Genomski rearanžmani u bakteriji Deinococcus radiodurans: Uloga proteina RecG

Hleb, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:153360

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Ana Hleb

Genomski rearanžmani u bakteriji *Deinococcus radiodurans* : uloga proteina RecG

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

Ana Hleb

Genomski rearanžmani u bakteriji *Deinococcus radiodurans* : uloga proteina RecG

DIPLOMSKI RAD

Voditelj : Doc.dr.sc. Nataša Hulak
Dr.sc. Ksenija Zahradka

Zagreb, 2018.

Ovaj završni rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Nataša Hulak _____

2. Dr. sc. Ksenija Zahradka _____

3. Doc.dr.sc. Luna Maslov Bandić _____

4. Dr. sc. Dušica Vujaklija _____

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju na Institutu „Ruđer Bošković“ pod stručnim vodstvom dr. sc. Ksenije Zahradka.

Iskreno se zahvaljujem svim djelatnicima Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju Instituta „Ruđer Bošković“ na strpljenju i bezuvjetnoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, a posebno dr. sc. Kseniji Zahradka.

SAŽETAK

Bakterija *Deinococcus radiodurans* spada u skupinu organizama koji su se prilagodili životu u ekstremnim uvjetima. Izuzetno je otporna na razne faktore koji uzrokuju oštećenja molekule DNA poput UV zračenja, ionizacijskog zračenja, isušivanja te izlaganja kemijskim mutagenim spojevima. Ono što najviše plijeni pažnju kod bakterije *D. radiodurans* je njena otpornost na visoke doze ionizacijskog zračenja, točnije x-zraka i gama zraka; može preživjeti dozu zračenja od 20000 Gy, što je 3000 puta veća doza od one koja se smatra letalnom za čovjeka. Najteži tip oštećenja genoma nakon zračenja predstavljaju dvolančani lomovi DNA. Oni se u bakteriji *D. radiodurans* popravljaju posebnim mehanizmom koji se bazira na homolognoj rekombinaciji te uključuje opsežnu sintezu DNA. Ključnu ulogu u ovom popravku ima protein RecA. U bakterijama mutiranima u genu *recA* odvija se RecA-neovisni popravak koji je, međutim, slabo učinkovit, neprecizan i dovodi do velikih genomskih rearanžmana. Cilj ovog rada bio je istražiti učinak mutacije *recG* na popravak DNA i genomsku nestabilnost *recA* mutanata bakterije *D. radiodurans*. Ispitali smo preživljenje mutanata *recA* i *recA recG* nakon UV i gama zračenja, a metodom elektroforeze u promjenjivom električnom polju analizirali smo DNA stanica koje su preživjele 2 kGy gama zračenja. Dobiveni rezultati pokazuju da su mutanti *recA recG* podjednako osjetljivi na zračenje kao i mutanti *recA*, no za razliku od njih, ne stvaraju velike genomske rearanžmane.

Ključne riječi: *Deinococcus radiodurans*, gama zračenje, homologna rekombinacija, protein RecA, protein RecG

SUMMARY

Bacterium *Deinococcus radiodurans* belongs to the group of organisms adapted to the life in extreme conditions. It is extremely resistant to various agents that cause damage to DNA molecules such as UV radiation, ionizing radiation, desiccation and exposure to various mutagenic compounds. The most interesting feature of *D. radiodurans* is its resistance to high doses of ionizing radiation, namely x-rays and gamma rays; it can survive the dose of 20,000 Gy, which is 3,000 fold higher than the dose that is lethal for a human. The most severe form of genomic damage after radiation is double-strand DNA breaks. In *D. radiodurans* double-strand DNA breaks are repaired by a special mechanism that is based on homologous recombination, and which involves extensive DNA synthesis. The key role in this mechanism is played by the RecA protein. In *D. radiodurans* cells mutated in the *recA* gene, a RecA-independent repair takes place, which is, however, less efficient, inaccurate and leads to gross genome rearrangements. The aim of this work was to investigate the effect of a *recG* mutation on DNA repair and genomic instability of *D. radiodurans recA* mutants. We examined survival after UV and gamma radiation in *recA* and *recA recG* mutants and analyzed their DNA by pulsed-field gel electrophoresis. Our results showed that the *recA recG* mutants are as sensitive to radiation as the *recA* mutants, but do not produce gross genome rearrangements.

Keywords: *Deinococcus radiodurans*, gamma radiation, homologous recombination, RecA protein, RecG protein

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE BAKTERIJE DEINOCOCCUS RADIODURANS 2
1.2. OTPORNOST BAKTERIJE D. RADIODURANS NA GAMA I UV ZRAČENJE 4
1.3. ANTIOKSIDACIJSKA ZAŠTITA U BAKTERIJI D. RADIODURANS 7
1.4. POPRAVAK DVOLANČANIH LOMOVA DNA U BAKTERIJI D. RADIODURANS 8
1.5. PROTEIN RECA 11
1.6. RECA-NEOVISNI POPRAVAK DVOLANČANIH LOMOVA DNA 13
1.7. PROTEIN RECG 15

2. CILJ RADA 17

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. MATERIJALI 18
3.1.1. Hranjive podloge 18
3.1.2. Puferi 18
3.1.3. Otopine 19
3.1.4. Kemikalije 20
3.2. METODE 20
3.2.1. Praćenje rasta bakterijskih kultura 20
3.2.2. Test osjetljivosti na gama zračenje 20
3.2.3. Test osjetljivosti na UV zračenje 21
3.2.4. Analiza DNA bakterije D. radiodurans metodom elektroforeze u promjenjivom električnom polju (engl. „Pulsed-Field Gel Electrophoresis“, PFGE)--- 21

4. REZULTATI 27

4.1. RAST MUTANATA RECA I RECA RECG BAKTERIJE D. RADIODURANS 27
4.2. OSJETLJIVOST MUTANATA RECA I RECA RECG BAKTERIJE D. RADIODURANS NA GAMA I UV ZRAČENJE 29
4.3. DETEKCIJA GENOMSKIH REARANŽMANA KOD MUTANATA RECA I RECA RECG BAKTERIJE D. RADIODURANS 31

5. RASPRAVA 34

6. ZAKLJUČCI 38

7. LITERATURA 39

1. Uvod

Bakterija *Deinococcus radiodurans* pripada skupini ekstremofila, organizama koji su otporni na ekstremne životne uvjete kao što su isušivanje, izloženost velikim dozama zračenja i toksičnim kemikalijama (Slade i Radman, 2011). Iznimna otpornost ove bakterije temelji se na učinkovitoj zaštiti staničnih proteina od oksidacijskih oštećenja te učinkovitom popravku staničnog genoma. Bakterija *D. radiodurans* može rekonstruirati svoj genom od stotina kromoskomskih fragmenata nastalih uslijed radijacije ili dehidracije, za razliku od drugih organizama čiji je genom pod istim uvjetima nepovratno uništen. Molekularni mehanizam kojim ova bakterije obnavlja svoj genom nakon izlaganja velikim dozama gama zračenja rasvjetljen je 2006. godine; proces je izuzetno učinkovit i precizan, zasniva se na homolognoj rekombinaciji i uključuje opsežnu sintezu DNA (Zahradka i sur., 2006).

Ključnu ulogu u popravku DNA nakon gama zračenja u bakteriji *D. radiodurans* ima protein RecA (Zahradka i sur., 2006). Uz presudnu ulogu u efikasnoj rekonstrukciji genoma (putem homologne rekombinacije), protein RecA bakterije *D. radiodurans* je neophodan i za preciznost popravka DNA. Naime, u odsutnosti ovog proteina, popravak DNA je slabo učinkovit i neprecizan te dovodi do velikih genomskih rearanžmana (Repar i sur., 2010). Točan molekularni mehanizam ovog RecA-neovisnog popravka DNA nije poznat.

U ovom radu ispitana je uloga proteina RecG u RecA-neovisnom popravku DNA u bakteriji *D. radiodurans*. Protein RecG, produkt istoimenog gena, je DNA helikaza koja sudjeluje u obradi rekombinacijskih intermedijera tijekom homologne rekombinacijei rekombinacijskog popravka DNA. Uloga ovog proteina u popravku DNA kod bakterije *D. radiodurans* nije razjašnjena.

