenosi proteine na membranu. Druga metoda prijenosa proteina je *elektroblotting* (engl.) gdje se za prijenos proteina koristi protok struje. Proteini se prenose na membranu zadržavajući raspored koji su imali na gelu. Tako vezani proteini pogodni su za analizu protein-ligand interakcija. Najčešće se koriste antitijela za detekciju određenih, specifičnih antigena. Takva proba može biti obilježena i omogućiti detekciju, ali će se biljezi stavljavati na sekundarno antitijelo. Kao biljezi mogu se koristiti radioaktivni spojevi, fluorokromi ili enzimi. Prednost stavljanja biljega na sekundarno antitijelo je u povećanju osjetljivosti metode te u injenici da se takvo sekundarno antitijelo može koristiti za detekciju različitih proba. Kako su membrane od ovih materijala izabrane, baš zbog svojeg svojstva da vežu proteina, a i antitijela su proteini potrebno je takvu interakciju onemogućiti. Blokiranje takvog nespecifičnog vezanja postiže se izlaganjem membrane razrijeđenoj otopini proteina. Za to se koriste BSA (Bovine serum albumin) ili nemasno mlijeko uz dodatak male kolićine deterdženta. Proteini iz otopine prihvataju se



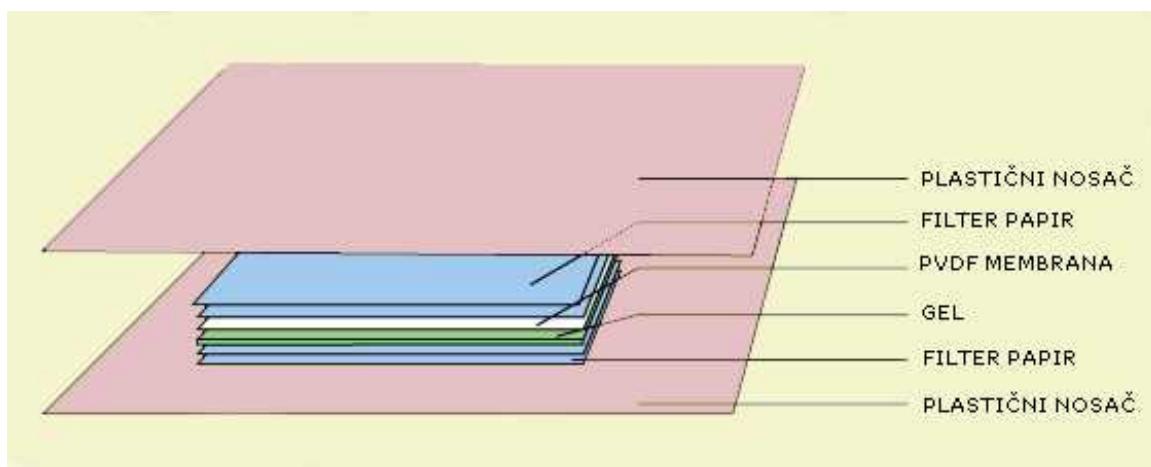
Slika 13. Shematski prikaz detekcije antigena vezanih na membranu. Preuzeto s www.tata-box.com.

Materijal i metode

na membranu na svim mjestima gdje se nisu vezali proteini preneseni s membrane. Antitijela se tako ne mogu i vezati nespecifično.

Protokol za prijenos proteina s gela na membranu

- prijenos proteina s gela na membranu se odvija u uređaju Mini Trans-Blot (Bio Rad)
 - sastav pufera za prijenos:
 - 25 mM Tris
 - 129 mM glicin
 - 20% metanol
- struktura za prijenos se slaže po uputama proizvođača (BioRad) kako je prikazano na slici 13.



Slika 14. Prijenos proteina s gela na membranu. Preuzeto s www.matcmadison.edu.

- membrana se inkubira 60 minuta u puferu za blokiranje (TBS i 5% BSA)
- inkubacija s primarnim antitijelima (Anti-His) u TBS puferu 90 minuta
- ispiranje nevezanih antitijela u TBS puferu
- inkubacija sa sekundarnim antitijelima u TBS puferu 45 minuta
- ispiranje membrane u TBS puferu
- inkubiranje membrane u otopini luminola i pojedinica (1:1)
- izlaganje membrane rendgenskom filmu

3.2.11. Bioinformatika obrada

Blast (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) omogu uje usporedbu aminokiselinskih sekvenci razli itih proteina ili nukleotidnih sekvenci sa sekvencama pohranjenim u genskoj banchi podataka, te identifikaciju sekvence koja sli i traženoj sekvenci.

Program se temelji na algoritmima koji prednost daju brzini a ne osjetljivosti, što je vrlo praktično s obzirom na ogromnu koli inu podataka koja je danas dostupna.

Program je dostupan na Internetu na stranici <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Koristili smo ga za prikupljanje proteinskih sekvenci Rad51 i Rad51D kod razli itih organizama, za odre ivanje položaja introna, te za odre ivanje aminokiselina koje sudjeluju u gra i važnih motiva.

Za usporedbu proteinskih sekvenci Rad51 i Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* sa sekvencama ovih proteina kod drugih vrsta korišten je program Clustal X. Program se koristi u molekularnoj biologiji za višestruku poravnavanje nukleotidnih i proteinskih sekvenci i za izradu filogenetskih stabala (Larkin i sur. 2007; <http://www.clustal.org/>).

Sekvence poravnate u Clustal X programu obra ene su u programu GeneDoc (Nicholas i sur. 1997) gdje su prilago ene za prijenos u Word dokument i printanje. Pomo u ovog programa je utvr ena i sli nost, odnosno broj identi nih baza u prou avanim sekvencama.

Program i njegov detaljan opis mogu se na i na Internet stranici:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gfx/genedoc/index.html>.

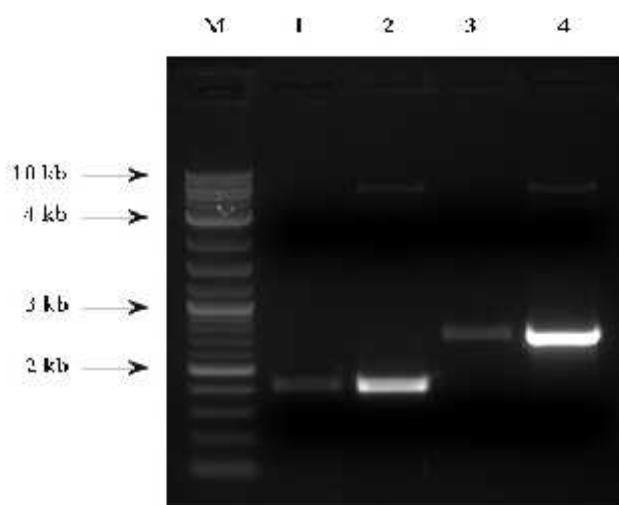
ExPASy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem) je server Švicarskog instituta za bioinformatiku (SIB) koji je specijaliziran za analizu proteinskih sekvenci i struktura. Preko servera je omogu en pristup brojnim bazama podataka povezanim s istraživanjem proteina (Gasteiger i sur. 2003). Internet adresa ovog servera je <http://www.expasy.org>. U ovom radu server je korišten za prevo enje nukleotidnih sekvenci u proteinske i analize proteina.

4. REZULTATI

4.1. Pretraživanje cDNA biblioteke

U Laboratoriju za molekularnu genetiku na Institutu Ruđer Bošković pretragom cDNA biblioteke izrađene na morskoj spužvi *Suberites domuncula* izdvojene su cDNA za C-kraj proteina Rad51 i kompletna cDNA za protein Rad51D. Njihova nukleotidna sekvenca je određena na uređaju *Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*.

Radi proučavanja strukture gena *rad51* i njegove daljnje manipulacije, na osnovi poznatog dijela nukleotidne sekvene osmišljene su i naredene po etnici. Iji slijed je naveden u poglavlju 3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline. U kombinaciji sa po etnicama T3 i T7, karakteristici su poznati za pBK-CMV plazmid u kojem se nalazi cDNA biblioteka, ije su karakteristike također opisane u prethodno navedenom poglavlju, provedene su PCR reakcije na biblioteci. Uvjeti u kojima su se reakcije provodile naznaju su u poglavlju 3.2.2. Umnožavanje DNA lanaca reakcijom polimeraze (PCR), u Tablici 2. Rezultati PCR reakcija provjereni su u jedan postotnom agaroznom gelu.



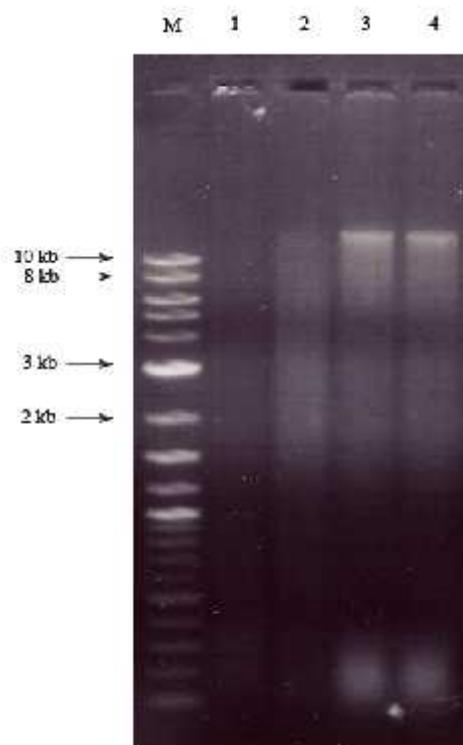
Slika 15. Umnažanje gena *Rad51* iz cDNA biblioteke napravljene na genomu vrste *Suberites domuncula*. U liniji M je marker veličine 0,1 do 10 kb, u liniji 1 je PCR produkt umnožen po etnicama T3 i rd1, u liniji 2 je pozitivna PCR kontrola, plazmid sa ugrađenim poznatim dijelom gena *Rad51* umnožen po etnicama T3 i rd1, u liniji 3 je PCR produkt umnožen po etnicama T3 i rd2, u liniji 4 je PCR kontrola umnožena po etnicama T3 i rd2.

U biblioteci nije pronađen N-kraj Rad51 proteina, dobiveni fragmenti veličine inom odgovaraju već poznatom slijedu koji je poslužio kao kontrola.

4.2. Izolacija genomske DNA

Nakon homogenizacije tkiva u teku em dušiku talog, koji sadržava stanice, je obra en po naputcima iz paketa *Qiagen Genomic DNA, Qiagen Blood and cell culture DNA*. Rezultat izolacije je provjeren elektroforezom u agaroznom gelu. Na gel je stavljen po 5 µL svakog od etiri uzorka.

U dva uzorka (uzorak 3 i 4) je dobivena visokomolekularna DNA s fragmentima ve im od 10 kb. Procijenjena koncentracija DNA u tim uzorcima je 100 ng/5 µL, odnosno 20 ng/µL. Ti uzorci su korišteni u dalnjem istraživanju.



Slika 16. Izolacija genomske DNA iz morske spužve *Suberites domuncula*. U liniji M nalazi se marker raspona od 0,1 do 10 kb, a u linijama 1-4 izolirana genomska DNA.

4.3. Analiza nukleotidnih sljedova cDNA koje kodiraju za proteine Rad51 i Rad51D

4.3.1. Rad51

Iz cDNA biblioteke izoliran je fragment duljine 669 pb koji kodira za C-kraj proteina Rad51. Pretragom cDNA biblioteke nije na ena cDNA koja kodira za cjeloviti Rad51 protein. Stoga smo pretragom genomske biblioteke iz morske spužve *S. domuncula* pokušali izvu i 5'-kraj gena koji nedostaje. Nukleotidni slijed cjelovite cDNA odre en je analizom nukleotidnih sekvenci fragmenata nastalih umnažanjem genomske DNA pomo u specifi nih po etnica rd1, rd2, rd3, rd4, rdrv. Na osnovu tih nukleotidnih sekvenci prona enih pomo u algoritma BLAST u bankama podataka na internetu, i njihovom usporedbom sa sekvencama kod drugih organizama, utvr ene su visoko o uvane regije za koje je zatim odre en okvir itanja. Promjena okvira itanja i nepostojanje sli nosti sa sekvencama u banchi podataka pretraženoj algoritmom BLAST bila su osnova za odre ivanje položaja nekodiraju e, odnosno kodiraju e DNA.

Ukupna cDNA za protein Rad51 duga je 1017 pb. cDNA fragment izoliran iz cDNA biblioteke zapo inje s citozinom i nedostaje mu 481 nukleotid na 5'-kraju cjelovite kodiraju e DNA. Izolirana cDNA iz biblioteke ima dodatnih 133 pb nakon stop kodona.

Nukleotidna sekvanca je u programu ExPasy prevedena u proteinsku. Protein Rad51 ima 338 aminokiselina, po inje aminokiselinom metionin iji kodon je AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UAA. Pomo u algoritma BLAST, preko dobivene aminokiselinske sekvence, utvr eni su o uvani motivi karakteristi ni za Rad51 porodicu gena, njihov položaj i primarna struktura. Prisutna su etiri motiva: Walker A i Walker B motivi koji sudjeluju u vezanju i hidrolizi ATP-a, ATP i BRC motiv. Walker A motiv stupa u kontakt s fosfatnim dijelom ATP molekule, a Walker B motiv ima ulogu koordinacije Mg²⁺. Op enita primarna struktura Walker A motiva sastoji se od osam aminokiselina i ima slijed (Gly/Ala)XXXXGlyLys(Thr/Ser), gdje X ozna ava bilo koju aminokiselinu. Kod proteina Rad51 iz morske spužve *Suberites domuncula* prva aminokiselina ovog motiva, glicin, nalazi se na 126. mjestu proteinske sekvence a cjelokupni slijed glasi Gly-Glu-Phe-Arg-Thr-Gly-Lys-Thr. Odre ena je i struktura Walker B motiva, koja se sastoji od pet aminokiselina. Prva aminokiselina, leucin, nalazi se na

Rezultati

217. mjestu proteinske sekvene, a posljednja aspartat nalazi se na 221. mjestu. Cjelokupna sekvenca glasi: Leu-Leu-Ile-Val-Asp.

agatatgtacgtggagtgcgtgagtctctcaaaagtaacttaactactgatatggctatg
M A M
caagcagaagtacacgatacagaagagcaagttgacgacgaacaatttggccacagctt
Q A E V Q H T E E Q V D D E Q F G P Q L
gtcaacaaattagaaggacagggtatcagtagccaatgtataagaaaactaagtgtaca
V N K L E G Q G I S T N D V K K L S D A
ggctaccacactatacgttcagtagccatgcccccaagaaggctctcatactcatctct
G Y H T I E S V A Y A P K K A L I L I S
ggaataagtgaagctaaagttagacaagatacagaatgaagctgccaagcttgtgcctatg
G I S E A K V D K I Q N E A A K L V P M
ggattcaccacagcaacggagttcatcaacgtcgctcagagattatccaactcacaaca
G F T T A T E F H Q R R S E I I Q L T T
ggctaaaaagagctcgataaacttttagggggtggtatagagacgggatccattacagaa
G S K E L D K L L G G G I E T G S I T E
atgttcggagaatttagaactggaaagactcaactttgtcacacacttgctgttacttgt
M F G E F R T G K T Q L C H T L A V T C
cagttaccaatagatggaggagggtggtagggaaagtgtctgtacattgaca cagaggc
Q L P I D G G G E G K C L Y I D T E G
acattcagaccagagagactgtctgttagctgaaaggtatgggtctggatcagat
T F R P E R L L A V A E R Y G L S G S D
gtgtggataatgttagcatatgtcgagcctacaacactgaccatcaaggctcagactg
V L D N V A Y A R A Y N T D H Q G Q L I
ttgcaaggcgtcagccatgtggcagaatcaagatatgtctactcatcgacagtgcc
L Q A S A M M A E S R Y A L L I V D S A
acggcattatatcgcacagactactctggcagaggttagtgcgagacaatgcact
T A L Y R T D Y S G R G E L S A R Q C T
tggcaagaatatctcagaactttgtctactggcagacgagttggggtgccgtgg
W Q E Y L R T L L L A D E F G V A V V
ataactaatcaggttagtggcacaagtggatggcatcaatgtttgtactgaccccaag
I T N Q V V A Q V D G A S M F A T D P K
aaaccaattggagggaaacattattgcacatgcgtctactacaagattatctcaaaaag
K P I G G N I I A H A S T T R L Y L K K
gacgagggggagaccagaatatgtaaagatataatgattctccctgttgcctgaagcagag
D E G E T R I C K I Y D S P C L P E A E
gcaatgttgctataatgcgtatggagactccaaggactaactgtatgtgc
A M F A I N A D G I G D S K D
aagtatttcattcatctcagattttgttacaatagttcatctgcctaacttgtccttgc
ctttgttaagcaacatgttatgtcattgtttgtgcacagttgcaccaataagacatt

Slika 17. Usporedan prikaz nukleotidne i proteinske sekvene proteina Rad51.