1.1. Opće karakteristike bakterije *Deinococcus radiodurans*

Bakterija *Deinococcus radiodurans* je ekstremofilna bakterija, odnosno organizam prilagođen životu u ekstremnim uvjetima. Zbog svoje sposobnosti preživljavanja velikih doza zračenja i uvjeta ekstremnih isušivanja, ova bakterija, uz još nekoliko vrsta, predstavlja jedinstveni fenomen u živome svijetu. Naziv joj potječe od grčkih riječi „deinos“ i „kokkos“ što znači strašno zrno/bobica te od latinskog „radius“ i „durare“ što bi u prijevodu značilo preživjeti zračenje; ove riječi najbolje opisuju glavno svojstvo ove bakterije – izuzetnu otpornost na zračenje.

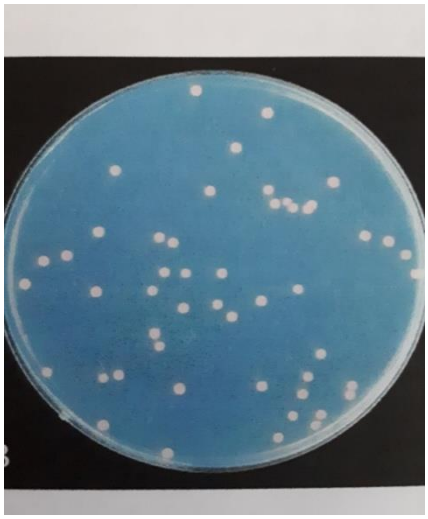
Otkrivena je 1956. godine od strane Andersona i suradnika u Oregonu (SAD), u eksperimentu kojim se htjelo utvrditi može li se konzervirana hrana sterilizirati velikim dozama γ-računja. Konzerva goveđeg mesa je ozračena dozom gama zračenja od 4000 Gy za koju se smatralo da eliminira svaki oblik života, no meso se naknadno pokvarilo, a iz njega je izolirana bakterija *D. radiodurans*. Doza zračenja korištena u tom eksperimentu je 250 puta veća od doze koja ubija bakteriju *Escherichia coli*. Iako je prvo svrstana u rod *Micrococcus*, nakon procjene sekvenci ribosomske RNA svrstana je u zaseban rod pod nazivom *Deinococcus*, odnosno u porodicu *Deinococcaceae* u kojoj je do danas opisano 30-tak rezistentnih vrsta.

Bakterija *D. radiodurans* je Gram-pozitivna, kuglasta, crveno-pigmentirana, nesporulirajuća bakterija veličine 1-2 μm (Battista, 1997; Cox i Battista, 2005). Izuzetno je pogodna za genetička istraživanja zbog toga što je nepatogena, lako se uzgaja i ima sposobnost prirodne transformacije. Također je genetički modificirana u svrhu bioremedijacije, za čišćenja odlagališta otpada koja sadrže opasne tvari, a pokazuje i odličan potencijal za korištenje u područjima nanotehnologije i biomedicinskih istraživanja. Optimalna temperatura za njezin rast je 30ºC, dok temperature niže od 4ºC i više od 45ºC zaustavljaju rast. U takvim optimalnim uvjetima generacijsko vrijeme, odnosno vrijeme koje je potrebno da se stanica podijeli na dvije, iznosi približno 90 min. Iako je *D. radiodurans* Gram-pozitivna bakterija, građa njene stanične stijenke je sličnija Gram-negativnim organizmima. Stanična stijenka joj se sastoji od unutarnje i vanjske membrane, peptidoglikanskog sloja, bogatog lipidnog sloja te nekoliko još nedovoljno karakteriziranih slojeva (Slade i Radman, 2011).

Tijekom laboratorijskog uzgoja u tekućoj hranidbenoj podlozi TGY (vidi odjeljak 3.1.1) bakterija *D. radiodurans* raste uglavnom u parovima i tetradama (slika 1). Na krutoj hranidbenoj podlozi stvara konveksne, glatke, ružičasto obojene kolonije (slika 2).



Slika 1. Stanice bakterije *D. radiodurans* (u obliku tetrade i para) obojane fluorescentnom bojom DAPI (koja se veže specifično za molekulu DNA) i snimljene fluorescencijskim mikroskopom (izvor: Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju, IRB)



Slika 2. Kolonije bakterije *D. radiodurans* na krutoj hranidbenoj podlozi TGY (izvor: Laboratorij za molekularnu mikrobiologiju, IRB)

Bakterija *D. radiodurans* je pronađena na različitim staništima, od onih bogatih organskim tvarima kao što su zemlja i životinjski feces, do onih siromašnih vodom i hranjivim tvarima poput golih stijena ili pustinjskih područja (npr. stjenoviti granit Antarktičkih suhih dolina).

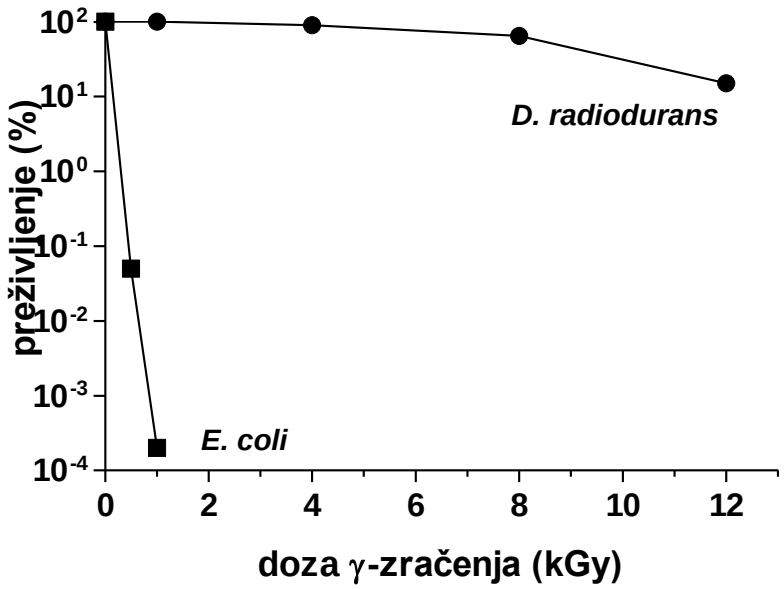
Genom bakterije *D. radiodurans* je u potpunosti sekvenciran, veličine je 3,28 Mbp te se sastoji od dva kružna kromosoma (veličine 2,65 Mbp i 412 kbp), megaplazmida (177 kbp) i malog plazmida (45,7 kbp) (White i sur., 1997). Stanice su poliplodne i sadrže četiri do deset

kopija genoma, ovisno o tome da li se nalaze u stacionarnoj ili eksponencijalnoj fazi rasta (Battista, 1997; Cox i Battista, 2005). Usporedne analize genoma bakterije *D. radiodurans* s genomima drugih organizama pokazale su njegovu "mozaičnu" prirodu; velik broj gena ove bakterije najvjerojatnije je stečen horizontalnim prijenosom iz različitih izvora tj. organizama (Makarova i sur., 2001).

1.1. Otpornost bakterije *D. radiodurans* na gama i UV zračenje

Gama zračenje je visokoenergetsko elektromagnetsko zračenje. Predajom energije, ono može ekscitirati i ionizirati molekule. Na taj način može djelovati izravno na stanične komponente, ili prolaskom kroz stanični vodeni medij može uzrokovati nastanak reaktivnih spojeva kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), tzv. slobodnih kisikovih radikala. Na molekularnoj razini, prekomjerna količina slobodnih kisikovih radikala oštećuje stanične proteine, lipide u membranama, ugljikohidrate, kao i nukleinske kiseline. Gama zračenje izaziva različite tipove oštećenja molekule DNA: više od 80 različitih tipova strukturalnih modifikacija purinskih i pirimidinskih baza, šećera deoksiriboze, jednolančanih i dvolančanih lomova te unakrsno međusobno povezivanje lanaca DNA (engl. *Cross-Linking*) (Imlay, 2003; Friedberg i sur., 2006). Porastom doze gama zračenja linearno se povećava gustoća oštećenja baza i jednolančanih lomova na oba lanca DNA te posljedično dvolančanih lomova DNA. Dvolančani lomovi su najopasnija vrsta oštećenja DNA; oni predstavljaju potpuni gubitak genetičke informacije i moraju se popraviti da bi se molekula DNA mogla pravilno umnožavati te da bi stanica preživjela.

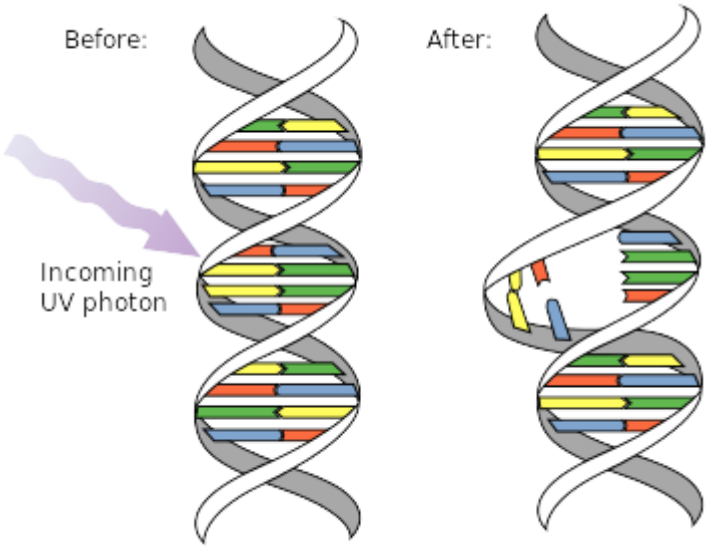
Bakterija *D. radiodurans* je ekstremno otporna na gama zračenje; sposobna je preživjeti dozu od 5 000 Gy bez gubitka vijabilnosti te dozu od 12 000 Gy uz 37 % vijabilnosti, za razliku od bakterije *Escherichia coli* kod koje već nakon doze od 1000 Gy nema preživjelih stanica (slika 3). Doza od 5 000 Gy izaziva više od 500 dvolančanih lomova DNA, barem 10 puta više jednolančanih lomova i još više oštećenja dušičnih baza (Slade i Radman, 2011).



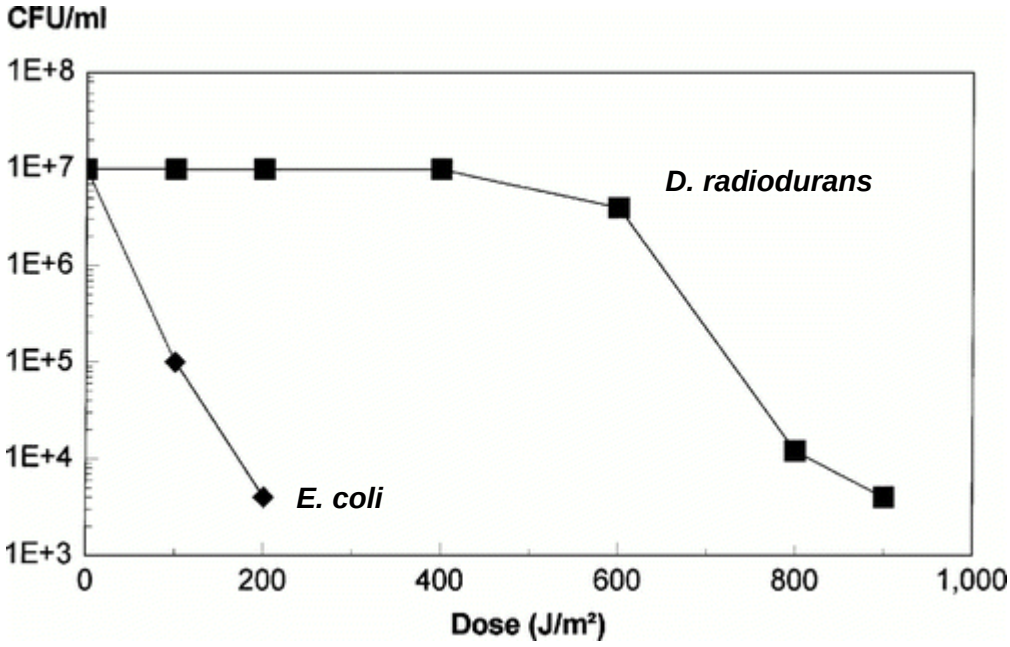
Slika 3. Preživljenje bakterija *Deinococcus radiodurans* i *Escherichia coli* nakon gama (γ) zračenja (prema: Battista, 1997)

Bakterija *D. radiodurans* pokazuje izuzetnu otpornost i na ultraljubičasto (UV) zračenje. UV zračenje direktno djeluje na molekulu DNA tako što uzrokuje povezivanje susjednih pirimidinskih baza (najčešće timina) što dovodi do stvaranja pirimidinskih dimera (slika 4). Pirimidinski dimeri predstavljaju prepreku za proces replikacije DNA i moraju se ukloniti da bi stanica preživjela. Pirimidinski dimeri se popravljaju ekscizijskim popravkom, koji omogućuje njihovo izrezivanje iz DNA i zamjenu ispravnim nukleotidima. U slučaju neuspješnog ekscizijskog popravka, kao sekundarna posljedica UV zračenja u molekuli DNA mogu nastati dvolančani lomovi. Također, ukoliko dva pirimidinska dimera nastanu blizu jedan drugome u dva lanca DNA, njihovim izrezivanjem može nastati dvolančani lom.

Doza UV zračenja od 500 J/m^2 stvara približno 5 000 pirimidinskih dimera po genomu (Battista, 1997); bakterija *D. radiodurans* preživljava ovu dozu sa 100% -tnom vijabilnošću, za razliku od bakterije *E. coli* kod koje je ova doza UV zračenja letalna (slika 5).



Slika 4. Djelovanje UV zračenja na molekulu DNA (izvor: https://sh.wikipedia.org/wiki/Pirimidinski_dimer#/media/File:DNA_UV_mutation.svg)



Slika 5. Preživljenje bakterija *D. radiodurans* i *E. coli* nakon UV zračenja (Battista, 1997)

Poput ionizirajućeg zračenja, i isušivanje izaziva dvolančane lomove u molekuli DNA, a broj tih lomova ovisi o trajanju isušivanja. Bakterija *D. radiodurans* može preživjeti šest tjedana dehidracije bez gubitka vijabilnosti, a nakon opskrbe vodom, može rekonstruirati svoj genom i revitalizirati sve svoje metaboličke funkcije. Sve dosad ispitane bakterije otporne na isušivanje pokazale su i iznimnu otpornost na zračenje (Mattimore i Battista, 1996). Stoga se smatra da se radiorezistencija razvila kao popratna pojava rezistencije na isušivanje – stanice su tijekom evolucije razvile veliki kapacitet za popravak svoga genoma koji biva oštećen u ekstremno suhim uvjetima.

Od otkrića bakterije *D. radiodurans*, nakon više od pola stoljeća istraživanja, rasvjetljena je tajna robusnosti ove bakterije. Sposobnost bakterije *D. radiodurans* da preživi ekstremna oštećenja svog genoma je posljedica učinkovite zaštite staničnih proteina od oksidativnog stresa (Daly, 2009; Kriško i Radman, 2013) te učinkovitog i preciznog popravka fragmentirane molekule DNA (Zahradka i sur., 2006). Pretpostavlja se da je velika otpornost ove bakterije na zračenje omogućena kroz finu regulaciju različitih procesa, kao što su razgradnja oštećenih makromolekula, homeostaza iona mangana, nagomilavanje malih metabolita, stroga kontrola staničnog disanja i produkcije energije te razgradnja i popravak DNA (Slade i Radman, 2011).

1.2. Antioksidacijska zaštita u bakteriji *D. radiodurans*

Bakterija *D. radiodurans* je razvila snažan i raznolik sustav antioksidacijske obrane koji uključuje raznovrsne antioksidacijske enzime (katalaze, superoksid dismutaze i peroksidaze) te ne-enzimatske komponente (komplekse mangana, karotenoide, male metabolite) (Slade i Radman, 2011).

Genom bakterije *D. radiodurans* kodira široki repertoar antioksidacijskih enzima: tri katalaze, dvije peroksidaze te četiri superoksid dismutaze. Ovi enzimi djeluju kao stanični "čistači" (engl. *Scavengers)*; uklanjanjem slobodnih kisikovih radikala imaju važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidativnog stresa (Slade i Radman, 2011).