Zeleno-Walker A motiv, roza-Walker B motiv, ljubi asto-BRC domena, podcrtano-aminokiselinski ostatci u izravnoj vezi s ATP molekulom. Sivo ozna eni kodoni za po etak i kraj proteina Rad51, crveno po etni kodon prona en u cDNA biblioteci.

ATP motiv sa injava sedam aminokiselina koje su u izravnom kontaktu s molekulom ATP vezanom u aktivnom mjestu. Aminokiseline nisu, kao u slu aju Walker A i B motiva, u uzastopnom slijedu, one dolaze u neposrednu blizinu stvaranjem nativne strukture proteina.

Rezultati

etiri aminokiseline ove domene su sastavni dio Walker motiva: Phe-128, Lys-132, Thr-133 su sastavni dio Walker A motiva, a Asp-221 je dio Walker B motiva. Ostale tri aminokiseline, Tyr-158, Asp-160 i Glu-162, nalaze se u primarnoj strukturi izme u ova dva motiva.

BRC motiv koji ima ulogu u polimerizaciji Rad51 monomera na DNA molekulu gra en je od dvadeset aminokiselina: Leu-157, Ile-159, Pro-167, Leu-170, Leu-185, Val-188, Ala-189, Ala-190, Leu-202, Leu-203, Leu-204, Gln-205, Ala-206, Ser-207, Met-209, Thr-250, Leu-253, Leu-254, Glu-257, Phe-258.

Sekvenca za protein Rad51 spužve *Suberites domuncula* i sekvence 13 razli itih eukariotskih organizama, koje su preuzete s interneta pomo u algoritma BLAST, poravnate su pomo u programa Clustal X i obra ene programom GeneDoc. Organizmi su birani tako da obuhvate sve razine u razvoju eukariota: niži beskralježnjaci, viši beskralježnjaci, kralježnjaci i biljke. Odabrane su slijede e vrste: *Homo sapiens* (HS), *Rattus norvegicus* (RN), *Mus musculus* (MM), *Bos taurus* (BT), *Gallus gallus* (GG), *Xenopus laevis* (XL), *Danio rerio* (DR), *Ciona intestinalis* (CI), *Strongylocentrotus purpuratus* (SP), *Drosophila melanogaster* (DM), *Caenorhabditis elegans* (CE), *Dyctiostelium discoideum* (DD), *Arabidopsis thaliana* (AT).

Sekvenca za protein Rad51 kod spužve *Suberites domuncula* vrlo je sli na sekvcencama kod kralježnjaka, ve e razlike su vidljive samo na N-kraju. Razlike su nešto ve e ako uspore ujemo sekvencu sa sekvcencama kod beskralježnjaka i biljaka. Pa tako vrste *Caenorhabditis elegans* i *Dyctiostelium discoideum* imaju 15 odnosno 9 aminokiselina više na samom po etku sekvence za ovaj protein.

Rezultati

SD :	MAMQAEVQ-HTEEQVDD-EQFGPQLVNKLLEGQGISTNDVKLISDAGYHTESVAYAPKKALILISGISEAKVDKI	:	73
HS :	MAMQM LEANADTSVEEESFGPQPISRL EQCGINANDVKLLEEAGYHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKI	:	74
RN :	MAMQM LEANADTSVEEESFGPQPISRL EQCGINANDVKLLEEAGYHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKI	:	74
MM :	MAMQM LEA SADTSVEEESFGPQPISRLEQCGINANDVKLLEEAGYHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKI	:	74
BT :	MAMQM LEANADTSVEEESFGPQPISRL EQCGINANDVKLLEEAGYHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKI	:	74
GG :	MAMQV FEASTDTSAEEESFGPEPI SRLEQCGINANDVKLLEEAGYHTVEAVAHAPKKELLNIKGISEAKADKI	:	74
XL :	MAMQAHYQA EAT--EEENFGPQAI TRLEQCGINANDVKLLEDAGFHTVEAVAYAPKKELLNKGISEAKAEKI	:	71
DR :	M RNASRVEVEAEVE-EEENFGPQPVS RLEQSGISSLSDIKLLEDGGFHTVEAVAYAPKKELLNKGISEAKADKI	:	73
CI :	M SVMQS VSENKEN-IEEENCGPLL INKL EQSGISAGDIKKLKEHGHYHTEVALAYAPKKELIGVKGISEAKADKI	:	73
SP :	MAMQM HNAEAEQEV- EEFGPLG ISRN L ASG ISSNDVKL EEAGM HTEVESVAYSTKKTLCAVKGISEAKADKI	:	70
DM :	-MEKL TNVQAQQ EEE EGLSVTKL LIGGSITAKD KL QQASLHTVEVANATKKQLMA PGLGGKVEQI	:	71
CE :	MSAQASRQKKSDQE QRA D QALLNAA IEDNAMEQDENFTV HDRI ESSG ISSGD IKL KEAGYY TYE LAFTTR RELNRV KGISDOKA EKI	:	90
DD :	-MASRQRQ QEEEEE DIENE QQQ EEE EEESYLS IN L EGNGINA ADLKKL Q EQGLNT Q VAF TTKKTLTG KGIS EQ KADKL	:	84
AT :	-MTT EQRRNQN AV QQQDDE TQHGPFP VEQLO AA GIA SV DVKL RDAGLCT VE EV ATPRKD LL OIKG ISDA KV DKI	:	77

SD :	QNE AKKVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQLCHTL AVTCQLPID G GG E KG C LY I DTEG	:	163
HS :	LAEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQICHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	164
RN :	LAEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQICHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	164
MM :	LTEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQICHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	164
BT :	LTEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQICHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	164
GG :	LAEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQLCHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	164
XL :	LAEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQLCHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	161
DR :	LTEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEMFGEFFRK GKTQLCHTL AVTCQLPID R GG E KG A MY I DTEG	:	163
CI :	IIBAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEIFGEFFRK GKTQICHTL AVTCQLPI EQG GG E KG C LY I DTEG	:	163
SP :	LTEAAKIDVPMGFTT TATEFHQRSEIIQIITGS KELDKL LOGGIETGSITEIFGEFFRK GKTQLCHTM AVTCQLPID N GG E KG C LY I DTEG	:	160
DM :	ITPAKIDVPLGFLSARTY Q MRADVVQL STGS KELDKL GG E KG C LY I DTEG	:	161
CE :	MKEAKIDVQMGFTT TGAE VVKRSOLVQ IR TSAS L DR LLGG E KG C LY I DTEG	:	180
DD :	LAEAAKIDVEMGFTT AT DINKARA EIIQIITGS KEDS L LDGG E SG SITEIFGEFFRK GKTQICHTL C VT C QLGYSQ GG E GR A LY I DTEG	:	174
AT :	VEAASKIDVPLGFTS A SQ LC AQ OEIIQI SGS RELDK V LEGG IETGSITELY GEFR S GKTQLCHTL C VT C QLPMDQ GG E KG A E GA E G	:	167
* * * * *			
SD :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RAY NT D HQG QL LL Q AS AM MA ES R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OC TW QE YL R T LL	:	253
HS :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RA F NTD HQ T Q LL Y Q AS AM M V E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	254
RN :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RG NT D HQ T Q LL Y Q AS AM M V E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	254
MM :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RG NT D HQ T Q LL Y Q AS AM M V E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	254
BT :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RG NT D HQ T Q LL Y Q AS AM M V E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	254
GG :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RG NT D HQ T Q LL Y Q AS AM M V E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	254
XL :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RA F NTD HQ T Q LL Y Q AS AM M M E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	251
DR :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RA F NTD HQ T Q LL Y Q AS AM M M E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL AR FL R M LL	:	253
CI :	TFRPERIL L AVA B RY GL SG SD VLD DN V AY A RAY NT D HQ S Q LL Y Q AA AM M SET R Y V V U D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM HL GR FL R T LL	:	253
SP :	TFRPERIL I AVAD R YNL SG SD VL D DN V AY A RA F NS DHQ S Q LL Y Q AS AM M A E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y S GR GE L S AR OM H GR FL R T LL	:	250
DM :	TFRPERIL A IA A Q R Y K LN E S V LD N V A FA T R H N S D Q Q T K L I Q M A G M L E S R Y ALL IV D S AM AL YR SD Y 1 GR GE L A AR ON H G L F L R M Q	:	251
CE :	TFRPERIL I IA A Q R Y N M D A H V L E N I A V A RAY N S E H L M A L I I R A C AM M S E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y A GR GE L A D R O H L A R FL R L T Q	:	270
DD :	TFRPERIL I IA A Q R Y N M D A H V L E N I A V A RAY N S E H L M A L I I R A C AM M S E S R Y ALL IV D S AT AL YR TD Y A GR GE L A D R O H L A R FL R L T Q	:	264
AT :	TFRPQR I Q I AD R G L N C A V L E N V A RAY N T D H Q S R L L E A S M M I E T R F A L L I V D S AT AL YR TD Y F S GR GE L S AR OM H L A R FL R S L O K	:	257
* * *			
SD :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-SMF A TP D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G I C D SK D -	:	338
HS :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	339
RN :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	339
MM :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	339
BT :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	339
GG :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	339
XL :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F A D PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	336
DR :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F S A D P PK K PI G GN I I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N A D G V C D AK D -	:	338
CI :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G G-AM C A D PK K PI G GN H I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E SE V M F C I N S D G I Q T K D -	:	338
SP :	LADEY GV V V V IT N Q V VA Q VD G A-AM F T S D PK K PI G GN H I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE AM F A I N P F C V G D A K D -	:	335
DM :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q LD G AP G MF-DA K PI G GH I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E SE AM F A I L P F G I C D A R E S -	:	336
CE :	LADEY GV V V V IT N Q V VA Q VD G GAS M FQ A D K PI G GH I A H S STR L Y L KK D E G ET R I C K I Y D SP C LP E AE A T S I T N H G I E D A R E S -	:	357
DD :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G AG G MFNP D PK K PI G GH I A H S STR L SL R K G K E M R I C K I Y D SP C LP E SE K P F G I Y S G I D Y K E Q	:	351
AT :	LADEF GV V V V IT N Q V VA Q VD G S- AL F A G P Q K PI G GN I A H S STR L AL R K G A E R I C K V I S SP C LP E AE A R F O I S T E G V I D C K D -	:	342

Slika 18. Usporedba primarne strukture proteina Rad51 iz vrste *Suberites domuncula* sa strukturu ortologa kod 13 različitih eukariota. Crno su označene aktevine kod svih organizama, tamno sivo aktove u odabranim vrstama, svijetlo sivo aktove u manjeg broju vrsti. Zvjezdicama su označene ene aktove u Walker A i B motiva, a crne u izravnom kontaktu s ATP molekulom, a plave u BRC motiva.

Rezultati

Uz pomo programa GeneDoc sli nost sekvenci je iskazana u postotcima.

Tablica 6. Udio identi nih i sli nih aminokiselinskih ostataka u proteinu Rad51 iz vrste *Suberites domuncula* usporedbom s 13 razli itih eukariotskih organizama. Plavo osjen ani postotci ozna avaju udio identi nih aminokiselina, a postotci bez ispune ozna avaju broj sli nih aminokiselina.

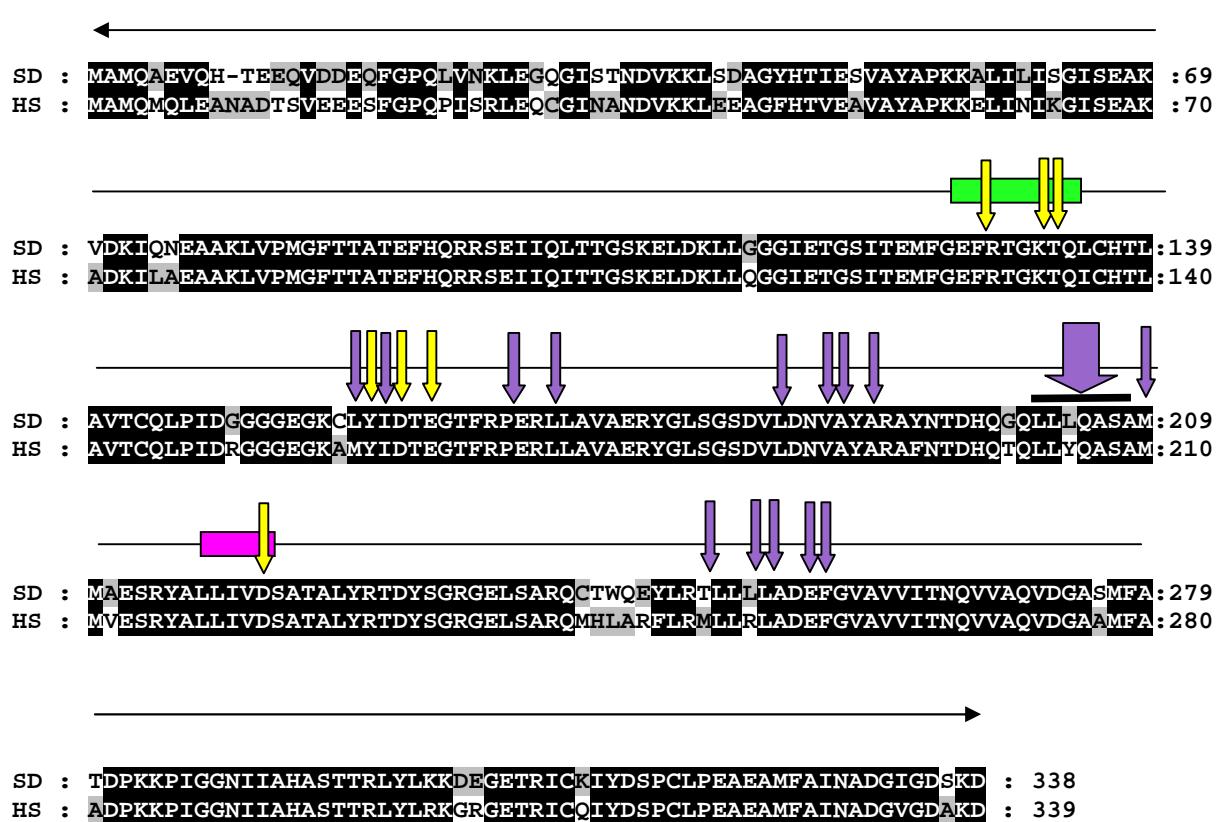
	SD	HS	RN	MM	BT	GG	XL	DR	CI	SP	DM	CE	DD	AT
SD		82% 90%	83% 89%	83% 89%	82% 89%	82% 89%	83% 88%	80% 88%	77% 88%	79% 87%	63% 78%	54% 72%	64% 76%	64% 80%
HS			99% 99%	98% 99%	99% 99%	95% 98%	94% 97%	89% 95%	81% 92%	83% 90%	64% 79%	55% 73%	67% 78%	67% 83%
RN				99% 99%	99% 99%	96% 99%	94% 96%	89% 94%	81% 91%	83% 90%	64% 78%	55% 73%	67% 78%	67% 83%
MM					99% 100%	96% 98%	93% 96%	89% 95%	81% 91%	83% 90%	65% 79%	55% 73%	67% 77%	67% 83%
BT						95% 98%	94% 96%	89% 95%	81% 91%	83% 90%	65% 79%	55% 73%	67% 78%	67% 83%
GG							93% 97%	88% 94%	79% 91%	83% 90%	65% 79%	56% 74%	67% 78%	67% 83%
XL								90% 94%	80% 90%	83% 91%	65% 78%	56% 73%	67% 78%	67% 83%
DR									80% 91%	81% 89%	66% 79%	54% 73%	66% 79%	67% 83%
CI										78% 91%	63% 79%	56% 74%	68% 80%	63% 83%
SP											66% 80%	56% 73%	67% 79%	64% 83%
DM												50% 66%	62% 73%	56% 73%
CE													53% 73%	48% 70%
DD														57% 77%
AT														

Sekvenca proteina Rad51 najsli nija je sa sekvencama kod organizama *Rattus norvegicus* (RT), *Mus musculus* (MM) i *Xenopus laevis* (XL) s kojima ima 83% identi nih aminokiselina. Udio sli nih aminokiselina koje se pojavljuju na istom položaju je najve i za ovjeka *Homo sapiens* (HS) i iznosi 90%. Proteinska sekvenca ovog proteina je u visokom postotku sli na sa sekvencama kod svih odabralih kralježnjaka. Sli nost je nešto manja ako se uspore uje sekvenca ovog proteina sa sekvencama beskralježnjaka kao što su: *Drosophila melanogaster* (DM), *Caenorhabditis elegans* (CE) i *Dictyostelium discoideum* (DD). Udio identi nih, odnosno sli nih aminokiselina s *Arabidopsis thaliana* (AT), jedinim predstavnikom biljaka iznosi 64 i 80%.