Ne-enzimatski sustavi imaju vrlo važnu ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa izazvanog gama zračenjem. Glavnu ulogu u tom kontekstu imaju ioni mangana i njihovi kompleksi (Daly i sur., 2007; Daly 2009). Bakterija *D. radiodurans* akumulira visoke koncentracije iona Mn^{2+} u stanici, a usporedba otpornosti na gama zračenje različitih vrsta bakterija i arheja

pokazuje da je zaštita proteina od oštećenja povezana s akumulacijom iona Mn^{2+} u stanici. Također se smatra da visoki unutarstanični omjer iona Mn^{2+} prema Fe^{2+} u bakteriji *D. radiodurans* doprinosi zaštiti proteina od oksidacije nakon gama zračenja (Daly i sur., 2007). Nadalje, ioni Mn^{2+} stupaju u interakcije s malim metabolitima (npr. ortofosfatima i peptidima); ovi kompleksi mangana djeluju kao efikasni "hvatači" slobodnih radikala te podižu razinu zaštite proteina u stanicama (Daly i sur., 2007, Daly 2009).

Otpornosti bakterijskih stanica na zračenje pridonose i drugi metaboliti s dokazanim antioksidativnim djelovanjem, kao što su npr. karotenoidi (Zhang i sur., 2009). U genomu bakterije *D. radiodurans* postoji 13 gena koji sudjeluju u biosintezi karotenoida. Glavni produkt te biosinteze je deinoksantin, koji je specifičan za ovu bakteriju i daje joj crvenu boju. U uvjetima *in vitro* je pokazano da deinoksantin uklanja slobodne kisikove radikale efikasije od dva karotena (likopena i β-karotena) i dva ksantofila (zeaksantina i luteina). Međutim, mutanti u genu za deinoksantin pokazali su se tek neznatno osjetljivijim na UV i gama zračenje (Zhang i sur., 2007), što upućuje da antioksidacijsko djelovanje karotenoida nije presudno za radiorezistenciju.

U usporednim istraživanjima bakterija i životinja otpornih na zračenje (*D. radiodurans*, *Adineta vaga*) i osjetljivih na zračenje (*E. coli*, *Caenorhabditis elegans*) otkrivena je korelacija između oksidacijskog oštećenja proteina i stanične smrti (Kriško i Radman, 2010; Kriško i Radman, 2013). Smatra se da je za učinkovitu zaštitu staničnog proteoma od oksidacije odgovorna mješavina metabolita male molekulske mase (<3 kDa). Pretpostavlja se da ovaj zaštitni "koktel" molekula sadrži neke od najmoćnijih antioksidansa u prirodi (koji se tek trebaju izolirati i karakterizirati).

1.3. Popravak dvolančanih lomova DNA u bakteriji *D. radiodurans*

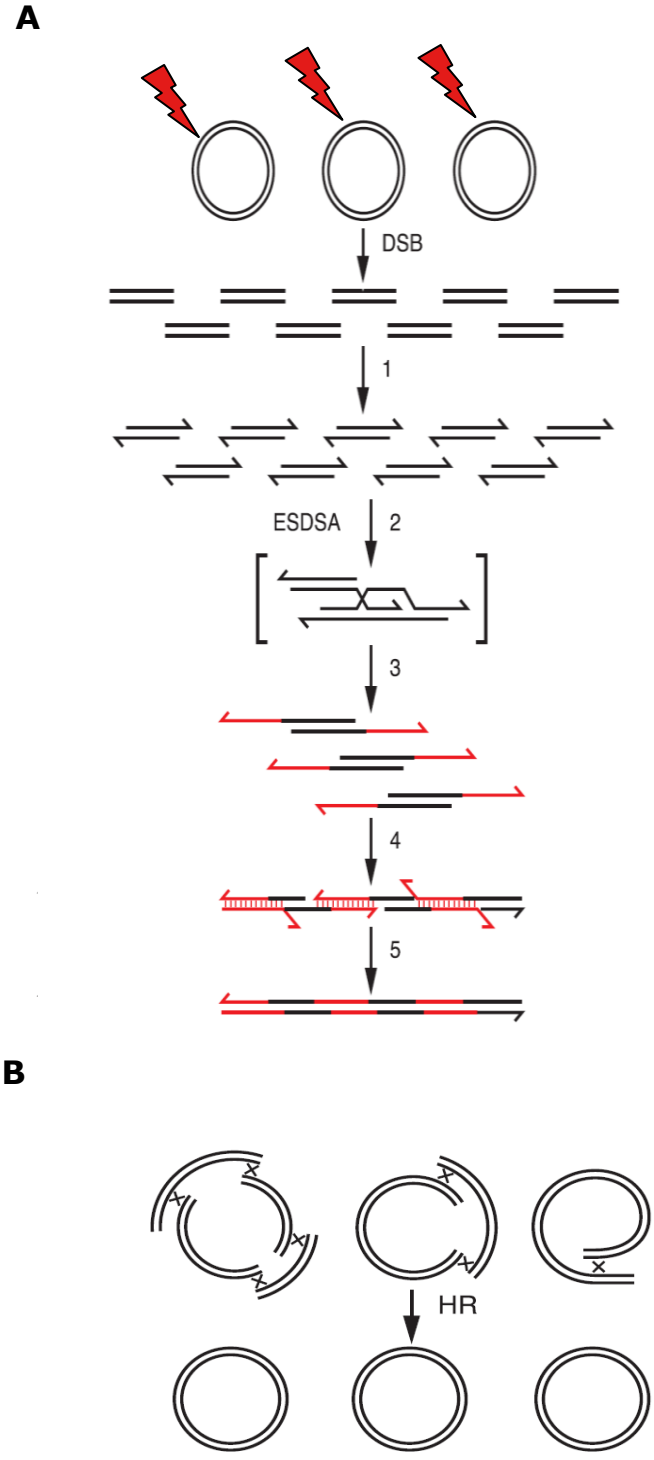
Antioksidativni mehanizmi koji štite proteine u bakteriji *D. radiodurans*, ne štite i molekulu DNA od posljedica zračenja. Velika doza gama zračenja od 5 000 Gy izaziva stotine dvolančanih lomova DNA, odnosno cijepa genom u stotine fragmenata. Bakterija *D. radiodurans* ima sposobnost da efikasno i precizno rekonstruira svoj genom iz stotina fragemenata bez gubitka vijabilnosti i bez velikih genomskih rearanžmana (Zahradka i sur., 2006; Repar i sur., 2010). Ova izuzetna efikasnost rekonstrukcije genoma ukazuje na važnost sustava za popravak DNA u preživljavanju gama zračenja.

Molekularni mehanizam rekonstrukcije genoma bakterije *D. radiodurans* nakon gama zračenja je otkriven 2006. godine, bazira se na homolognoj rekombinaciji, a odvija se u dvije faze (Zahradka i sur., 2006) (slika 6). Prva faza uključuje sintezu dugačkih jednolanačanih produžetaka na krajevima fragmenata DNA i njihovo sparivanje (engl. *Extended Synthesis-Dependent Strand Annealing,* ESDSA) (slika 6, A). U drugoj fazi dolazi do povezivanja dugačkih linearnih intermedijera u kružne, funkcionalne kromosome konzervativnom homolognom rekombinacijom (putem "crossing-overa") (slika 6, B). Iako svi enzimatski detalji ovog reparatornog procesa još nisu poznati, ispitana je uloga većine homologa proteina koji u drugim bakterijama (npr. *E. coli*) imaju bitne uloge u procesu homologne rekombinacije.

Mehanizam ESDSA (slika 6, A) započinje obradom krajeva dvolančanih fragmenata DNA koji nastaju nakon zračenja, pri čemu se oslobađaju jednolančani 3' krajevi (korak 1). Od homologa proteina koji bi mogli sudjelovati u stvaranju rekombinantnih 3' krajeva u bakteriji *D. radiodurans* vjerojatnu ulogu imaju helikaza UvrD i nukleaza RecJ (Bentchikou i sur., 2010). Na jednolančane 3' krajeve nanosi se glavni rekombinacijski protein RecA, i to pomoću proteinskog kompleksa RecFOR, a nastali RecA-filament započinje potragu za homolognim slijedom unutar drugih fragmenata DNA (korak 2). Zanimljivo je da bakterija *D. radiodurans* nema homologa enzima RecBCD (Makarova i sur., 2001); to je enzim koji u bakteriji *E. coli* (i u mnogim drugim bakterijama) ima glavnu ulogu u obradi dvolančanih krajeva DNA (jer posjeduje i helikaznu i nukleaznu aktivnost), a također posreduje i u nanošenju proteina RecA na jednolančanu DNA (Michel i Leach, 2013).