Proteinska sekvenca proteina Rad51 iz *Suberites domuncula* uspore ena je s proteinskom sekvencom *Homo sapiens* kako bi se prou ila o uvanost aminokiselinskih ostataka koji ine motive važne za funkciju ovog proteina. Vrsta *Homo sapiens* je odabrana kao predstavnik kralježnjaka s kojim je utvr ena visoka homologija ove proteinske sekvene.

Podru ja Walker A i Walker B motiva dijele sve aminokiseline, imaju 100% homologiju. Aminokiseline na tim položajima su identi ne. Sedam aminokiselina koje su u direktnom doticaju s ATP- molekulom kad se ona nalazi u aktivnom mjestu tako er su identi ne u proteinima kod oba organizma. Razlike se javljaju samo kod BRC motiva koji sudjeluje u povezivanju monomera ovog proteina. Prvih 11 aminokiselina je identi no, a zatim je Leu-204, aminokiselina s nepolarnim bo nim ogrankom kod spužve, kod ovjeka zamijenjena polarnom aminokiselinom tirozinom. Slijede e etiri aminokiseline su opet identi ne, a zatim se na mjestu Thr-250 kod ovjeka nalazi metionin, a na mjestu Leu-253 arginin. Tri posljednje aminokiseline koje ine BRC motiv su zatim ponovno identi ne u proteinima Rad51 iz oba organizma.

Rezultati



Slika 19. Poravnote proteinske sekvence Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula* i ovjeka *Homo sapiens*. Crno su osjenane identi ne i sli ne aminokiseline. Zeleni pravokutnik se nalazi iznad aminokiselina koje sa injavaju Walker A motiv, a roza pravokutnik iznad Walker B motiva. Žutim strelicama su označene aminokiseline koje su u izravnom kontaktu s molekulom ATP-a, a ljubičastim aminokiseline koje su dio BRC motiva (šest uzastopnih aminokiselina označeno je debljom strelicom i dodatno označeno crnom crtom).

4.3.2. Rad51D

Izolirana cDNA za gen *rad51D* duga je 960 pb. Njena nukleotidna sekvenca je pomo u programa ExPasy prevedena u proteinsku sekvencu. Na N-kraju te sekvence nalaze se dva AUG kodona koji kodiraju za metionin i ozna avaju potencijalni po etak kodiraju e regije, odnosno kodiraju za start. Prvi start kodon po inje nukleotidom na desetom mjestu, a drugi nukleotidom na etrdesetom mjestu. Stop kodon UGA nalazi se na 883. mjestu nukleotidne sekvence. Usporedbom s proteinskim sekvencama Rad51D kod drugih organizama prepostavljamo da sinteza Rad51D proteina kod morske spužve *Suberites domuncula* po inje od prvog metionina na N-kraju te stoga protein ima 291 aminokiselinski ostatak, a ne 281 koliko bi bilo u slu aju da translacija kre e od drugog metionina. Kodiraju a DNA je duga 885 nukleotida. Odre eni sljedovi nukleotida analizirani su putem www-servisa izravno na internetu pomo u programa BLAST, koji traži mogu e homologije s proteinima pohranjenim u bankama podataka. Usporedbom dobivene proteinske sekvence za protein Rad51D kod spužve *Suberites domuncula* s homolognim proteinskim sekvencama kod drugih vrsta, utvr en je položaj visoko o uvanih domena. Domena klju na za vezanje i hidrolizu ATP-a sastoji se od dva prostorno odvojena motiva: Walker A motiv koji stupa u kontakt s fosfatnim dijelom ATP molekule i Walker B motiv u ijem sastavu je važna aminokiselina aspartat koja ima ulogu koordinacije Mg²⁺. Walker A motiv ima slijed (Gly/Ala)XXXXGlyLys(Thr/Ser), gdje X ozna ava bilo koju aminokiselinu, u ovom slu aju Walker A motiv po inje Gly na 108 mjestu i ima slijede u primarnu strukturu: Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Gly-Lys-Tre. Walker B motiv gra en je od pet aminokiselina Leu-Val-Ile-Ile-Asp, a prva aminokiselina Leu nalazi se na 205 mjestu proteinske sekvence.

Sedam aminokiselina je u izravnom kontaktu s vezanom molekulom ATP-a, etiri su sastavni dio Walker motiva (Pro-109, Lys-114, Tre-115, Asp-209), a tri aminokiselinska ostatka (Tyr-136, Asp-138, Ala-140) nalaze se izme u ta dva motiva. Na N-terminalnom kraju proteina nalazi se domena važna za povezivanje Rad51D s drugim paralozima koji sudjeluju u BCDX2 kompleksu, domena je gra ena od dvadeset aminokiselina: Ala-135, Ile-137, Ala-145, Val-148, Leu-170, Ile-173, Arg-174, Phe-176, Ile-192, Val-193, Asn-194, Gln-195, Val-196, Asp-197, Tyr-199, Ala-236, Val-239, Leu-240, Asp-243, His-244.

Rezultati

ggcacgagcatgcaaacgcgtgaacgcataatgaataagtctgtctgaggag
M Q T H V N A S C I M N S L S E E
gtccgttagcaagctgaagggtggcaggtatcagatcagttgttattacgttatctgcct
V R S K L K V A G I R S V V D Y V S C P
cctgaaagaatagcctcaaaaactggattccatataaggaagtcgttcaaataacgcaga
P E R I A S K T G F P Y K E V V E I R R
aagtttctacatcagttggatgccccccgtgcccgttagcaacctgtggaaagagctt
K F L H Q F G C R P V A A S N L W K E L
tcgtcaacatcagcaatcttaccaacaggttgcagaaatctagatgagttattggatgga
S S T S A I L P T G C R N L D E L L D G
gggccttgcaccggtagctgacagagttgtggaccccgatggggaaaacacag
G L L T G E L T E L C G P P G A G K T Q
gtatgtctccgtggccatgttgcacacaagactccactgttagcatatata
V C L S V A G H V A M T T S S T V A Y I
gactgtgtggatcatgttgcacacttgttgcacatcgtaacatcacgttttagac
D C A G T F D A Q L V E R I V T S R L D
gaaggggcaagagagttgttgatgttgcattgaggattcgatgttcaatgtgtttca
E G Q E S V E C S L S R I R V F N V F S
atattttatctactcttttttatcatctctcaagatgacatcgtaaatcaggtggat
I F Y L L S F L S S L Q D D I V N Q V D
gcgtattatagcaaccttcatcttgcataattgaccctgtgacctctcatatctccc
A Y Y S N L H L V I I D P V T S L I S P
caccttggtagcatcagactcacggcacagttgtatggtccaactggcttggcttg
H L G G H Q T H G H S L M V Q L V L A L
agagtcctggcaatgatcatgcaatagctgtactgtacacaaacaatggatagat
R V L A N D H A I A V L Y T N N M V I D
ttcaacagtgggtttgaaaccagccctggcctcacatggcacacactccctccaca
F N S G G L K P A L G L T W S H T P S T
cgagtcacgctggcaccaccctcacagatgaggcgagccctgaaattagctacaatca
R V T L G T T L T D E A S P -
cgaaatcatctaaacaggtttaggtgtccacaacattcaccatcacaagcagtggag

Slika 20. Usporedan prikaz nukleotidne i proteinske sekvene proteina Rad51D Zeleno-Walker A motiv, roza-Walker B motiv, plavo-domena za povezivanje podjedinica u kompleksu, podcrtno-aminokiselinski ostaci u izravnoj vezi s ATP molekulom.

Sekvenca za protein Rad51D spužve *Suberites domuncula* uspore ena je sa sekvencama 13 različitih eukariotskih organizama. Odabrani organizmi su isti kao i za protein Rad51: *Homo sapiens* (HS), *Rattus norvegicus* (RN), *Mus musculus* (MM), *Bos taurus* (BT), *Gallus gallus* (GG), *Xenopus laevis* (XL), *Danio rerio* (DR), *Ciona intestinalis* (CI), *Strongylocentrotus purpuratus* (SP), *Drosophila melanogaster* (DM), *Caenorhabditis elegans* (CE), *Dictyostelium discoideum* (DD), *Arabidopsis thaliana* (AT). Proteinske sekvene su preuzete iz banke podataka s interneta pomoći u algoritma BLAST, poravnate su pomoći u programa Clustal X i obrađene u programu GeneDoc.

Rezultati

SD :	-----MOTHVNASCIMNSLSEEVRSKLLKVAGIRESVVVDYVSCPPEERASKTGFPYKEVVEIRRKFHLQFGCRPVAAASNLWKEISSTSAILPTGCRN	: 90
HS :	-----MGVLRLVGLCPGLTEEMIQQLRSHRIKTVVLDVSADLEEAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAPPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS	: 88
RN :	-----MGMLRAGLCPLTEEMIQQLRGRKIKTVAIDLAAADLEEAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAPPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS	: 88
MM :	-----MGMLRAGLCPLTEEMIQQLRGRKIKTVAIDLAAADLEEAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAPPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS	: 88
BT :	-----MGVLRLVGLCPGLTQDMVQQLQSRGIKTVVLDVVCADLEEAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAPPFNGADLYEELKTSTAILSTGIGS	: 88
GG :	-----MVVLRAGLCPGLTEEMIQQLRANNIRTVVDFVSSDLEDVAQSCSLSYKALAVRVRVLLAQFSAPPNGADLYEELKSSTAILPTGNPS	: 88
XL :	-----MVILREGLCPLSTGIVAAALKANNVKTVIDLVASDLEELARKCSDLSYKTLMAVRRVLLAQFSAPPFSGADVYEEELKSSTAILPTANRK	: 88
DR :	-----MVVLREGICPGINEDFIKALQTEDIRTVEDFVSWNPPEELAQKCSLSYKALVAVRRVLLAQYTAPISGADLYEELLSSTAILSTGSPS	: 88
CI :	-----MPSLLLAGLCPALTQDVIVKLESKGIVELDFAVADPERITAMCGIPYKKVMSIRRVLIAQYSAPPNGADLYEELKTSTAILSTGIGS	: 88
SP :	-----MVPDNGRTE-YKVLISSSIQRLLAQYSAFFINGSDLYDEVISTVAYLSTGCD	: 51
DM :	-----MGSHQLHFAVFGSCFEADTLVEISGPNGSGKSLVQQIUAHCLVPYKFGGR-QWSVLLNLSHKINRESLAKSIRMELKAYSVG---	: 84
CE :	-----MDPSENVFKYETAY-----DLVRLGAERLFLRLTCLSI	: 33
DD :	MEEEISIGLEVRFYQTQCLSEDNVIKFENNGYPMIDLILFSDAYQIQRNTSIPPIETVTLLIQRNLQRLFSVPEINGYQHLDVKEFKTHYSSCIKL	: 95
AT :	-----MFVLMMAFLKIAVED-----FLIHDLYELTAFSQRTNADRLLKEGTLLISLIERQCRPLVNGLKILLEDHRNKHTLSTGDKE	: 77

SD :	LDDELLDG-GLLTGELETIICPPGAKGKTVQVCLSVAGHVAMTTSTVAYIDCACTFDQIVERIVTSRLDE-----G	: 159
HS :	LDKLLDA-GLYTGEVTEIVCGPGSGKTQVCLCMANVAHGLQCNVLYVDSNGGLTASRILLQLLQAKTQ-----D	: 156
RN :	LDKLLDA-GLYTGEVTEIVCGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQCNVLYVDSNGGMATASRILLQLLQARTQ-----D	: 156
MM :	LDKLLDA-GLYTGEVTEIVCGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQCNVLYVDSNGGMATASRILLQLLQARTQ-----D	: 156
BT :	LDKLLDA-GLYTGEVTEIVCAPGSGKTQVCLCVAAHVAHGLQCNVLYIDSNGGLTASRILLQLLQARTP-----D	: 156
GG :	LDQLLDA-GLYTGEVTEIACAPGSGKTQVCLSIASVSLGLRQHVFILDSSTGGFTASRILYQMLQARVE-----D	: 156
XL :	LDIILDS-GLYTGEVTEIACAAAGSGKTQMCQSIAVNVAYSLKQTVLYVDTTGLTASRILLQLVQVSRT-----N	: 156
DR :	LDKLLDS-GLYTGEVTEITGSPGSGKTQVCFSVAVNISHOLQKTVVYIDTGGMCANRILLQMLQTKTP-----N	: 156
CI :	LDLILDA-GLYTGEVTEIVCPSSSGKTQLCETFVNVAASFQDNVIYIDTAGGFSAVRGEGIFKKRFS-----S	: 156
SP :	IDKLLDG-GVYTSELTEIVCQAAVGKTOFLTLASCVAVSSEQNVLFIDTNGGFHASRILHDIIAHKST-----S	: 119
DM :	--EVIAAKCPTEEQLAEIACECMSRVRFLNCFANDDVSTSLIDARYAINDPGIQLVAMDTLS-----	: 145
CE :	LDPVIEL---HPGKCYEIDGDLGVGKTQICYSFAAKFLQTKTAKIGWIGATPLRTDHILLHIEHFGN	: 98
DD :	LDQLIGGNGFTSGEIYEVVENTSCGKTISMCCSCLNLSQQYNSNIYIDSSNSFSPERLIEIFKSNYLIKQROKQQQQKQHQKQQENNNDKIE	: 190
AT :	TDSLHQG-QFREGQLTIVCPSSSGKTQFCMQAASVAENHGRVLYLDTGNSFSARRIAQFICSSSD-----	: 144
* * * * *		
SD :	QESVECISIIRRVFNVFSITYLLSFLSSLQDDIVVNQVDAY-----YSNLHLVIIIPVTLISPHLG-CHQTHGHSLMVQIVLALIRVLANDHAI	: 246
HS :	EEEQAEMIQRIVVHADFQMLDVLQELRGTVAAQVVTGS-----SGTVKVVVVDSTAVVSPLLG-CQOREGLALMMQIAREIKTLLARDLGM	: 243
RN :	EEKQASAIQRIVVHFSDFIDFQMLDMLQDLRGTMQAATAS-----SGTVKVVIVDSTAVVAPLLG-CQOREGLALMMQIAREIKTLLARDLGV	: 243
MM :	EEKQASAIQRIVVRSFDIIFRMLDMLQDLRGTAIAQQEATS-----SGAVKVVIVDSTAVVAPLLG-CQOREGLALMMQIAREIKTLLARDLGV	: 243
BT :	EEEQAGAIQRIVVRAFDIFQMLDVLQDLRGAVSQVSSS-----SGTLKVVVVDSTAVVAPLLG-CQOREGLALMMQIAREIKTLLARDLSV	: 243
GG :	KEEQLEANIQRIVVRFMDIYEMLRAHEVDCISQVVESS-----AGPLKAVLIDSVSAVLSPLLG-CQREGLAIMMQIAREIKTLLAKEFSV	: 243
XL :	EDEOVASITRIEVFVDFIKLLDAFQDLRHKISQQLRS-----GEPLRLVIIIDSVCAVYPMLG-CKHTEGMAIMMQIARELQTMADHYHL	: 243
DR :	EQQMEAIQRIKVFRVFDVBSLLACLQNLRSTGLQKMSVG-----GGSVKALMVDSVSAVLSPILG-CQNEGMSLLMVOAGELKMIAKDFN	: 243
CI :	HN-TSATMSIIRIVSRCEVSELRETTDLVRRKMSAQDET-----FSSLKVVVHDSTVSLSTVLYNCTFVEGMASLSQIGRQLNALAKDFAL	: 243
SP :	EKITSAAIHVKHCATTFDLYDLDLLESIKASIDSASEAF-----YSSLKLVVVDSTAVIAPLLG-CKHSE-----GEHFIV	: 191
DM :	--EFYWIIDEPKIAKRMSMYRHYRLQARLEKLUCKDAIVCG-----MYTVESAFFENRGENLPEAG--IKYHVRMOKIQNQILINGLPLFSN	: 229
CE :	-QTNEDIIDRIVCKRVEKIAELQDSLTRFLDTIN-----LQLVIVENTIDAILHDTWY-HKEMGRSMQSDVVERIR-KLTKLE	: 173
DD :	QDKLKIIDRIKVFNCFDSITLLELLSTDSTLSSIISDEIPTFENQFYGLKLMVVDISI GTLLAPIIG-CKOTQGHYTMIMIISRLIKYIADTYQ	: 284
AT :	ATLGQKVMISRLCHTVYDIYTFDTLQDIEITLRLQMNVN-----ESRLRLVVDSISSLITPILG-CSGSGQRALMVAIGYLLKKLAHEHS	: 231
* * * * *		
SD :	AVLYTNNAVIDFNSGGLK-----PALGLTWSHTPSTRVTLGTT-----LTDEASP-----	: 291
HS :	AVVVVTNHITRDRSGRLK-----PALGRSWSFVPSTRILLDTIEGAGASG-GRRMACIAKSSRQPTGFQEMVDIGTWGTSQSATLQGDQT	: 328
RN :	AVVVVTNHITRDRDSRRFK-----PALGRSWSFVPSTRILLEVFEAGATLGRSQRVTWLRIKSPRQPTGLQEVIDIGTLGTEEQSPELPGKQT	: 329
MM :	AVVVVTNHITRDWDGRRFK-----PALGRSWSFVPSTRILLDTQSSGSLG-SWRVVCVLTKS PRLPTGCQETVDLGLSLGTPAFQGDHKGH	: 329
BT :	AVLVTNHNMTRDSDGQLK-----PALGRSWSFVPSTRILLDTQSSGSLG-SWRVVCVLTKS PRLPTGCQETVDLGLSLGTPAFQGDHKGH	: 326
GG :	AVVVVTNQVTRDSSTGALK-----SALGRSWSFVPSTRVLLQGRAWPWEEGAAPHTACIAKSPRQPTGTMQVLDIGSLSDAVQEQRPVTPPT	: 327
XL :	AIIISNSITKDG-AASIR-----PALGRSWSFVPSTRILLTQN-----ELNCGLCTVSLVKSPRQPTNLKVDEIGICGTLEENNNPSSSTD	: 324
DR :	AVLVTNHNVTKDNGQVK-----AGLGLWSHVRTRVLLQRVEN-----EEISSLRTATLTKSSRQACHMTKEFDLCHWSEERTTSISGKRKLD	: 327
CI :	AVVITNDVTGPQDKTGFQFSRKPALGRVWTFVPSVRVQLQPHIAPCLHHGVNKILARLTKSTRCGYRATSCVITSSGIESEKPS-----	: 328
SP :	QGPVQSLSFMSMTNDKNH-----	: 208
DM :	GIHLDINTSKEITEALLT-----QES-----	: 250
CE :	TVILTNHITHWRGYPAPA-----LGAFWESQINNRFFIEKRND-----DSDIRIVSAMKGQDDGMNRIEFKIGDRGLKAVE-----	: 245
DD :	IFLITNNNTVGGNSFDNKA-----ALGEAWSMVENHQLMINHQYN-----DDENEERSIYIEKSTRLPVSIIFIINLYWLF-----	: 354
AT :	AILVTNHTVGAGGEGGKTK-----KPALGETWKSIPIHVRLSLSRDHK-----NSNCTISILKHTSLPSGQAAKTLTRKENQQCP-----	: 304

Slika 21. Usporedba primarne strukture proteina Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* sa strukturom njegovih ortologa kod 13razli itih eukariota. Crno su oznaene ak sa uvane kod svih organizama, tamno sivo ak o uvane kod većine odabralih vrsta, svijetlo sivo ak o uvane kod manjeg broja vrsti. Zvjezdicama su oznaene ak iz Walker A i B motiva, ak u izravnom kontaktu s ATP molekulom i ak iz domene za povezivanje u BCDX2 kompleks.

Rezultati

Slikost proteinskih sekvenci brojano je iskazana u Tablici 7. Prikazan je udio aminokiselina koje su identične za dvije vrste, te udio sličnih aminokiselina koje se pojavljuju na istom položaju kod dvije različite vrste.

Tablica 7. Udio sličnih i identičnih aminokiselinskih ostataka u proteinu Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* usporedbom s 13 različitih eukariotskih organizama. Plavo osjenčani postotci označavaju udio identičnih aminokiselina, a postotci bez ispunje označavaju broj sličnih aminokiselina.

	SD	HS	RN	MM	BT	GG	XL	DR	CI	SP	DM	CE	DD	AT
SD		35% 53%	33% 52%	33% 51%	36% 53%	34% 53%	32% 51%	33% 53%	33% 48%	23% 39%	9% 22%	15% 26%	21% 38%	26% 42%
HS		83% 91%	83% 89%	81% 89%	65% 80%	54% 75%	53% 74%	37% 57%	26% 42%	10% 25%	16% 31%	20% 45%	26% 44%	
RN				94% 96%	78% 88%	62% 79%	55% 75%	51% 73%	37% 57%	27% 43%	10% 25%	16% 31%	21% 45%	27% 44%
MM					79% 88%	63% 79%	56% 75%	52% 73%	38% 57%	27% 42%	9% 25%	16% 31%	21% 45%	26% 44%
BT						64% 80%	55% 74%	52% 73%	38% 59%	26% 42%	10% 25%	16% 32%	22% 45%	29% 44%
GG							55% 79%	53% 75%	38% 57%	25% 40%	10% 24%	14% 32%	21% 43%	25% 45%
XL								49% 73%	36% 58%	25% 39%	10% 24%	16% 32%	20% 43%	25% 46%
DR									33% 53%	24% 40%	10% 24%	16% 31%	21% 42%	24% 44%
CI										27% 41%	10% 21%	13% 28%	22% 40%	25% 42%
SP											9% 21%	11% 25%	15% 30%	18% 32%
DM												6% 14%	7% 20%	10% 19%
CE													11% 26%	14% 31%
DD														22% 41%
AT														

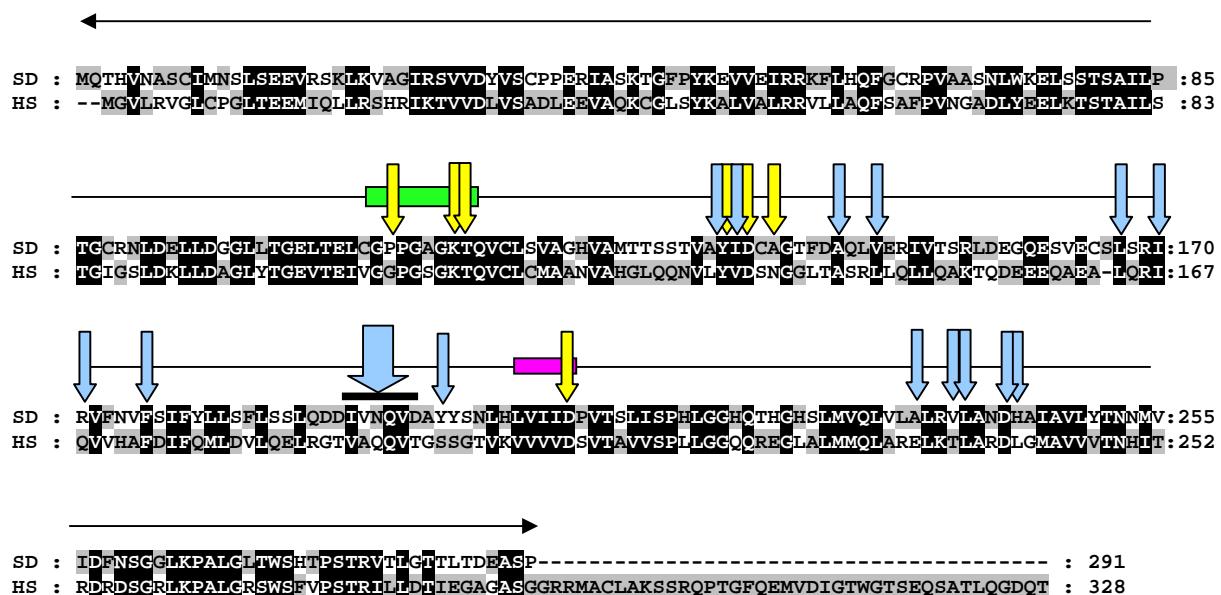
Rezultati

Vidimo kako protein Rad51D kod spužve ima veću sličnost sa sekvencama odabranih kralježnjaka nego beskralježnjaka. Udio identičnih aminokiselina najveći je između spužve i goveda *Bos taurus* (BT), a iznosi 36% aminokiselina, zatim slijedi ovjek *Homo sapiens* (HS) koji dijeli 35% identičnih aminokiselina s ovom spužvom. Udio sličnih aminokiselina je u oba slučaja jednak i iznosi 53% od ukupnog broja aminokiselina. Najmanja podudarnost sekvenci uočena je s vinskom mušicom *Drosophila melanogaster* (DM) i oblikom *Caenorhabditis elegans* (CE). U slučaju vinske mušice udio identičnih aminokiselinskih ostataka je 9%, a udio sličnih 22%, kod *C. elegans* ti udjeli iznose 15% odnosno 26%.

Promatrajući i usporedni prikaz proteinske sekvence Rad51D kod spužve i sekvenci ovog proteina kod različitih kralježnjaka, s kojima ona pokazuje najveću sličnost, uočava se da je očuvanost slijeda aminokiselina na N-terminalnom kraju i u središnjem dijelu veća nego na C-terminalnom kraju. C-terminalni kraj kod spužvi je i kraći za nekih 25-30 aminokiselina u odnosu na slijed kod kralježnjaka.

Proteinska sekvencia za protein Rad51D morske spužve *Suberites domuncula* uspoređena je samo s proteinskom sekvencom kod ovjeka da bi utvrdili koliko su očuvani položaji aminokiselina koje su važne za funkciju samog proteina. U Walker B motivu svih pet aminokiselina je identično i kod spužve i ovjeka. Od osam aminokiselinskih ostataka koji su dio Walker A motiva razlikuju se aminokiselina na položaju 108, prolin kod spužve je kod ovjeka zamijenjen aminokiselom drukčijeg karaktera, glicinom, i alanin na položaju 112 je zamijenjen serinom. Ostali aminokiselinski ostaci su identični aminokiselinama. Izmijenjena aminokiselina na položaju 108 sudjeluje i u domeni za vezanje ATP-a. To je u ovom slučaju jedina izmijenjena aminokiselina, ostalih šest je identično u oba organizma. Kod domene koja sudjeluje u povezivanju proteina Rad51D u BCDX2 kompleks od dvadeset aminokiselina devet je zamijenjeno aminokiselom drugog karaktera: Alanina-135 zamijenjen je s Leu, Arg-174 s Gln, Val-193 s Ala, Asn-194 s Gln, Asp-197 s Thr, Tyr-199 sa Ser, Ala-236 s Glu, Val-239 s Ile, His-244 s Leu.

Rezultati



Slika 22. Poravnote proteinske sekvene Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula* i ovjeka *Homo sapiens*. Crno su osjenane identi ne i sli ne aminokiseline. Zeleni pravokutnik se nalazi iznad aminokiselina koje sa injavaju Walker A motiv, a roza pravokutnik iznad Walker B motiva. Žutim strelicama su oznaene aminokiseline koje su u izravnom kontaktu s molekulom ATP-a. Plavim strelicama su oznaene aminokiseline koje su dio motiva za povezivanje Rad51D u BCDX kompleks (šest uzastopnih aminokiselina oznaene su debljom strelicom i dodatno oznaene crnom crtom).

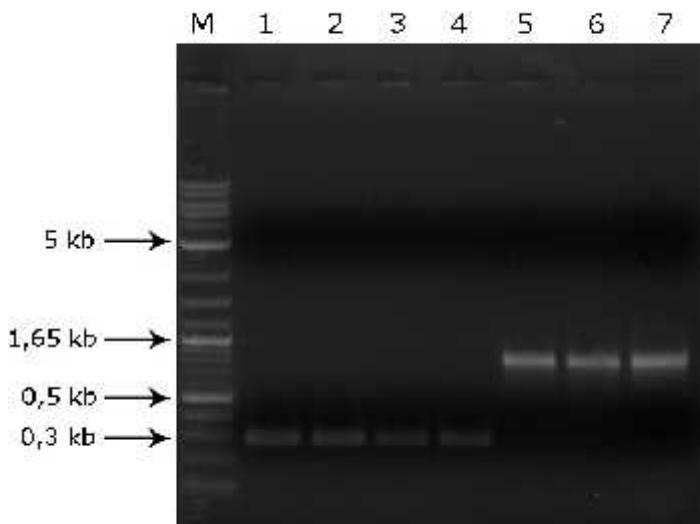
4.4. Određivanje nukleotidnog slijeda i položaja introna u genima *rad51* i *rad51D*

Za utvrđivanje slijeda i položaja introna u poznatom dijelu gena *rad51* i *rad51D* napravljene su PCR reakcije gdje je kao kalup poslužila ukupno izolirana genomska DNA. Po etnice potrebne za reakciju su osmišljene na osnovu poznatog slijeda cDNA u programu NetPrimer, a njihove karakteristike su navedene u poglavlju 3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline, uvjeti PCR reakcija tablično su prikazani u poglavlju 3.2.2. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR).

Dobiveni fragmenti razdvojeni su u jedan postotnom agaroznom gelu.

Gen *rad51* je umnožen pomoću po etnica rd2, rd3, rd4 i rdrv.

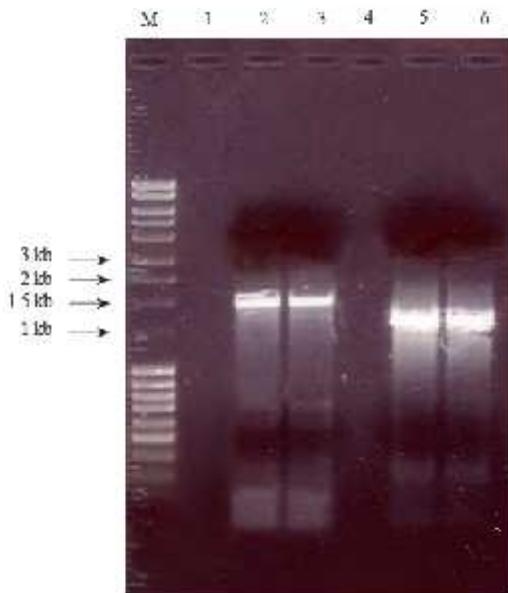
Uzorci u jažicama jedan, dva, tri i četiri (Slika 22) su fragmenti nastali umnožanjem pomoću po etnica rd3 i rdrv koje su specifični za slijed na 5'- kraju. Nastali fragmenti su duljine oko 1 kb. Fragmenti nastali na genomskoj DNA pomoću po etnica rd2 i rd4, specifični za 3' odnosno središnji dio sekvene, duljine su 300 pb.



Slika 23. Umnožanje *Rad51* na genomskoj DNA. U liniji M je marker u rasponu 0,1 do 10 kb. U linijama 1, 2, 3 i 4 su fragmenti nastali umnožanjem s po etnicama rd3 i rdrv, u linijama 5, 6 i 7 su fragmenti nastali umnožanjem s po etnicama rd2 i rd4.

Rezultati

Uzorci u jažicama dva i tri nastali su umnažanjem genomske DNA pomoću po etnica fw1 i rv i dobiveni su fragmenti veličine 1500 pb. U uzorcima pet i šest za umnažanje gena *rad51D* u genomskoj DNA korištene su po etnice fw2 i rv. Dobiveni fragmenti umnoženi tim po etnicama su nešto kraći, veličine su oko 1300 pb.

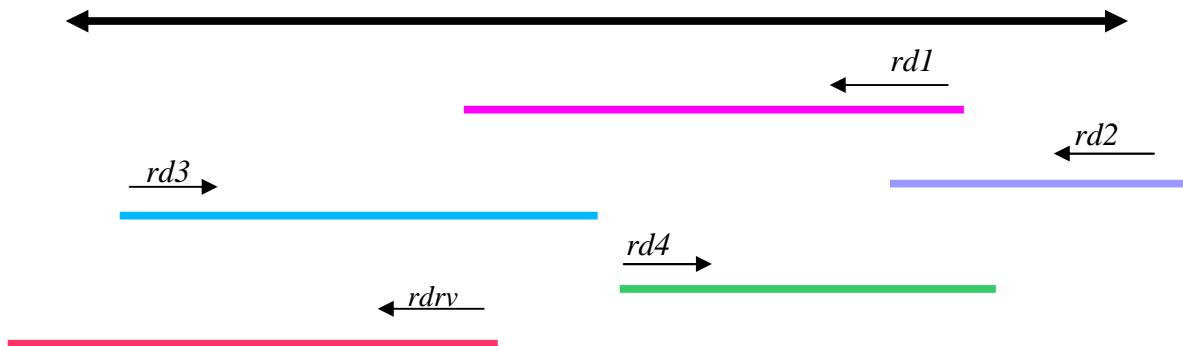


Slika 24. Umnažanje *rad51D* na genomskoj DNA. U liniji M je marker u rasponu 0,1 do 10 kb. U liniji 2 i 3 su fragmenti nastali umnažanjem s po etnicama fw1 i rv, u linijama 5 i 6 su fragmenti nastali umnažanjem s po etnicama fw2 i rv.