Po pronalasku homologije, jednolančani 3' krajevi služe kao početnice za opsežnu sintezu DNA (korak 3) koja ovisi o polimerazama PolI i PolIII (Zahradka i sur., 2006; Slade i sur., 2009). Specifičnost mehanizma ESDSA je u tome što se fragmenti DNA (nastali zračenjem) koriste i kao početnice i kao kalupi za opsežnu sintezu komplementarnih jednolančanih produžetaka DNA. Ti produžeci postaju "ljepljivi" krajevi koji se sparuju s velikom preciznošću (korak 4), sklapajući fragmente DNA u dugačke linearne intermedijere (korak 5).

U drugoj fazi popravka (slika 6, B), linearni intermedijeri nastali procesom ESDSA sklapaju se u kružne funkcionalne kromosome konzervativnom homolognom rekombinacijom koja ovisi o proteinu RecA (Zahradka i sur., 2006).



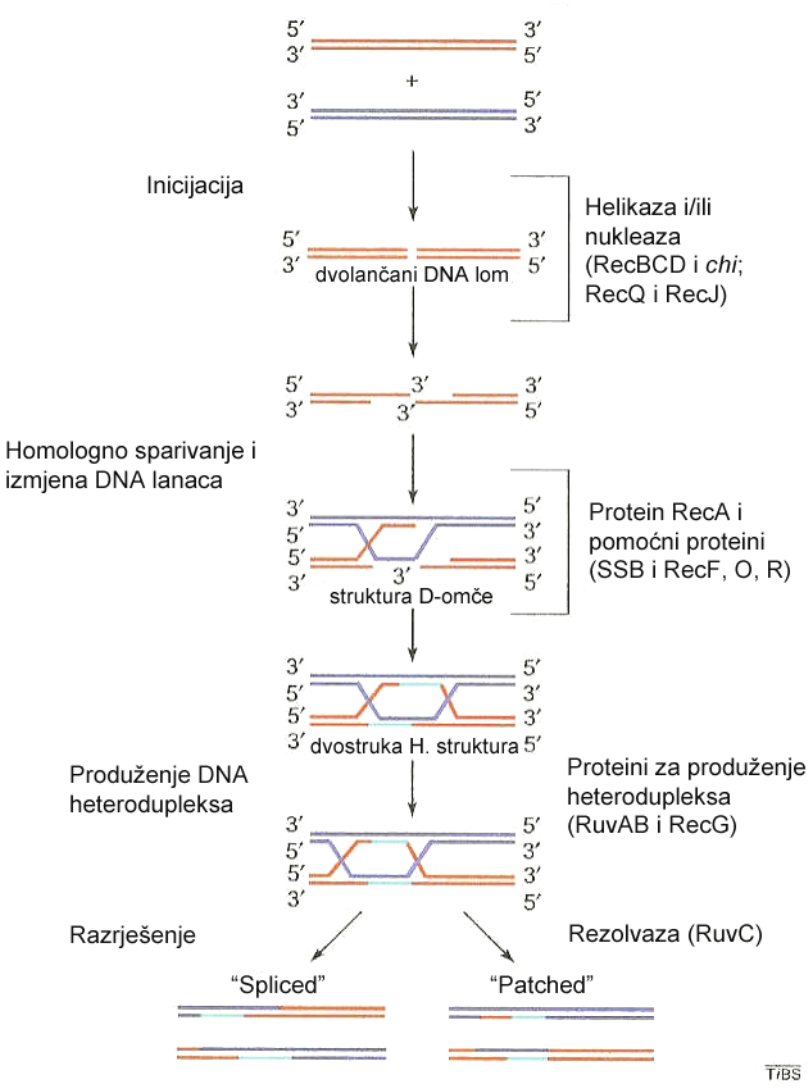
Slika 6. Mehanizam popravka dvolančanih lomova DNA kod bakterije *D. radiodurans* nakon gama zračenja (prema: Zahradka i sur., 2006)

Mehanizam ESDSA jedinstven je za bakteriju *D. radiodurans*. Sličan mehanizam (engl. *Synthesis-Dependent Strand Annealing*, SDSA) opisan je u kvascu, no uz manje obimnu sintezu DNA (Haber, 2000). Pretpostavlja se da upravo specifičnost mehanizma ESDSA pridonosi iznimnoj efikasnosti i preciznosti rekonstrukcije pocijepanog genoma bakterije *D. radiodurans*.

1.4. Protein RecA

Ključnu ulogu u procesu homologne rekombinacije i rekombinacijskog popravka DNA kod bakterija ima protein RecA (Cox, 2003). On katalizira središnju, sinaptičku fazu rekombinacije - homologno sparivanje i izmjenu lanaca DNA (slika 7).

Homologna rekombinacija i rekombinacijski popravak DNA, pa tako i protein RecA, najprije su otkriveni i najbolje istraženi u bakteriji *E. coli*. Proces homologne rekombinacije započinje obradom dvolančanih krajeva DNA koji se prevode u djelomično jednolančani oblik (Kowalczykowski, 2000; Michel i Leach, 2013). Ovisno o proteinima koji sudjeluju u inicijaciji rekombinacije, u bakteriji *E. coli* razlikujemo dva rekombinacijska puta, RecBCD i RecFOR. Na stvoreni rekombinacijski supstrat – jednolančanu DNA s 3' krajem – vežu se monomeri proteina RecA i polimeriziraju pri čemu nastaje nukleoproteinski filament (ili RecA-filament) (Cox, 2003). Naizmjeničnom asocijacijom i disocijacijom s drugom molekulom DNA, RecA-filament traži homolognu regiju i kad se homologni kontakt ostvari, dvije molekule se spare, pri čemu nastaje trolančana struktura, tzv. D-omča (slika 7). Cijepanjem D-omče i daljnjom izmjenom homolognih lanaca nastaje četverolančani rekombinacijski intermedijer – Hollidayeva struktura. Ona se sastoji od dvije homologne dvolančane molekule DNA povezane jednolančanim prekriženjem. U završnoj fazi rekombinacije vrši se obrada Hollidayeve strukture, i to u dva koraka: (i) pomicanje Hollidayeve strukture (engl. *branch migration*), kojim se produžuje regija heterodupleksa, i (ii) razrješenje Hollidayeve strukture (engl. *resolution*) kojim nastaju rekombinacijski produkti (Michel i Leach, 2013; Wyatt i West, 2014) (slika 7). Ovisno o načinu cijepanja Hollidayeve strukture, nastaju dvije vrste produkata: rekombinanti tipa "splice" koji sadrže promjenu u oba lanca DNA (tj. "*crossing-over*") ili rekombinanti tipa "patch" koji sadrže promjenu u jednom lancu DNA (tzv. konverzija gena).



Slika 7. Opći model homologne rekombinacije kod bakterije *E. coli* (na primjeru popravka dvolančanog loma DNA) (prema: Kowalczykowski, 2000)

O esencijalnoj ulozi proteina RecA svjedoči činjenica da bakterijske stanice mutirane u genu *recA* pokazuju drastičan pad rekombinacijske sposobnosti, iznimnu osjetljivost na UV i gama zračenje te slabu vijabilnost. Stoga ne čudi da je protein RecA evolucijski vrlo dobro očuvan i da su njegovi strukturni i funkcionalni homolozi nađeni i kod viših eukariota, uključujući čovjeka.

Protein RecA bakterije *D. radiodurans* dijeli 56% sličnosti u sekvenci s proteinom RecA bakterije *E. coli* (Slade i Radman, 2011). Postoje, međutim, dvije glavne funkcionalne i

regulatorne razlike između ova dva proteina. Osim ključne uloge u homolognoj rekombinaciji, protein RecA bakterije *E.coli* ima važnu regulatornu ulogu; prilikom oštećenja molekule DNA, on potiče autokatalitičko cijepanje LexA represora, što dovodi do indukcije tzv. SOS odgovora. U skopu SOS odgovora, u stanici dolazi do ekspresije niza gena čiji produkti sudjeluju u popravku DNA, regulaciji stanične diobe i mutagenezi (Friedberg i sur., 2006). Ovakva regulacija proteina RecA nije pronađena nakon oštećenja DNA u bakteriji *D. radiodurans* te se smatra da je indukcija proteina RecA u ovoj bakteriji kontrolirana drukčijim mehanizmom.