Vrpce su pod transluminatorom izrezane skalpelom a zatim je DNA izdvojena iz agaroznog gela pomoću komercijalno dostupnog paketa *QIAquick Gel Extraction Kit* (Poglavlje 3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela). Slijed nukleotida u dobivenim fragmentima DNA određen je Sangerovom metodom na uređaju *Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*, uzorci su pripremljeni koristeći komplet ABI-PRISM Big Dye Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Poglavlje 3.2.5. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom).

- Gen *rad51*

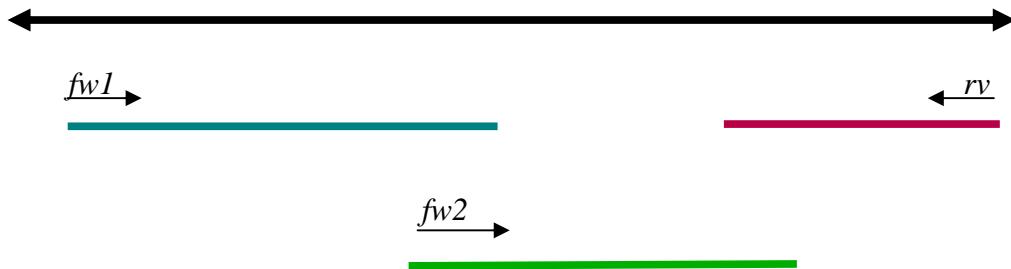
Nukleotidna sekvenca gena *rad51* određena je sekvenciranjem fragmenata dobivenih PCR reakcijama. Za sekvenciranje cijelovitog gena korišteno je pet različitih po etnicima: rd1, rd2, rd3, rd4 i rdrv. Ove specifične po etnicama su osmišljavane u nekoliko navrata nakon što bi sekvenciranjem otkrili novi segment ovog gena.



Slika 25. Shematski prikaz pretraživanja gena *rad51*. Bojama su označeni dijelovi gena sekvencirani određenim po etnicima. Po etnici, njeno početak i smjer su označeni strelicom iznad sekvencirane regije.

- Gen *rad51D*

Uz pomoći tri po etnicama, fw1, fw2 i rv, određena je cijela nukleotidna sekvenca gena *rad51D*.



Slika 26. Shematski prikaz pretraživanja gena *rad51D*. Plavo je označen dio gena sekvenciran pomoći u etnici fw1, zeleno dio gena sekvenciran po etnici fw2, a crveno po etnici rv.

- Položaj i faza introna kod gena *rad51*

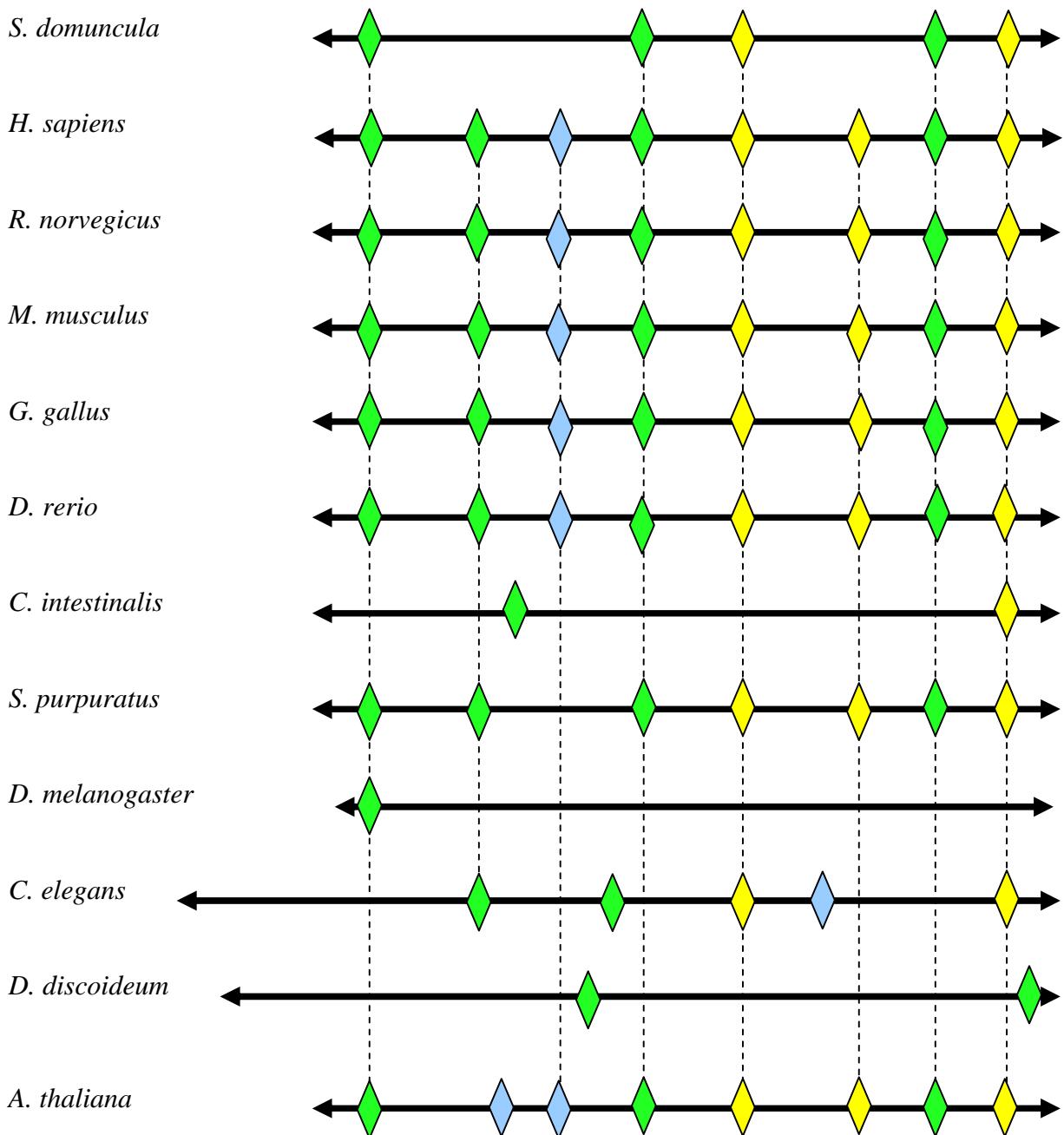
S obzirom da u cDNA biblioteci nije prona en 5' kraj gena *rad51*, usporedba genomske DNA i translatirane regije koja je pohranjena u biblioteci nije bila dovoljna za otkrivanje položaja i faze svih introna. Introni na 5' kraju su odre eni usporedbom nukleotidne sekvene dobivene sekvenciranjem, sa sekvencama koje su pohranjene u bankama podataka na internetu. Na taj na in uo ene su regije koje nemaju homologiju sa sekvencama proteina Rad51 iz drugih raznih organizama i regije koje pokazuju visok stupanj homologije, za koje je onda zaklju eno da su kodiraju a DNA. *rad51* ima pet introna, prvi intron je duljine 67 pb i to je najkra i intron u ovom genu. Drugi ima 166 pb, tre i 140 pb, a etvrti 103 pb. Posljednji peti intron je najduži i ima 316 pb.

```
ATGGCTATGCAAGCAGAAGTACAGCATACAGAAGAGCAAGTTGACGACGAACAATTTGGT
CCACAGCTTGTCAACAAATTAGAAGTGAGTATTCAAGATATCCAGTACAAAAGTAGCTAG
GTGTATGCTAACTAATT CCTTGCATT CAGGGACAGGGTATCAGTACCAATGATGTAAA
GAAACTAAGTGTGAGCTACCACACTATAGAGTCAGTGGCCTATGCCCAAGAAGGC
TCTCATACTCATCAAAGGAATAAGTGAAGCTAAAGTAGACAAGATAACAGAATGAAGCTGC
CAAGCTTGTGCCTATGGGATTCAACCACAGCAACGGAGTTTCATCAACGTCGCTCAGAGAT
TATCCAACACTCACACAGGCTCAAAAGAGCTCGATAAACTTTAGGGGGTGGTATAGAGAC
GGGATCCATTACAGAAATGTCGGAGAATTAGAACACTGGAAAAGACTCAACTTGTAC
CACACTTGCTGTTACTTGTCAGTGAGCTCATGTTGAAAAATTGATCTATCCAATCTCTG
GCTAAATTAGGTCAATGGTGTGTATTTCAGAATGATAGTAAATCGTAGTGTAGTATGGCTAG
AGTGTCTAATCAAGCAAGCCTCAATGGTACTAAGATGTACCAAGGTCTGTGTTGTGT
CTCAGTTACCAATAGATGGAGGAGGTGGTGGAGGGAAAGTGTCTGTACATTGACACAGAGGG
CACATTCAAGCAGAGAGACTGCTAGCTGTAGCTGAAAGGTAGGGGCCATTATTCGTTTG
TGAGAATTTCAGTGTAGTTATCTTTACAGTACTGTATATCATGTGAGCTGTACTCAGTT
CTATGACAGCTAGGTCAACTGCCTGTGCGTCAAGGTACTATACTCTGTTACACATAGGTAT
GGTTTGTCTGGATCAGATGTGGATAATGTAGCATATGCTCGAGCCTACAAACACTGACC
ATCAAGGTCAGCTACTGTTGCAAGCGTCAGCCATGATGGCAGAATCAAGATATGCTCTACT
CATCGTCGACAGAGACACGGCATTATATCGCACAGACTACTCTGGCAGAGGTGAGCTGAGT
GCGAGAACATGCACACTGGCAAGAACATCTCAGAACACTTGTCTACTGGCAGACGAGGTT
GGTTGATAATCATTGGTATTGTGTGTGTTATGTAGTCATATAAGAACAGTGTGATAGT
GTTTATGGTATTAGTATATACCCTCTATCTATTGTATAGTTGGGGTTGCCGTGGTATAA
CTAATCAGGTAGTGGCACAAAGTGGATGGGCAATCAATGTTGCTACTGACCCCAGAACACC
AATTGGAGGAAACATTATTGCACATGCGTCACTACAAGGTTGGTATTACATTGATTGGAA
TTAGTACAATACATGTTACATGTGTAGAACCTCAATAGTGACAGTGGTATTGTCTTACAA
GTGTTGTTGTTACTTGTGTGTTATTCATGTGAGCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGC
GTTAGACTGAAGATCTAAAGTCCCTGGTCGATCCCAGGGTTCGGCAAGTTTTTGT
TTTTTTCTCTCCATTATTAGAATGAGATTCAATACAAAGATTCCACCTCTTTCCA
ATATTGAAAGTTGCTCATTAGTTATTGGTAAATTGTACCTCCAGATTATATCTCA
AAAAGGACGAGGGGGAGACCAGAACATGTAAGATATGATTCTCCCTGTTGCCGAAGC
AGAGGCAATGTTGCTATCAATGCTGATGGTATTGGAGACTCCAAGGACTAA
```

Slika 27. Gen *rad51*. Introni su ozna eni plavom bojom.

Rezultati

Osim položaja, introni su definirani i fazom u kojoj se nalaze s obzirom na kodon.



Slika 28. Usporedba pozicije i faze introna gena *rad51*. Položaj introna označen je rombovima. Boja označava fazu. Zeleno-faza 0, plavo –faza 1, žuto-faza 2. Tačke linije povezuju introne s identičnim položajem i fazom.

Položaj i faza introna u genu *rad51* iz *Suberites domuncula* usporeni su s njihovim položajem i fazom u kojoj se nalaze kod vrsta koje su nam poslužile za utvrđivanje

Rezultati

sli nosti proteinske sekvene. Spužve su s obzirom na ove navedene karakteristike sli nije kralježnjacima nego beskralježnjacima. Svih pet introna koje nalazimo kod vrste *Suberites domuncula* su na istom položaju i u istoj fazi kao i introni kod kralježnjaka. Od pet introna tri se nalaze u fazi nula, a dva u fazi dva. Položaj i faza introna nisu određeni za vrste *Bos taurus* (BT) i *Xenopus laevis* (XL) jer potrebni podaci nisu bili dostupni na www.servisu.

- Položaj i faza introna kod gena *rad51D*

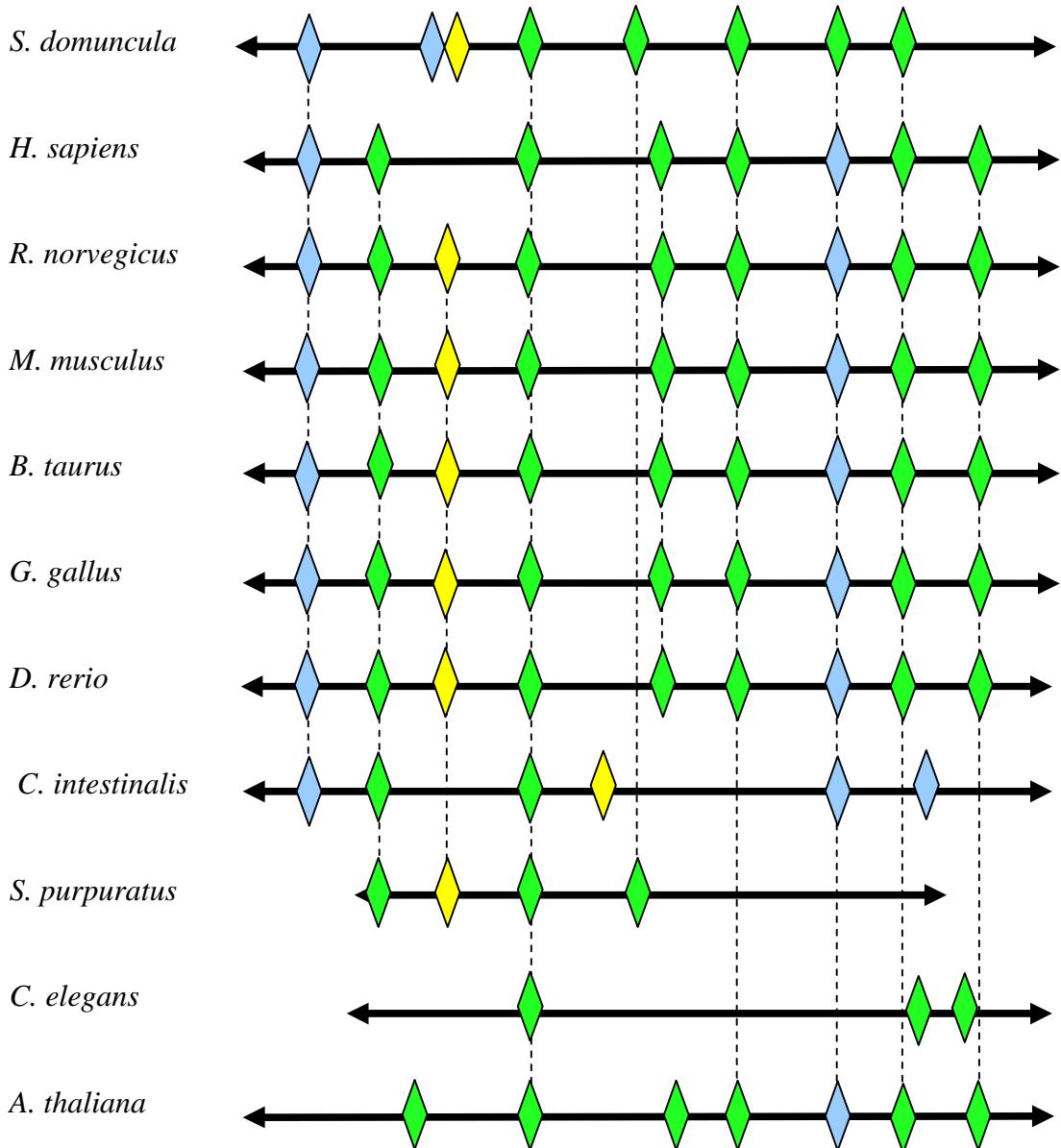
Broj, položaj introna i njihova duljina određeni su usporedbom nukleotidne sekvene cDNA i nukleotidne sekvene fragmenata dobivenih umnažanjem genomske DNA po etnicama specifičnim za gen *rad51D*.

```
ATGCAAACGCATGTGAACGCATCATGCATAATGAATAGTCTGAGGAGGTCCGTAGCAAGCT  
GAAGGTGGCAGGTATCAGATCAGTAGTTATAGACTGAGAACTCTGAAGACAGACATCAGAGGA  
CATTGACCTTGGGAGACTATGCATACGACTTAGACTAAAATCCCTCCCTCTCAGTTGTTGATT  
ACGTATCCTGCCCTCCTGAAAGAATAGCCTCAAAACTGGATTCCATATAAGGAAGTCGTTGAA  
ATACGCAGAAAGTTCTACATCAGTTGGATGCCGCCCGTTGCCGCTAGCAACCTGTGGAAAGA  
GCTTCGTCAACATCAGCAATCTTACCAACAGGTAAAATTTCACACAATTTCGATGATGTCGT  
GACTATTTCGTCCCTAGAGTGACTATCCTTACACTTTTCATGTAGGTTGCAGAAAATG  
AGTTGATGTACCCAGTTATAACACCTTCATCTATTATTGCTCCTGTATAAGTCTAGATGA  
GTTATTGGATGGAGGGCTTGTGACCGGTGAGCTGACAGAGTTGTTGGACCTCCAGGTGCTGGGA  
AAACACAGGTAGAAGAAATTGGCAGAAATTGCAATTGGTAATTCTTCTTCAGGTATGTC  
TCTCCGGCGGGCCATGTTGCCATGACAACAAGCTCCACTGTAGCATATATAGACTGTGCTGGT  
ACATTGATGCTCAACTTGTGAACGAATCGTAACATCACGTTAGACGAAGGGCAAGAGGTAGT  
GATGTTACTTGTATTATAGAACCATTTGATCTCAATTATCCTCACAGAGTGGTAGTGGTCA  
TGAGCAGGATTCTGTGTTCAATGTGTTCAATATTCTACTCTCTCTTATCATCTCT  
CAAGATGACATCGTAAATCAGGCAGGTCAAAGGTCAAACACACGAACAAATGACTGATTATGCT  
TTATGCTTGTAGGTGGATGCGTATTATAGCAACCTTCATCTGTGACATAATTGACCTGTGACCTC  
TCTCATATCTCCCCACCTGGTGGACATCAGACTCACGTGAGCTTGTGACATAAAAGTTAGGAT  
ACTTGTTCATGAAATTAGGATACTTGTACATGAAGTTAGGATACTGTTAATTAGGGTAAATGATC  
GAGAGTTTAGGATACTTGTACGTGAGGTTACATTATGAGGTTAGGATATTGTACGTGAGATACC  
CGACAGATAACAACCTTGTGATTTTTTGACAGGGTCACAGTTGATGGTCCAACCTGGTCT  
TGGCTCTGAGAGTCTGGCCAATGATCATGCAATAGCTGTACTGGTGAGTAGATAACACACCGT  
GTGTGTGTGTTGATTGGATCAAACTCACATTAGTACACCACATGGATTGACATGAGTTGAA  
CAACCTTCACAAGTATTGACATAATTGACATTACTCTGCAGTACACAAACAATGGTATAG  
ATTCAACAGTGGTGGTTGAAACCAGCCCTGGCCTCACATGGTCACACACTCCCTCCACACCGA  
GTCACGCTGGCACACCCTCACAGATGAGGCGAGCCCCCTGA
```

Slika 29. Gen *rad51D*. Introni su označeni zelenom bojom.

Gen za protein Rad51D ima 8 introna. Prvi intron je duljine 98 pb, drugi intron je nešto kraći i ima 85 pb. Samo 10 pb nizvodno od kraja drugog introna nalazi se treći i intron s 59 pb. Četvrti i peti intron imaju 50 pb i to su najkraći introni u ovom genu, šesti intron je

samo za 4 pb dulji, odnosno ima 54 pb. Sedmi intron ima 191 pb i to je najdulji intron i jedini intron veli ine preko 100 pb. Posljednji, osmi intron, ima 84 pb.



Slika 30. Usporedba pozicije i faze introna gena *rad51D*. Položaj introna ozna en je rombovima. Boja ozna ava fazu. Zeleno-faza 0, plavo-faza 1, žuto-faza 2. To kaste linije povezuju introne s identi nim položajem.

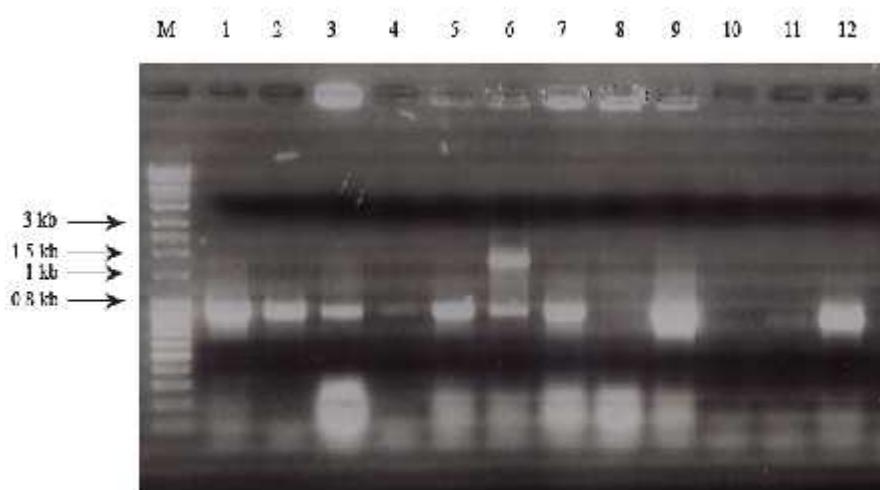
Odre ene su faze introna, odnosno njihov položaj u odnosu na kodon. Nažalost za vrste *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* i *Dyctiostelium discoideum* takvi podaci nisu

dostupni. Pet introna u genu Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* nalazi se u fazi nula, dva introna se nalaze u fazi jedan, jedan intron je u fazi dva. Položaj i faza introna su kod ove spužve slični položaju i fazi introna kod kralježnjaka nego kod beskralježnjaka i biljaka.

4.5. Stvaranje rekombinantne DNA i ekspresija gena za protein Rad51D

Pomoću specifično dizajniranih po etnici s ugrađenim restriktivskim mestima za enzime *Bam* HI i *Nde* I, PCR reakcijom, je umnožen gen *rad51D*. Plazmid pET15b i umnoženi fragment su zatim razgradieni prethodno navedenim enzimima. Osmišljavanje po etnici i slična metoda objašnjene su u poglavlju 3.2.6.1. Razgradnja DNA restriktivskim endonukleazama. Producirane razgradnje smo razdvojili elektroforezom u jedan postotnom gelu agaroze, a željene fragmente izrezali iz gela i prostili pomoću paketa *QIAquick Gel Extraction Kit*.

U reakcijskoj smjesi s DNA-ligazom faga T4 gen za protein Rad51D ugrađen je u ekspresijski vektor pET15b. Ligacijsku smjesu smo pomiješali s kompetentnim *E. coli* stanicama soja BL21 i transformirali elektroporacijom. Smjesa je zatim nasađena na selektivne ploče s ampicilinom i ostavljena preko noći na 37°C. Na pločama je naraslo stotinjak kolonija.



Slika 31. Kolonijski PCR na 12 kolonija *E. coli*, soj BL21, transformirane plazmidom pET 15b s ugrađenom cDNA za protein Rad51D. U liniji M je marker raspona 0,1-1 kb. U linijama 1-12 fragmenti PCR reakcija na 12 različitim kolonija.

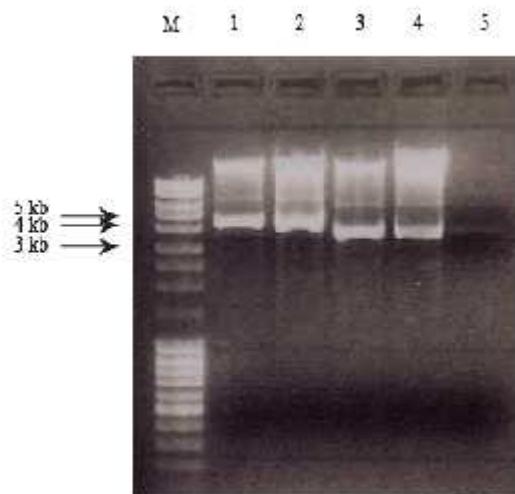
Rezultati

Odabranih 12 klonova provjerili smo na dva na ina: pomo u kolonijskog PCR-a, a zatim i izolacijom plazmidne DNA i odre ivanjem njene sekvence. Rezultati su provjereni u agaroznom gelu. U uzorcima 1-7 dobiveni su fragmenti duljine 700 pb a u uzorcima devet, jedanaest i dvanaest su dobiveni nešto kra i fragmenti, veli ine oko 600 pb. U uzorcima osam i deset utvr eno je da te kolonije sadrže plazmid u koji se nije ugradio željena sekvencia gena *rad51D* (Slika 30).

Kolonije jedan, dva, devet i dvanaest, kod kojih je uo en najve a koncentracija plazmida, su odabранe za daljnju provjeru ugradnje gena *rad51D* u ekspresijski vektor pET15b.

Plazmidna DNA izolirana je pomo u komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep*.

Izolacija je provjerena na agaroznom gelu (Slika 31.), a kao kontrola je poslužio plazmid bez ugra enog fragmenta (uzorak broj pet). Fragmenti iz uzorka jedan i dva za koje je vidljivo da imaju više parova baza od kontrole, uzorka pet, izrezani su iz gela i pro iš eni pomo u paketa *QIAquick Gel Extraction Kit*.



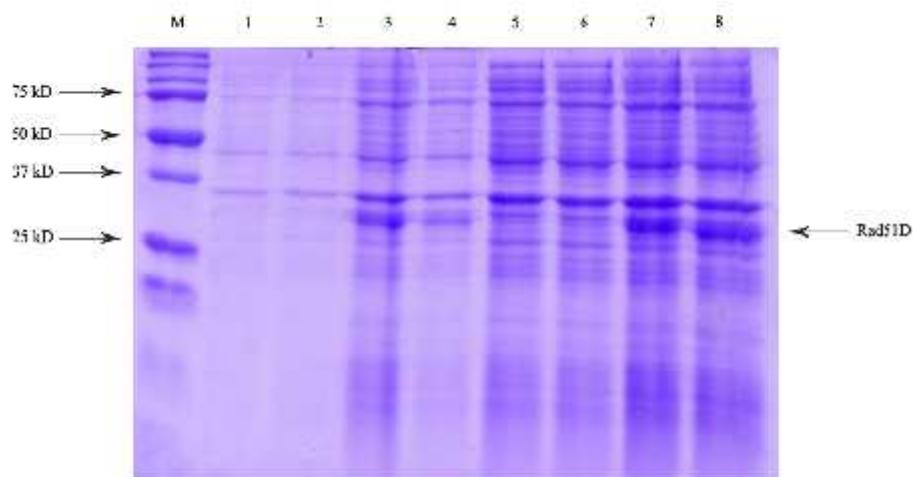
Slika 32. Plazmidna DNA izolirana pomo u komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep*. U liniji M je marker raspona 0,1-1 kb, u linijama 1-4 su rezultati izolacije iz etiri razli ita soja, u liniji 5 je pozitivna kontrola-plazmid bez ugra enog gena *rad51D*.

To nast sekvene *rad51D* klonirane u pET15b provjerena je odre ivanjem primarnog slijeda nukleotida na ure aju *Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*. Rezultat sekvenciranja pokazao je kako je slijed za protein Rad51D ugra en u ekspresijski vektor to an.

Za dobivanje ve e koli ine proteina uzgojene su prekono ne kulture transformiranih BL21 stanica na 37°C. Prvo je provedena indukcija na 10 mL LB medija da bi provjerili da li dolazi do ekspresije proteina. 100 µL prekono ne kulture razrije eno je u 10 mL LB

Rezultati

medija uz dodatak 10 μL ampicilina i inkubirano dva sata na 37°C. Kada se gusto a bakterijske kulture pove ala do OD=0,6-0,7 izdvojeno je 8 mL i dodano 8 μL 0,8 M IPTG-a, te inkubirano dva sata na 37°C. Rezultati ekspresije su provjereni na SDS poliakrilamidnom gelu.



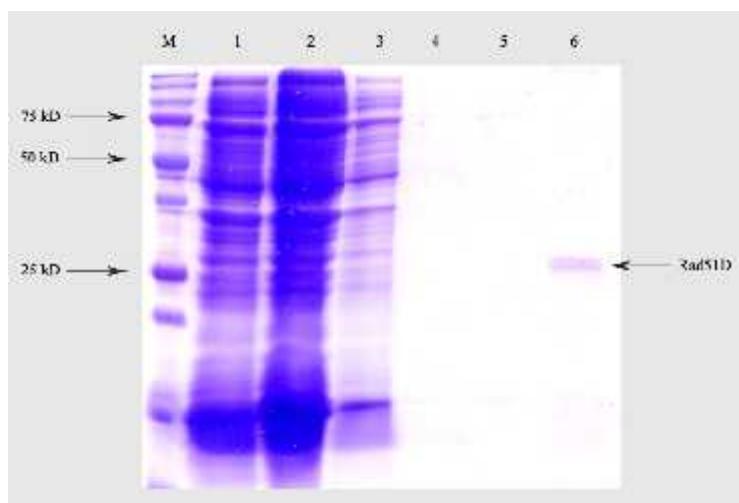
Slika 33. Elektroforetska analiza u poliakrilamidnom gelu proteinskih ekstrakata gena *rad51D* u stanicama *E.coli* BL21. U liniji M je proteinski biljež širokog raspona, u liniji 1 i 2 su proteinski ekstrakti prije indukcije (1 μL uzorka), u linijama 3 i 4 proteinski ekstrakti nakon indukcije (1 μL uzorka), u linijama 5 i 6 su proteinski ekstrakti prije indukcije (10 μL uzorka), u linijama 7 i 8 su proteinski ekstrakti nakon indukcije (10 μL uzorka).

Nakon što je utvr eno da dolazi do ekspresije željenog proteina napravljena je indukcija u 250 mL LB da bi smo dobili što ve u koli inu proteina. 10 mL prekonosne kulture u zgajane na 37°C pomiješano je s 250 mL LB i 250 μL ampicilina. Kada je dostignuta gusto a koja je odgovarala apsorpciji $OD_{600}=0,7$ potaknuta je ekspresija rekombinantnog proteina dodavanjem 0,8 M IPTG-a. Nakon dva sata sinteza je zaustavljena stavljanjem stanica na led. Suspenzija je centrifugirana, a dobiveni talog liziran sonikacijom. Supernatant u kojem se nalaze stani ni proteini je zatim prošen na afinitetnoj koloni

Rezultati

agaroze Ni-NTA na kojoj se zadržavaju rekombinantni proteini koji na N-kraju imaju šest histidina. Nakon ispiranja ne isto a s kolone prošen je i rekombinantni protein s kolone u frakcijama od 1 mL. 20 µL purificiranog proteina iz svake frakcije pomiješano je s 80 µL Bradford otopine i inkubirano 30 minuta na sobnoj temperaturi. Od 8 skupljenih frakcija dvije su se obojile intenzivno plavo što je pokazatelj prisutnosti proteina u tim frakcijama. Da bi provjerili da li se radi o Rad51D proteinu frakcije su analizirane na SDS poliakrilamidnom gelu.

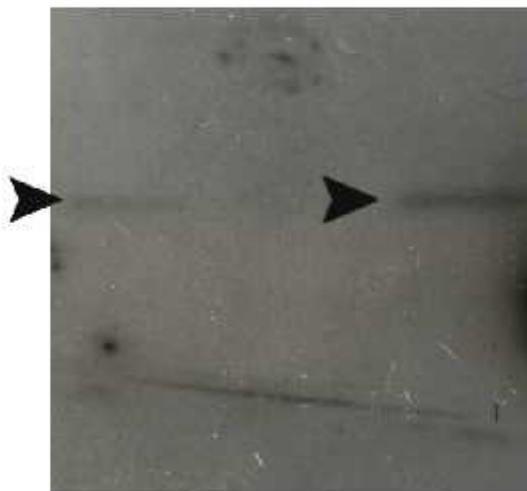
Vraca koja se nalazi malo iznad 25 kD, u uzorku šest, odgovara pretpostavljenoj velini Rad51D. Koncentracija proteina je oko 50 ng što je premalo za bilo kakva daljnja istraživanja aktivnosti i funkcije.



Slika 34. Elektroforetska analiza u poliakrilamidnom gelu proteinskih ekstrakata nakon ekspresije gena *rad51D*, te nakon prošavanja na koloni. U liniji M je proteinski biljeg širokog raspona, u liniji 1 je proteinski ekstrakt prije prošavanja na kolonu, u liniji 2 je proteinski ekstrakt koji se nije vezao na kolonu, u liniji 3 je sadržaj nespecifično vezanih proteina u puferu nakon ispiranja kolone, u liniji 4 je sadržaj proteina nakon drugog ispiranja, u linijama 5 i 6 je sadržaj specifično vezanih proteina.