Druga razlika između deinokokalnog proteina RecA i onog bakterije *E. coli* je u afinitetu vezanja na DNA supstrat. U bakteriji *E. coli,* kao i u većini ostalih vrsta, protein RecA se preferencijalno veže za jednolančanu DNA, tvoreći RecA-filament (Cox, 2003). U uvjetima *in vitro* je pokazano da se deinokokalni protein RecA s većim afinitetom veže za dvolančanu nego za jednolančanu DNA (Kim i sur., 2002). Ovo svojstvo moglo bi imati ulogu u početnoj fazi popravka DNA u bakteriji *D. radiodurans*; vezanjem na dvolančane fragmente DNA nastale npr. gama zračenjem, protein RecA bi mogao pomoći u sprječavanju difuzije fragmenata DNA i time povećati efikasnost mehanizma ESDSA (Slade i Radman, 2011).

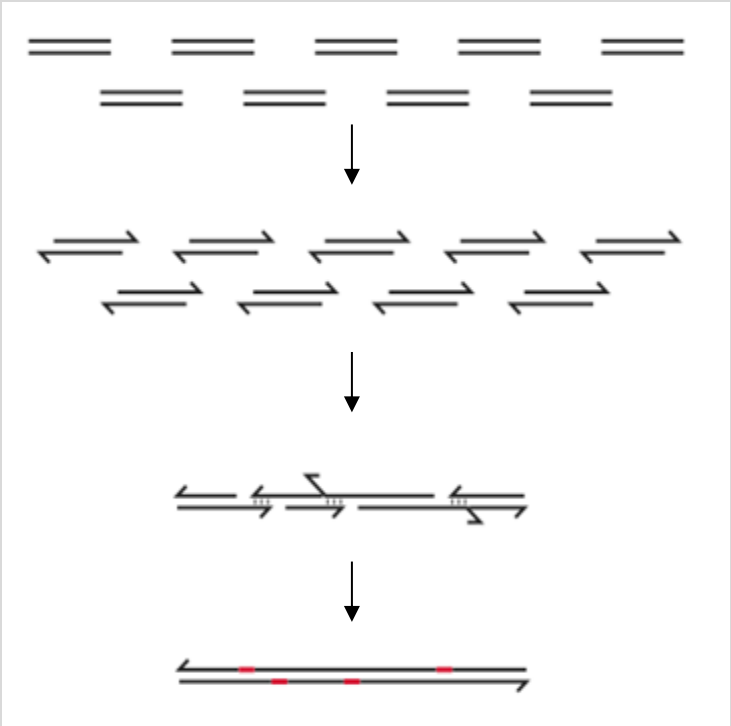
1.5. RecA-neovisni popravak dvolančanih lomova DNA

Iako protein RecA ima presudnu ulogu u efikasnoj rekonstrukciji genoma bakterije *D. radiodurans* nakon gama zračenja, u ozračenim stanicama mutanata *recA* (koji nemaju funkcionalni protein RecA) odvija se značajan rezidualni popravak dvolanačanih lomova DNA (Zahradka i sur., 2006). Ovaj popravak je karakteriziran drukčijom kinetikom, odsutnošću značajne sinteze DNA te rijetko dovodi do rekonstrukcije cjelovitog genoma. Osim toga, ovaj RecA-neovisan popravak DNA je neprecizan i dovodi do stvaranja velikih genomskih rearanžmana u bakteriji *D. radiodurans* (Repar i sur., 2010).

Dosadašnja istraživanja pretpostavljaju da se popravak dvolančanih lomova DNA u odsutnosti proteina RecA može odvijati na dva glavna načina: (i) mehanizmom koji uključuje sljubljivanje jednolančanih krajeva DNA (engl. *Single-Strand Annealing*, SSA) i (ii) nehomolognim spajanjem krajeva DNA (engl. *Non-Homologous End-Joining*, NHEJ) (Slade i Radman, 2011). Ovi mehanizmi prisutni su i dobro okarakterizirani i u eukariotima (Haber, 2000). U bakteriji *D. radiodurans* do sada nije detektirano postojanje klasičnog mehanizma

NHEJ, stoga se može pretpostaviti da se popravak DNA u odsutnosti proteina RecA odvija mehanizmom SSA ili nekim još nepoznatim mehanizmom.

U mehanizmu SSA, dvolanačni fragmenti DNA obrađuju se djelovanjem nukleaza, pri čemu nastaju 3' jednolančani krajevi koji se sljubljuju na područjima homologije (slika 8). Nesljubljeni "stršeći" 3' krajevi se uklanjaju nukleazama, a jednolančane praznine popunjavaju se sintezom DNA pomoću reparatorne DNA polimeraze te ligiraju pomoću DNA ligaze (Haber, 2000; Zahradka i sur., 2006).



Slika 8. Model popravka dvolančanih lomova DNA mehanizmom "single-strand annealing" (SSA) (prema: Zahradka i sur., 2006)

Mehanizam SSA u pravilu nije precizan proces kao homologna rekombinacija; u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* ovaj mehanizam rezultira gubitkom regije između mikrohomologija, odnosno dovodi do genomskih rearanžmana (kromosomskih delecija).

Smatra se da bi u RecA-neovisnom popravku DNA kod bakterije *D. radiodurans* mogli sudjelovati proteini DdrA (štiti krajeve DNA od degradacije), DdrB (veže jednolančanu DNA) i RadA, daleki homolog proteina RecA (Slade i Radman, 2011).

1.6. Protein RecG

Protein RecG je DNA helikaza koja sudjeluje u završnoj fazi homologne rekombinacije i rekombinacijskog popravka DNA u bakteriji *E. coli*. Poput proteina RuvAB, i protein RecG djeluje kao DNA-ovisna ATP-aza i helikaza koja se veže na Hollidayevu strukturu i katalizira njeno pomicanje (engl. *branch migration*), čime se produljuje regija hetrodupleksa (Wyatt i West, 2014) (slika 7).

Točna uloga i značaj proteina RecG u bakterijskim stanicama još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, čemu doprinose različiti kontroverzni nalazi (Michel i Leach, 2013; Lloyd i Rudolph, 2016). *In vitro* je pokazano da protein RecG može prepoznati i razmotati trolančane i četverolančane strukture te katalizirati izmjenu lanaca posredovanu proteinom RecA. Zanimljivo je da, ovisno o polarnosti RecA-filamenta, protein RecG može djelovati rekombinogeno, stimulirajući rekombinaciju ili antirekombinogeno, prekidajući genetičku izmjenu. U prvom slučaju, kad invazivna DNA završava s 3' krajem, RecG se veže na D-omče i zatim ih svojom helikaznom aktivnošću pretvara u Hollidayeve strukture. U drugom slučaju, kad u reakciji sudjeluje DNA s 5' krajem, RecG helikaza se veže na Hollidayeve strukture nastale izmjenom lanaca i pomiče ih u smjeru suprotnom od smjera izmjene lanaca, čime sprječava rekombinaciju. Jedna od kontorverzi je i nalaz da protein RecG vrši rezoluciju rekombinacijskih intermedijera, iako nije dokazana njegova sposobnost cijepanja DNA (Michel i Leach, 2013).

Osim uloge u homolognoj rekombinaciji, sugerirana je i uloga proteina RecG u replikaciji DNA. *In vitro* je pokazano da se protein RecG veže na replikacijske viljuške zaustavljene na nekoj zapreci na molekuli DNA te omogućuje njihovu reverziju (McGlynn i Lloyd, 2000). Ovaj nalaz ukazuje na moguću značajnu ulogu proteina RecG u stabiliziranju replikacije DNA. Ista aktivnost proteina RecG nije međutim dokazana *in vivo*.

Nedavna istraživanja su pokazala da protein RecG kontrolira amplifikaciju DNA koja se događa tijekom popravka dvolanačnih lomova DNA i na zaustavljenim replikacijskim viljuškama koje se prevode u dvolanačane lomove (Azeroglu i Leach, 2017). To ukazuje na potencijalno značajnu ulogu proteina RecG u sprječavanju mutacijskih događaja koji su podloga za razvoj različitih bolesti, uključujući karcinom.

Bakterija *D. radiodurans* posjeduje homolog proteina RecG (Makarova i sur, 2001). Vrlo malo se zna o potencijalnoj ulozi proteina RecG u ovoj bakteriji. Jedno istraživanje je pokazalo da su mutanti u genu *recG* bakterije *D. radiodurans* vrlo osjetljivi na gama zračenje

i vodikov peroksid, što sugerira značajnu ulogu proteina RecG u popravku oštećene DNA (Wu i sur., 2009). Druga istraživanja su pak pokazala vrlo blagu osjetljivost mutanata *recG* na gama i UV zračenje (Zahradka i sur., neobjavljeno).