4.6. Western analiza proteina

Protein dobiven pro iš avanjem bakterijskog lizata na Ni-NTA koloni podvrgnut je dalnjem ispitivanju imunokemijskom analiti kom metodom da bi se potvrdilo kako se radi o proteinu Rad51D. Proteini razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu preneseni su s gela na poliviniliden fluoridnu membranu. Za detekciju su korištena primarna antitijela Anti-His iz miša koja prepoznaju histidine na rekombinantnom proteinu Rad51D i sekundarna antitijela Anti-mouse IgG, na koje je kovalentno vezana peroksidaza. Rezultati su vizualizirani izlaganjem rendgenskog filma membrani koja je prije toga inkubirana u otopini luminola i poja iva a.



Slika 35. Detekcija rekombinantnog proteina Rad51D na poliviniliden fluoridnoj membrani pomo u primarnih antitijela Anti-His iz miša koja prepoznaju histidine i sekundarnih antitijela Anti-mouse IgG, na koje je kovalentno vezana peroksidaza.

5. RASPRAVA

Pripadnici koljena Porifera predstavljaju odlične modelne organizme za proučavanje molekularne evolucije. Prvi oblici odvojili su se od zajedničkog pretka prije 580 milijuna godina, prije kambrijske eksplozije, stoga se spužve smatraju živim fosilima (Müller 1995). Na prvi pogled djeluju kao jednostavniji, "primitivni" organizmi, no istraživanja posljednjih godina pokazala su kako spužve imaju ogroman repertoar gena te su visoko organizirani i kompleksni organizmi (Breter i sur. 2003; Müller i sur. 2003). Posjeduju veliku proteina koji su bili prisutni kod pretka svih višestanih organizama. Razvojem pojedinih linija organizama neki od tih proteina izgubili su se te nam mogu poslužiti kao markeri za bolje sistematiziranje Metazoa. Filogenetski očuvani proteini kod spužvi mogu se koristiti i za određivanje razlika u stopi evolucije kod različitih organizama (Gamulin i sur. 2000).

Rekonstrukcija filogenetskih odnosa pomoći u proteinske sekvene temelji se na pretpostavci kako su geni koji kodiraju te proteine homolozi, odnosno kako su porijeklom od zajedničkog pretka. S obzirom da se nalaze u različitim organizmima, nazivaju se i ortologima. Geni koji potječu od zajedničkog gena kod kojeg je došlo do duplikacije nazivaju se paralogi. U svakom organizmu paralogi divergiraju neovisno (<http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/>). Protein Rad51 koji se nalazi kod eukariota pravi je homolog proteina RecA iz prokariota, odnosno njegovog ortologa. Proteini Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 i XRCC3 su paralogi proteina Rad51.

Za razliku od kralježnjaka kod kojih obitelji Rad51 proteina sajavaju pravi homolog proteina RecA i pet paraloga, kod spužvi su nasumičnim pretraživanjem cDNA biblioteke identificirana samo dva proteina, Rad51 i Rad51D, što ne isključuje postojanje drugih proteina obitelji Rad51. Zanimljivo je kako su i kod *Caenorhabditis elegans*, nižeg beskralježnjaka, iji je genom kompletno sekvenciran, također pronađena samo dva lana Rad51 porodice. Jedan od njih sudjeluje u mejozi dok je drugi u eno da ima ulogu u održavanju integriteta kromosoma (Alpi i sur. 2003; Rinaldo i sur. 1998). Sekvenciranjem genoma vrste *Drosophila melanogaster*, višeg beskralježnjaka, ija je proteinska sekvenca

tako er korištena u ovom istraživanju, prona eni su protein Rad51 i njegovi paralozi Rad51C, Rad51D, XRCC2 i

XRCC3 (Pellegrini i sur. 2002). Mogu e je da spužva posjeduje, osim Rad51 i Rad51D, još neke lanove Rad51 porodice proteina, a možda i sve lanove koje kod drugih beskralježnjaka ne nalazimo. No, s obzirom na injenicu da genom spužve još nije sekvenciran, ne možemo to tvrditi sa sigurnoš u. Takav slu aj ne bi bio iznimka. Primjerice, u istraživanjima na vrsti žarnjaka *Nematostella vectensis* utvr eno je da taj niži beskralježnjak dijeli neke osobine genoma sa sisavcima, a koje ne nalazimo kod *C. elegans* i *D. melanogaster*. Tako od 12 *Wnt* gena prona enih kod ovjeka, ovaj ih žarnjak ima 11, dok vinska mušica samo šest (Sullivan i Finnerty 2007).

Odre ivanjem sekvence raznih proteina uo eno je kako proteini evoluiraju razli itom brzinom; kod nekih proteina promijenjen je manji broj aminokiselina nego kod drugih. Kod proteina kao što su imunoglobulini i albumini tijekom vremena došlo je do relativno brojnih promjena. Njihova funkcija ne zahtijeva veliku specifi nost pa je stoga tolerancija na varijabilnost ve a. S druge strane imamo histone koji su se tijekom dužeg vremena relativno malo mijenjali. Takva visoka o uvanost sekvence smatra se posljedicom injenice da je za njihovu funkciju važna kompletna struktura, a ne samo odre ena domena (<http://encyclopedia2.thefreedictionary.com>).

Slijed aminokiselina proteina Rad51 iz spužve pokazuje veliku o uvanost sa slijedom aminokiselina kod ortologa u drugim organizmima. Ve a se o uvanost uo ava, kako je i prepostavljeno, sa sekvencama kod kralježnjaka, a manja sa sekvencama kod beskralježnjaka. Sa uvanost ne postoji samo u domenama važnim za funkciju ovog proteina, nego u cjelovitoj sekvenci. Manja odstupanja prisutna su samo na N-kraju ovog proteina. U usporedbi s odabranim predstavnicima kralježnjaka, udio sli nih i identi nih aminokiselina na istom je vrlo visok, u rasponu je od 88-90%, odnosno 80-83%. Kod spužvi i beskralježnjaka udio je nešto manji, ali tako er visok, iznad 50%. Udio sli nih aminokiselina je izme u 76 i 87%, a udio identi nih aminokiselina 54-79%. Za biljke su ti udjeli sli niji onima kod beskralježnjaka nego kod kralježnjaka. Ovi podaci su u skladu s istraživanjima Gamulin i sur. (2000) koji su tako er uo ili ve u homologiju proteina iz spužve s proteinima kod kralježnjaka. U istraživanjima filogenetskih odnosa, odnosno o uvanosti slijeda aminokiselina, više puta je pokazano kako kod vrste *Drosophila* dolazi

do vrlo brze evolucije aminokiselinske sekvene (Yaeger Stassen i sur. 2007), što je u skladu s podacima prikupljenim za proteine Rad51 i Rad51D iz *Drosophila*. Iako je *Drosophila melanogaster* na vremenskoj skali bliža spužvama, proučavani proteini iz ove dvije vrste pokazuju manju međusobnu sličnost nego proteini iz spužve i ortolozi iz kralježnjaka. No, htjela bih napomenuti kako postoje i iznimke. Provedena su istraživanja na proteinima gdje je stopa evolucije kod *Drosophila* niska kao i kod kralježnjaka. *Drosophila* i kralježnjaci pokazuju nisku stopu evolucije za proteine α -tubulin i β -tubulin, za razliku od pripadnika carstva Fungi kod kojih je ta stopa promjene brza (Baldauf i Palmer 2003).

Proteinska sekvenca Rad51D iz spužve *Suberites domuncula* takođe pokazuje veću sličnost s homolognim proteinima iz kralježnjaka nego beskralježnjaka, ali su udjeli identičnih i sličnih aminokiselina vidljivo manji od onih u enih za protein Rad51. Najveći udio identičnih aminokiselina spužva dijeli s vrstom *Bos taurus* 36%, a udjeli za ostale kralježnjake slične su veličine (32-36%). Udjeli sličnih aminokiselina kreću se između 51 i 53%. Kod vrste *Drosophila* udio identičnih aminokiselina izrazito je nizak i iznosi samo 9%, ako se u obzir uzmu i slične aminokiseline, taj udio iznosi 22%. Ovi udjeli su niski i za ostale beskralježnjake te iznose 21-23%, odnosno 26-39%.

Protein Rad51 ima sporiju stopu evolucije nego njegov paralog Rad51D. To je bilo očekivano, s obzirom da je Rad51 pravi homolog prokariotskog RecA proteina i ujedno evolucijski vrlo sličan protein u većine eukariota, od kvasca do ovjeka. To se uočava ne samo u odnosu spužve s drugim organizmima već i promatrajući odnose između drugih organizama. Za primjer navodim dva kralježnjaka koji, kao što sam uvećao spomenula, imaju malu stopu promjene tijekom evolucije. Ako promatramo Rad51 protein, udio identičnih, odnosno sličnih aminokiselina između vrsta *Mus musculus* i *Bos taurus* iznosi 99 i 100%. Kod proteina Rad51D ti su iznosi za 20%, odnosno 12% manji, te iznose 79 i 88%. Brzina evolucije ortolognih proteina relativno je konstantna, a njena divergencija može biti pokazatelj divergencije u funkciji ortologa (Jordan i sur. 2001).

Promjene aminokiselinskih ostataka u ovisnosti o njihovom lokalnom okolišu pokazuju kako lokalni okoliš ograničava mutacije, te su prihvatljive one koje ne mijenjaju strukturu i funkciju proteina (Overington i sur. 1991). Stoga smo posebnu pažnju posvetili aminokiselinskim ostacima koji se nalaze u domenama važnim za funkciju ova dva

proteina. Uspore eni su sljedovi aminokiselina proteina iz spužvi sa sljedovima aminokiselina ortologa iz kralježnjaka *Homo sapiens*. Motivi Walker A i B ine domenu važnu za vezanje i hidrolizu molekule ATP. Za protein Rad51 sve aminokiseline koje sa injavaju ove motive identi ne su kod spužve i ovjeka, dok je kod proteina Rad51D u Walker A motivu došlo do zamjene jedne aminokiseline drugom druga ijeg karaktera. Naime, na mjestu Pro-108 kod ovjeka nalazimo glicin i na mjestu Ala-112 nalazimo serin. Za funkciju proteina vrlo su važne aminokiseline koje se nalaze u izravnom kontaktu s molekulom ATP vezanom u aktivnom mjestu. Osim aminokiselina koje su sastavni dio Walker A i B motiva, tu sudjeluju i tri dodatne aminokiseline. Kod proteina Rad51, spužva *Suberites domuncula* i *Homo sapiens* imaju identi ne aminokiseline, a kod Rad51D razlikuju se u jednoj aminokiselini, ve spomenutoj zamjeni Pro-108 s Gly, koja je sastavni dio Walker A motiva. Domene važne za interakciju ova dva proteina s drugim molekulama su: BRC domena kod proteina Rad51, koja služi za povezivanje monomera u filament na mjestu ošte enja DNA (Bianco i sur. 1998), te domena za povezivanje proteina Rad51D s drugim gra evnim jedinicama kompleksa BCDX2, koji ima važnu ulogu u homolognoj rekombinaciji (Liu i sur. 2007). Osim vrlo sli ne funkcije ove domene povezuje i jednak broj aminokiselina koje sudjeluju u njihovoj izgradnji, njih dvadeset. Kod proteina Rad51, sekvene ovih dvaju organizma razlikuju se za tri aminokiseline, a kod Rad51D za devet aminokiselina.

Homologija ortologa iz ova dva organizma, ako promotrimo samo o uvanost aminokiselinskih ostataka u domenama važnim za funkciju, nešto je ve a, a razlika je o itija kod proteina Rad51D. Ako promotrimo cjelokupnu sekvencu proteina Rad51 iz *S. domuncula* i *H. sapiens*, uo it emo kako imaju 90% sli nih aminokiselina, dok proteini Rad51D pokazuju 53% sli nosti. Udio sli nih aminokiselina u domenama važnim za funkciju iznosi 92%, odnosno 67%. Najve a varijabilnost nalazi se u domenama koje služe za povezivanje. Ako njih zanemarimo, udio sli nih aminokiselina izme u spužve i ovjeka za Rad51 iznosi 100%, a za Rad51D 81%.

Gen *rad51* ima 1017 pb i dulji je od gena *rad51D* za 57 pb. Iako nešto dulji, gen za protein Rad51 ima tri introna manje od gena za protein Rad51D, odnosno ima pet introna, dok ih gen *rad51D* ima osam. Prirodna selekcija preferira kra e introne dok mutacije pridonose njihovom produživanju. Ravnoteža izme u ova dva procesa odre uje njihovu kona nu

duljinu (Kliman i Hey 2003). Prikupljanjem podataka dobivenih istraživanjem gena kod spužvi uočeno je da one imaju izrazito kratke introne, duljine 0,1-2 kb (Müller W. E. G. 2003). Utvrđene duljine introna u ova dva gena slažu se s tim podacima. Introni u genu *rad51* i *rad51D* izrazito su kratki; najdulji intron ima samo 316 pb. Usporedbom ta dva gena uočava se da, iako gen *rad51* ima manje introna, oni su dulji. Ako postavimo proizvoljnu granicu od 100 pb, može se utvrditi kako *rad51D* ima samo jedan intron dulji od 100 pb, dok je kod *rad51* samo jedan intron kraći od 100 pb.

Kod ovjeka, oblika i vinske mušice utvrđena je povezanost duljine introna s razinom transkripcije tog gena. Ta su dva svojstva obrnuto proporcionalna; na taj način smanjuje se energetski trošak kod prepisivanja u estalih gena (Castillo-Davis i sur. 2002).

Kod vrste *Suberites domuncula* u nukleotidnoj sekvenci za gen *rad51* utvrđeno je postojanje pet introna. Po položaju i fazi ti su introni identični intronima kod kralježnjaka i biljke *Arabidopsis thaliana*. No kralježnjaci i biljke imaju tri introna više: dva introna, koja ne nalazimo kod ove spužve, nalaze se na 5' kraju gena kod kralježnjaka, a treći intron nalazi se na 3' kraju. Vrsta *Arabidopsis thaliana* od kralježnjaka se razlikuje samo u položaju i fazi jednog introna. Gledano s 5' kraja, to je drugi intron koji nedostaje kod *Suberites domuncula*. Beskralježnjaci *Drosophila melanogaster* i *Dyctiostelium discoideum* te svitkovac *Ciona intestinalis* imaju samo jedan ili dva introna. Zanimljivo je uočiti kako se od dva prisutna introna kod *Dyctiostelium discoideum* ni jedan ne poklapa s intronima kod spužve, kao ni s intronima bilo koje druge ovdje proučavane vrste. *Suberites domuncula* dijeli sve položaje introna i s višim beskralježnjakom, vrstom *Strongylocentrotus purpuratus*. Osim ovih pet introna, *Strongylocentrotus purpuratus* ima još dva koji su homologni s intronima kod kralježnjaka.

Proučavajući položaj introna i fazu u kojoj se introni nalaze kod gena *rad51D*, uočava se, kao i kod broja identičnih i sličnih aminokiselina, veća sličnost s kralježnjacima nego beskralježnjacima. Dva introna od njih osam jedinstvena su samo za spužve, a to su introni broj dva i tri. Premda i kod kralježnjaka nalazimo intron koji po fazi odgovara intronu broj tri i pomaknut je samo za jednu aminokiselinu (migracija introna) u odnosu na taj intron kod spužvi. Migracija introna vrlo je rijedak događaj, pravi evolucijski fenomen, a predstavlja pomicanje granice intron-egzon za nekoliko baza (1-15 nukleotida). Četiri introna: intron broj jedan, četiri, šest i osam, zajedno su za spužve i kralježnjake. Intron

broj etiri prisutan je kod svih prouavanih vrsta. Kod introna broj sedam došlo je do pomaka u fazi, ali je položaj ostao isti; kod spužvi je taj intron u fazi jedan, dok je kod svih kralježnjaka u fazi nula. Intron broj pet prisutan je, osim kod spužve, i kod ježinca. Osim etvrtog introna, *Suberites domuncula* i biljka *Arabidopsis thaliana* dijele još introne broj šest i osam.

Ako usporedimo gene *rad51* i *rad51D* možemo zaključiti da, u oba slučaja, kod spužve *Suberites domuncula* ne nalazimo nekoliko introna koji su očuvani i zajednički kralježnjacima, višim beskralježnjacima (*Strongylocentrotus purpuratus*) i biljkama (*Arabidopsis thaliana*). Zanimljivo je kako kod *rad51D* gena iz spužve nalazimo i intron koji je specifičan samo za ovu vrstu (vršno specifičan intron), te jedan koji se javlja kod spužve i ježinca, ali ne i kod kralježnjaka ili biljaka. Kod kraćih evolucijskih udaljenosti položaji introna esto se koriste kao filogenetski markeri, ali ne predstavljaju dobar izvor informacija za proučavanje filogenetskih odnosa između udaljenih vrsta (Vanketesh i sur. 1999; Rogozin i sur. 2003).