2. Cilj rada

Bakterija *Deinococcus radiodurans* pripada skupini ekstremofila, organizama koji su se prilagodili životu u ekstremnim uvjetima. Ona može preživjeti izuzetno velike doze UV zračenja i ionizacijskog zračenja po čemu predstavlja jedinstveni fenomen u živome svijetu, uz još nekoliko vrsta. Ključnu ulogu u iznimnoj radiorezistenciji ove bakterije ima učinkovita zaštita staničnih proteina od oksidacijskih oštećenja te učinkovit i precizan mehanizam popravka molekule DNA. Najteži tip oštećenja genoma nakon zračenja, dvolanačni lomovi molekule DNA, popravljaju se u bakteriji *D. radiodurans* mehanizmom homologne rekombinacije. Homologna rekombinacija je detaljno reguliran enzimski proces koji osigurava precizan popravak DNA, bez pojave mutacija i genomskih rearanžmana. Ključnu ulogu u tom procesu ima protein RecA; on katalizira središnju fazu rekombinacijskog procesa – homologno sparivanje i izmjenu lanaca DNA. U odsutnosti funkcionalnog proteina RecA (npr. uslijed mutacije u genu *recA)*, bakterija *D. radiodurans* može u određenoj mjeri popravljati dvolančane lomove DNA nastale uslijed gama-zračenja. Taj RecA-neovisni popravak je, međutim, neprecizan i dovodi do velikih genomskih rearanžmana.

Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu proteina RecG u RecA-neovisnom popravku DNA kod bakterije *D. radiodurans*. Protein RecG, produkt istoimenog gena, je DNA helikaza koja sudjeluje u obradi i razrješenju rekombinacijskih intermedijera tijekom homologne rekombinacije kod bakterija. Nadalje, protein RecG sudjeluje u regresiji replikacijskih vilica zaustavljenih na nekoj zapreci na molekuli DNA te time ima važnu ulogu u stabiliziranju replikacije DNA. No uloga ovog proteina u rekombinacijskom popravku DNA kod bakterije *D. radiodurans* je slabo istražena. U ovom radu istražili smo učinak mutacije *recG* na popravak DNA i genomsku nestabilnost *recA* mutanata bakterije *D. radiodurans*. U tu svrhu ispitali smo preživljenje i učestalost genomskih rearanžmana nakon gama-zračenja u dvostrukom mutantu *recA recG* te dobivene rezultate usporedili sa onima dobivenim u roditeljskom soju *recA*.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Tijekom izrade ovog rada koristili smo slijedeće sojeve bakterije *Deinococcus radiodurans* : divlji tip R1 (ATCC 13939), *recG*::kan, *recA*::tet i *recA*::tet *recG*::kan. Navedeni sojevi su dio zbirke sojeva Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju Instituta „Ruđer Bošković“.

3.1.1. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija koristili smo tekuću i krutu hranidbenu podlogu TGY (Tryptone-Glucose-Yeast). Točan sastav navedenih podloga prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranidbenih podloga za uzgoj bakterija

SASTAV	Tekuća TGY podloga
Bacto tryptone	5 g
glukoza (40%)	2,5 ml
kvaščev ekstrakt	3 g
Destilirana H_2O	do 1000 ml
SASTAV	Kruta TGY podloga
Bacto tryptone	5 g
glukoza (40%)	2,5 ml
kvaščev ekstrakt	3 g
Agar	16 g
Destilirana H_2O	do 1000 ml

3.1.2. Puferi

Kod pripremanja serije razrjeđenja za nacjepljivanje bakterija na krutu podlogu korišten je M/15 pufer. Prilikom ispiranja blokića agaroze s uklopljenom DNA koristili smo TE pufer, dok je za potrebe analize molekule DNA metodom PFGE korišten pufer 0,5xTBE. U tablici 2. predstavljen je sastav spomenutih pufera.

Tablica 2. Sastav pufera

M/15 pufer	Na_2HPO_4	5,94 g
	KH_2PO_4	4,54 g
	Destilirana H_2O	Do 1000 ml
TE pufer	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH	8,0
0,5xTBE pufer	Tris-borat	45 mM
	EDTA	1 mM
	pH	8,0

3.1.3. Otopine

Prilikom pripremanja bakterijskih stanica za analizu DNA, koristili smo otopinu lizozima čija je uloga liziranje stanica u dijelovima agaroze i oslobađanje DNA molekula te otopinu proteinaze K (serin proteinaza širokog spektra) za digestiju prisutnih proteina. Sastav navedenih otopina je prikazan u tablici 3.

Tablica 3. Sastav otopina

Otopina lizozima	Lizozim	1 mg/ml
	EDTA	0,05 M (pH 8,0)
Otopina proteinaze K	Proteinaza K	1 mg/ml
	Lauroil-sarkozin	1 %
	EDTA	0,5 M (pH 8,0)

3.1.4. Kemikalije

Ostale kemikalije korištene tijekom izrade ovog rada su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Popis kemikalija

Kemikalija	Koncentracija	Proizvođač
EDTA	0,5 M	Invitrogen
Pulsed Field Certified agaroza	1 %	Bio-Rad
Low-Melting Point agaroza	1,6 %	Gibco-BRL
Etidij-bromid	0,5 μg/ml	Bio-Rad

3.2. Metode

3.2.1. Praćenje rasta bakterijskih kultura

Bakterije *D. radiodurans* uzgajali smo u tekućoj hranidbenoj podlozi TGY u vodenoj kupelji-tresilici pri 120 okretaja/min što omogućava dobru aeraciju bakterijskih kultura. Bakterije su uzgojene do stacionarne faze rasta (preko noći) te razrijeđene do optičke gustoće OD_{650} 0.02 kako bi bili sigurni da su sve kulture počele rasti od iste vrijednosti. Tako pripremljene kulture su zatim uzgajane uz aeraciju tijekom sedam sati u tekućoj hranidbenoj podlozi TGY pri temperaturi od 30ºC. Rast bakterijskih kultura je vidljiv po zamućenju hranidbene podloge, a pratili smo ga mjerenjem optičke gustoće (tj. apsorbancije) na 650 nm (OD_{650}) u određenim vremenskim intervalima, odnosno svakih sat vremena, u plastičnoj kiveti (u volumenu od 1 mL) na spektrofotometru (Novaspec II, Pharmacia).

3.2.2. Test osjetljivosti na gama zračenje

Za određivanje osjetljivost na gama zračenje, bakterijske stanice smo uzgojili u tekućoj hranidbenoj podlozi do eksponencijalne faze rasta (OD_{650} oko 0.2). Bakterije smo zatim centrifugirali približno 10 min. pri 8000 okretaja/min (centrifuga Beckman, model J2-21) te resuspendirali u 10x manjem volumenu pufera M/15. Za potrebe zračenja, po 1 mL bakterijskih suspenzija smo rasporedili u Eppendorf epruvetice kapaciteta 1.5 mL, koje smo

zatim uronili u led. Tako pripremljeni uzorci bakterija su podvrgnuti gama zračenju i to dozama od 300, 600 i 900 Gy. Kao izvor gama zračenja služio je radioaktivni kobalt (^{60}Co) uskladišten na Institutu „Ruđer Bošković“. Brzina doze u trenutku zračenja iznosila je 8.4 Gy/s. Ozračene stanice se u obliku kapljica od 10 μL nasađuju na krutu hranidbenu podlogu u odgovarajućim decimalnim razrjeđenjima te se ostave nekoliko minuta da se upiju u podlogu. Radi usporedbe, na isti način smo zasadili i neozračene stanice. Brojanje kolonija ozračenih i neozračenih stanica smo proveli nakon 3-4 dana inkubacije u termostatu na 30°C. Na temelju izraslih kolonija se izračuna broj preživjelih bakterija tako da se izračuna prosječan broj kolonija po kapljici i pomnoži sa faktorom razrjeđenja kako bismo dobili broj koloniformnih jedinica (engl. colony-formng units, CFU) po mililitru kulture. Tako izračunatu vrijednost za ozračene bakterije svakog soja izrazili smo u postotku u odnosu na neozračene bakterije istog soja te prikazali grafički u odnosu na dozu zračenja.