Analizom *Escherichia coli* podataka uočeno je da introni nisu nasumično raspoređeni sa obzirom na kodon, već se pojavljuju u tri faze koje se definiraju sa obzirom na njihov položaj u odnosu na kodon. U svim analiziranim genomima prevladavaju introni faze 0 (Long i Rosenberg 2000). To je utvrđeno i kod gena *rad51* i *rad51D* iz spužve. *rad51* ima tri introna u fazi nula i dva introna u fazi dva. *rad51D* ima osam introna, pet ih je u fazi nula, dva su u fazi jedan, a jedan intron je u fazi dva.

Za dobivanje *Escherichia coli* proteina Rad51D njegov gen je ukloniran u pET15b ekspresijski vektor kojim su transformirane *E. coli* stanice soja BL21. Bakterijski sustavi se u velikoj mjeri koriste za ekspresiju proteina jer predstavljaju jednostavan i jeftin na dobivanja visoke koncentracije proteina. No, u istraživanju eukariotskih proteina postoje i brojna ograničenja. U bakterijskim sustavima ne dolazi do modifikacija proteina nakon translacije, što utječe na njihovu strukturu, funkciju, stabilnost i topljivost. Nadalje, rekombinacijski proteini koji se u visokoj koncentraciji sintetiziraju u bakterijskim stanicama esto precipitiraju i stvaraju netopljive aggregate koji se nazivaju inkluzijskim tijelima (Yinghua i sur. 2004). U radu s proteinom Rad51D, nakon prvočišćavanja na koloni punjenoj Ni-NTA agarozom, dobivene su vrlo male koncentracije rekombinantnog proteina. Većina proteina otišla je u talog. Sa obzirom da su metode za izdvajanje proteina

iz inkluzijskih tijela vrlo mukotrpne i ne daju uvijek rezultate, istraživanja nisu dalje nastavljena.

Istraživanja na genu, a zatim i proteinu Rad51 bila su ograničena iz razloga što iz cDNA biblioteke nismo uspjeli izolirati i N-kraj proteina. To je, nažalost, est problem u radu s cDNA bibliotekama. Iako PCR metoda omogućava stvaranje cDNA biblioteka iz male količine RNA, postoje i nedostaci ove metode, kao što su relativno visoke stope zamijene baza (visoke stope mutacije) i nemogućnost umnožavanja dugih molekula DNA (Gou i sur. 2001). Jedan od problema koji se javlja u stvaranju cDNA biblioteke je i favoriziranje jednih sekvenči nad drugima od strane DNA-polimeraze. cDNA koje se nalaze u niskoj koncentraciji stoga možda neće biti zastupljene u biblioteci (Adjaye i sur. 1997). To je još jedan od razloga zašto ne isključimo postojanje i drugih paraloga proteina Rad51 u vrsti *Suberites domuncula*.

cDNA biblioteka kojom sam se koristila napravljena je konvencionalnim metodama koje su već zastarjele i za neka daljnja, detaljnija istraživanja bilo bi potrebno izraditi novu cDNA biblioteku. Danas se cDNA biblioteke izrađuju pomoću dvije po etnici. Uz po etnicu s 3' kraja koja prepoznaje poliA rep koristi se i po etnici za 5' kraj. Tako će su dostupne i DNA polimeraze koje umnažaju nukleotidni slijed s vrlo visokom točnošću.

Osim utvrđivanja mogućeg postojanja i drugih paraloga proteina Rad51, u dalnjim istraživanjima trebalo bi optimizirati metodu dobivanja veće koncentracije ovih proteina, što bi omogućilo istraživanje i njihove funkcije. Zanimljivo bi bilo vidjeti da li ovi proteini, prisutni u spužvama koje su najjednostavniji mnogostani ni organizmi, vrše iste zadaci kao i kod složenih organizama poput ovjeka.

6. ZAKLJUČI

1. Nasumi nim sekvenciranjem cDNA biblioteke iz morske spužve *Suberites domuncula* pronašle su dvije cDNA ija kodiraju a regija pokazuje najveću homologiju s obitelji Rad51 proteina (Rad51 i Rad51D).
2. Izoliranoj cDNA veličine 669 pb određena je primarna struktura za koju je određeno da pokazuje najveću homologiju s dijelom gena za Rad51 protein. Ukupna DNA za gen *rad51* je duljine 1017 pb i određena je uz pomoć genomske biblioteke. Translacijskom gena nastaje protein dug 338 ak koji pokazuje najveću sličnost (90%) s proteinom Rad51 iz ovjeka.
3. Određena je primarna struktura cDNA veličine 960 pb te je na njoj kodiraju a regija veličine 885 pb, koja nosi informaciju za sintezu proteina duljine 291 ak. Protein pokazuje najveću sličnost s proteinom Rad51D. Najveću sličnost (53%) pokazuje s ortologima iz vrsta: *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Gallus gallus* i *Danio rerio*.
4. Metodom lančane reakcije polimerazom na izoliranoj ukupnoj genomskoj DNA iz morske spužve *S. domuncula* pomoći u specifično osmišljenih po etnici izolirani su fragmenti DNA koji sadrže kodirajuće i nekodirajuće regije gena *rad51* i *rad51D*. Utvrđeno je kako gen za protein Rad51 sadrži pet introna prosječne duljine 158 pb. Najkratki intron ima 63, a najdulji 316 pb. Gen *Rad51D* dug je 1602 pb, a sadrži osam introna prosječne duljine 84 pb. Najkratki intron ima 50, a najdulji 191 pb.
5. Promatrajući položaj i fazu introna u genima *rad51* i *rad51D* iz morske spužve *Suberites domuncula* utvrđeno je da su slični njenim položajima i fazama introna u ortolognim genima kod kralježnjaka nego kod *D. melanogaster* i *C. elegans*.

6. Protein Rad51, pravi homolog proteina RecA koji sudjeluje u procesu homologne rekombinacije kod prokariota, pokazuje manju stopu promjene sekvene tijekom evolucije u odnosu na proteinsku sekvencu njegova paraloga, proteina Rad51D.
7. Gen *rad51D*, umnožen pomoću specifično dizajniranih po etnici, uspješno je ukloniran u ekspresijski plazmid pET15b. Ovaj plazmid omogućuje proizvodnju velike količine proteina Rad51D koji se može jednostavno provesti metodom afinitetne kromatografije.

7. LITERATURA

Albala J.S., Thelen M.P., Prange C., Fan W., Christensen M., Thompson L.H., Lennon G.G. (1997): Identification of a novel human member of the RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics* 46: 476-479.

Alpi A., Pasierbek P., Gartner A., Loidl J. (2003): Genetic and cytological characterization of the recombination protein RAD-51 in *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* 112:6-16.

Arber W., Baltimore D., Bobel G., Evans M., Greengard P., Hershko A., Huber R., Klug A., Prusiner S. B.,

Bianco P.R., Tracy R.B., Kowalczykowski S.C. (1998): DNA strand exchange proteins: A biochemical and physical comparison. *Front Biosci.* 3: D570-D603.

Böhm M., Hentschel U., Friedrich A., Fießeler L., Steffen R., Gamulin V., Müller I. M., Müller W. E. G. (2001): Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar. Biol.* 139: 1037-1045.

Brendel V., Brocchieri L., Sandler S.J., Clark A.J., Karlin S. (1997): Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. *J. Mol. Evol.* 44: 528-541.

Breiter H. J., Grebenjuk V. A., Skorokhod A., Müller W. E. G. (2003): Approaches for a sustainable use of the bioactive potential in sponges: analysis of gene clusters, differential display of mRNA and DNA chips. In: *Sponges: (Porifera)* ur. Müller W. E. G., Springer, Berlin. 199-230.

Castillo-Davis C. I., Mekhedov S. L., Hartl D. L., Koonin E. V., Kondrashov F. A. (2002): Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat. Genet.* 31: 415-418.

Coghlan A., Wolfe K.H. (2004): Origins of recently gained introns in *Caenorhabditis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11362-11367.

Coleman M.A., Miller K.A., Beernink P.T., Yoshikawa D.M., Albala J.S. (2003): Identification of chromatin-related protein interactions using protein microarrays. *Proteomics* 3: 2101-2107.

Cox M.M., Lehman I.R. (1982): RecA protein-promoted DNA strand exchange. Stable complexes of recA protein and single-stranded DNA formed in the presence of ATP and single stranded DNA binding protein. *J.Biol.Chem.* 257: 8523-8532.

de Semir D., Aran J.M. (2006): Targeted gene repair: the ups and downs of a promising gene therapy approach. *Curr. Gene Ther.* 6: 481-504.

DiRuggiero J., Brown J.R., Bogert A.P., Robb F.T. (1999): DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor? *J. Mol. Evol.* 49: 474-484.

Dosanjh M.K., Collins D.W., Fan W., Lennon G.G., Albala J.S., Shen Z., Schild D. (1998): Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acid Res.* 26: 1179-1184.

Drew D., Newstead S., Sonoda Y., Kim H., von Heijne G. Iwata S. (2008): GFP-optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Protocols* 3: 784-798.

Fahey B., Larroux C., Woodcroft B. J., Degnan B. M. (2008): Does the High Gene Density in the Sponge NK Homebox Gene Cluster Reflect Limited Regulatory Capacity? *Biol. Bull.* 214: 205-217.

Federov A., Merican A.F., Gilbert W. (2002): Large-scale comparison of intron position among animal, plant, and fungal genes. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 99: 16128-16133.

Gamulin V., Müller I. M., Müller W. E. G. (2000): Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*. Biol. J. Linnean Soc. 71: 821-828.

Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 31:3784-3788.

Havre P.A., Rice M., Ramos R., Kmiec E.B. (2000): HsRec2/ Rad51L1, a protein influencing cell cycle progression, has protein kinase activity. Exp. Cell Res. 254: 33-44.

Haynes R.H., Kunz, B.A. (1981) DNA repair and mutagenesis in yeast. U: Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.M. (ur.) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Life Cycle and Inheritance. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 371-414.

Henning W., Sturzbecher H.W. (2003): Homologous recombination and cell checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. Toxicology 193: 91-109.

Hickman Jr. C.P., Roberts L.S., Larson A. (2000): Animal diversity. The McGraw-Hill Companies, Boston.

Hutchins M., Thoney D.A., Schlager N. (2003): Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Gale Group, Detroit.

Ito M., Yamamoto S., Nimura K., Hiraoka K., Tamai K., Kaneda Y. (2005): Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. J. Gene Med. 7: 1044-1052.

Kawabata M., Kawabata T., Nishibori M. (2005): Role of recA/RAD51 Family Proteins in Mammals. *Acta Med. Okayama* 59: 1-9.

Kim H.K., Morimatsu K., Norden B., Ardhhammar M., Takahashi M. (2002): ADP stabilizes the human Rad51-single stranded complex and promotes its DNA annealing activity. *Genes Cells* 7: 1125-1134.

Kliman R. M., Hey J. (1993): Reduced natural selection associated with low recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1239-1258.

Komori K., Miyata T., DiRuggiero J., Holley-Shanks R., Hayashi I., Cann I.K., Mayanagi K., Shinagawa H., Ishino Y. (2000): Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in *Pyrococcus furiosus*. *J.Biol. Chem.* 275: 33782-33790.

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D.G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Li W. H., Graur D. (1991): *Grundriß der Zoologie*, Fischer, Stuttgart.

Liu N., Lamerdin J.E., Tebbs R.S., Schild D., Tucker J.D., Shen M.R., Brookman K.W., Siciliano M.J., Walter C.A., Fan W. I sur. (1998): XRCC2 and XRCC3, new human Rad51 family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol.Cell* 1: 783-793.

Liu N., Schild D., Thelen M.P., Thompson L.H. (2002): Involvement of RAD51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res.* 30: 1009-1015.

Liu Y., Tarsounas M., O'Regan P., West S.C. (2007): Role of Rad51Cand Xrcc3 in Genetic Recombination and DNA Repair. *J. Biol. Chem.* 282: 1973-1979.

Matonić kin I., Habdija I., Primc-Habdija B. (1998): Beskralješnjaci: biologija nižih avertebrata. Školska knjiga, Zagreb.

Menetski J.P., Kowalczykowski S.C. (1985): Interaction of recA protein with single-stranded DNA. Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors. *J. Biol. Chem.* 181: 281-295.

Miller S. A., Harley J. P. (1999): Zoology. The McGraw-Hill Companies, Boston.

Müller W. E. G. (2003): Sponges (Porifera). Springer, Berlin.

Nicholas K. B., Nicholas H. B. Jr., Deerfield D. W. (1997): GeneDoc: analysis and visualisation of genetic variation. *Embnew. News* 4:14.

Ohnishi T., Taki T., Hiraga T., Arita N., Morita T. (1998): In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 319-324.

Pittman D.L., Weinberg L.R., Schimenti J.C. (1998): Identification, characterization and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics* 49: 103-111.

Qiu W.G., Schisler N., Stoltzfus A. (2004): The evolutionary gain of spliceosomal introns: Sequence and phase preferences. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1252-1263.

Renodon-Cornière A., Takizawa Y., Conilleau S., Tran V., Iwai S., Kurumizaka H., Takahashi M. (2008): Structural Analysis of the Human Rad51 Protein-DNA Complex

Literatura

Filament by Tryptophan Fluorescence Scanning Analysis: Transmission of Allosteric Effects between ATP Binding and DNA Binding. J. Mol. Biol. 383: 575-587.

Rinaldo C., Ederle., Rocco V., La Volpe A. (1998): The *Caenorhabditis elegans* RAD51 homolog is transcribed into two alternative mRNAs potentially encoding proteins of different sizes. Mol. Gen. Genet. 260: 289-294.

Rogozin I.B., Wolf Y.I., Sorokin A.V. (2003): Remarkable interkingdom conservation of intron position and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. Curr. Biol. 13: 1512-1517.

Rogozin I.B., Sverdlov A.V., Babenko V.N., Koonin E. (2005): Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. Brief. Bioinformatics 6: 118-134.

Roy S.W., Federov A., Gilbert W. (2003): Large-scale comparison of intron position in mammalian genes shows intron loss but no gain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 7158-7162.

Roy S.W., Gilbert W. (2005): Rates of intron loss and gain: Implications for early eukaryotic evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 5773-5778.

Scully R., Chen J., Ochs R.L., Keegan K., Hoekstra M., Feunteun J., Livingston D.M. (1997): Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. Cell 90: 425-435.

Shinohara A., Ogawa H., Ogawa T. (1992): Rad51 protein involved in repair and recombination in *S.cerevisiae* is a RecA-like protein. Cell 69: 457-470.

Sturzbecher H.W., Donzelmann B., Henning W., Knippschild U., Buchhop S. (1996): p53 is linked directly to homologous recombination processes via Rad51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 15: 1992-2002.

van Gent D.C., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. (2001): Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2: 196-206.

Tarsounas M., Munoz P., Class A., Smiraldo P.G., Pittman D.L., Blasco M.A., West S.C. (2004): Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* 117: 337-347.

Thompson L.H., Schild D. (2002): Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat.Res.* 509: 49-78.

Thacker J. (1999): The role of homologous recombination processes in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. *Biochimie.* 81: 77-85.

West S.C. (2003): Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 435-445.

West S.C., Cassuto E., Howard-Flanders P. (1981): Rec A protein promotes homologous-pairing and strand exchange reaction between duplex DNA molecules. *Proc. Natl Acad. Sci.* 78: 2100-2104.

West S.C. (2003): Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 435-445.

Wimmer W., Perovic S., Kruse M., Krasko A., Batel R., Müller W. E. G. (1999): Origin of the integrin-mediated signal transduction: functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur. J. Biochem.* 178: 156-165.

Yanowitz J.L. (2008): Genome Integrity Is Regulated by the *Caenorhabditis elegans* Rad51D Homolog *rfs-1*. Gen. Soc. America : 249-262.

Yuan S.S., Lee S.Y., Chen G., Song M., Tomlinson G.E., Lee E.Y. (1999): BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex *in vivo*. Cancer Res. 59: 3547-3551.

Yokoyama H., Sarai N., Kagawa W., Enomoto R., Shibata T., Kurumizaka H., Yokoyama S. (2004): Preferential binding to branched DNA strands and strand-annealing activity of the human Rad51B, Rad51C, Rad51D and Xrcc2 protein complex. Nucleic Acid Res. 32: 2556-2565.

<http://trc.ucdavis.edu/>

<http://www.biology.lsu.edu>.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

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

[http://depts.washington.edu/](http://depts.washington.edu)

[http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/](http://encyclopedia2.thefreedictionary.com)

<http://www.expasy.org>.

<http://www.geologischevereniging.nl>.

<http://www.matcmadison.edu>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gfx/genedoc/index.html>.

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp>.

<http://www.scq.ubc.ca>.

<http://www.tata-box.com>.

<http://www.zipcodezoo.com>.