3.2.3. Test osjetljivosti na UV zračenje

Za testiranje osjetljivosti na UV zračenje, bakterije smo uzgojili u tekućoj hranidbenoj podlozi do OD_{650} 0.2 te smo ih proveli kroz niz decimalnih razrjeđenja u puferu M/15. Određena razrjeđenja smo nakapavali u obliku 10 μL-kapljica na krutu hranidbenu podlogu te ih ostavili neko vrijeme kako bi se kapljice upile. Uz to, paralelno smo nakapali i bakterije koje nisu bile predviđene za ozračivanje, a služile su nam kao neozračena kontrola. Nakon što su se kapljice upile, izložili smo ih UV zračenju i to dozama od 100, 200 i 300 J/m^2. Kao izvor UV zračenja (valne duljine 254 nm) poslužila je niskotlačna lampa „Phillips“, tipa TUV15. Brzina doze zračenja određena je pomoću radiometra i iznosila je 1.6 J/m^2/s. Vrijeme, izraženo u sekundama, potrebno za postizanje određenje doze zračenja, izračunali smo dijeljenjem željene doze zračenja s izmjerenom brzinom doze. Ploče s bakterijama smo uzgajali 3-4 dana na 30°C u inkubatoru. Na temelju dobivenih kolonija se izračuna broj preživjelih bakterija, kao što je već opisano za eksperiment gama zračenja (odjeljak 3.2.2.).

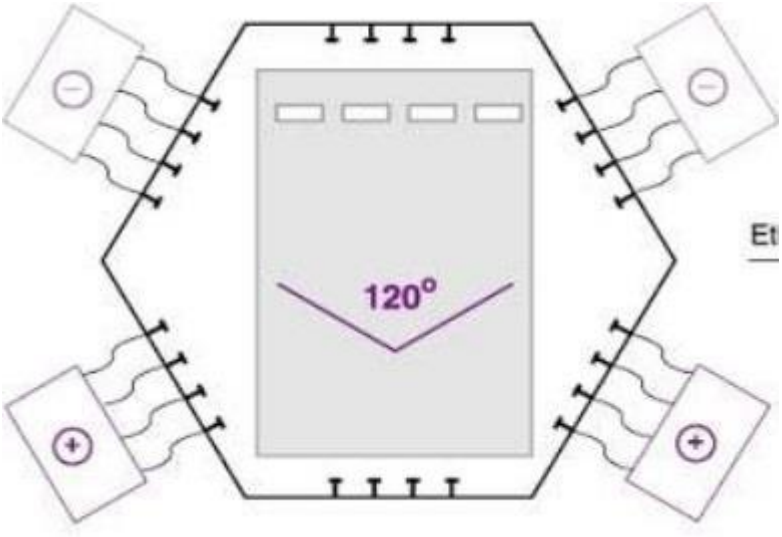
3.2.4. Analiza DNA bakterije *D. radiodurans* metodom elektroforeze u promjenjivom električnom polju (engl. „Pulsed-Field Gel Electrophoresis“, PFGE)

Elektroforezom nazivamo migraciju električki nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja, što omogućuje razdvajanje proteina i drugih makromolekula poput DNA i

RNA. Sama brzina gibanja makromolekula u električnom polju ovisi o masi i obliku migracijske molekule, viskoznosti medija, jakosti i naboju električnog polja te puferu (koncentracija, sastav, pH). Razdvajanja metodom elektroforeze se gotovo uvijek odvijaju u gelu, zbog toga što gel služi kao molekularno sito koje poboljšava razdvajanje. Molekule čije su dimenzije malene u usporedbi s porama gela olakšano se kreću kroz gel, dok su molekule većih dimenzija od dimenzija pora gotovo inertne. Molekule srednje veličine se kreću kroz gel različitom brzinom.

Elektroforeza u promijenjivom električnom polju (engl. „Pulsed-Field Gel Electrophoresis“ ili PFGE) je metoda koja omogućuje razdvajanje velikih fragmenata DNA molekule (veličine i od 10 Mb) na agaroznom gelu. Metoda se zasniva na varijabilnoj migraciji velikih fragmenata DNA restrikcije u električnom polju izmjenične polarnosti. Drugim riječima, u ovom tipu elektroforeze, električno polje se izmjenjuje između nasuprotnih elektroda tako da se napon u intervalima (npr. svakih 10-60 sekundi) mijenja pod kutem od 120º sa svake strane i u smjeru centralne osi agaroznog gela. Tijekom svake te periodične promjene smjera i molekula DNA mijenja svoj smjer, odnosno orijentaciju u gelu. Običnom vodoravnom gel-elektroforezom se odvajaju molekule veličine do 30 kb, dok kod PFGE metode ta stalna izmjena električnog polja među nasuprotnim elektrodama dovodi do promijene orijentacije velikih molekula i njihove različite brzine putovanja kroz agarozni gel, ovisno o njihovim dimenzijama - male molekule brže mijenjaju smjer i putuju kroz gel za razliku od većih molekula.

Za potrebe izrade ovog diplomskog rada korišten je PFGE uređaj CHEF-DR III („Bio-Rad“) koji sadrži 24 elektrode raspoređene u obliku šesterokuta čime osigurava homogenost električnog polja (Slika 9.). Za analizu metodom PFGE, bakterijska DNA pripremljena je tako da se bakterijske stanice uklapaju u agarozne blokiće i liziraju *in situ* čime se spriječava mehaničko cijepanje DNA. Tijekom cijelog postupka, koriste se visoke koncentracije EDTA i deterdženata za inhibiciju staničnih nukelaza. DNA pripremljena na taj način ostaje maksimalno očuvana (visokomolekularna) i pogodna za restrikcijske analize.



Slika 9. Shema PFGE uređaja sa 24 elektrode (izvor : https://www.google.hr/search?biw=1366&bih=662&tbm=isch&sa=1&ei=4rt2W4eCA4yorgT6tqqoDg&q=pfge+electrophoresis&oq=pfge&gs_l=img.3.1.35i39k1j0i19k1l5j0i30i19k1l4.1752.3599.0.11914.11.11.0.0.0.0.303.1884.0j2j5j1.8.0....0...1c.1.64.img..9.2.568....0.5N2NN75qIqo#imgdii=WhGlScjBin685M:&imgrc=wZzRov-LJd_LaM:)

3.2.4.1. Uklapanje stanica u agarozu

Bakterijske kulture (*recA* i *recA recG*) uzgojili smo u tekućoj hranidbenoj podlozi TGY do eksponencijalne faze rasta (OD_{650}=0.2) te centrifugirali 10 min pri 8000 okretaja/min (centrifuga Beckman, model J2-21). Supernatant smo uklonili, talog resuspendirali u 200 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) i inkubirali u termobloku pri temperaturi od 65ºC tijekom 30 minuta (ovaj postupak omogućuje inaktivaciju staničnih nukleaza). Bakterijske suspenzije se nakon toga ponovno centrifugiraju (stolna centrifuga „Beckman, 5 min, 13000 okr/min), a nastali talog se resuspendira u 150 µl 0.05 M EDTA. U svaku tubicu se zatim dodaje isti volumen (150 µl) 1.6%-tne agaroze s niskim talištem (engl. Low-Melting Point, LMP) pripremljene u 0.05 M EDTA (npr. 60 mg agaroze u 3.75 ml 0.05 M EDTA). Tako priređene smjese bakterijskih stanica se drže u termobloku na temperaturi od 45ºC radi sprječavanja prijevremenog skrućivanja agaroze. Po 85 µl suspenzije stanica smo nanijeli u kalup i ostavili sat vremena na 4ºC kako bi se agarozni blokovi polimerizirali.

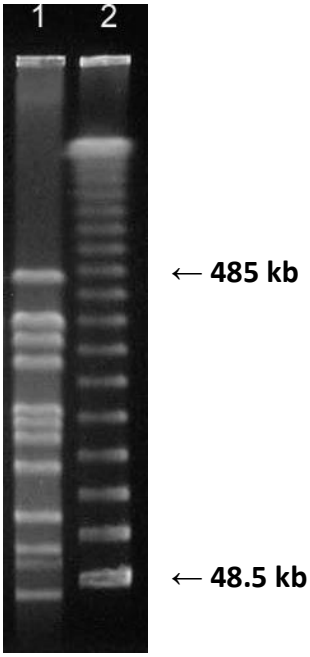
3.2.4.2. Liziranje stanica

Pripremljene agarozne blokove s uklopljenim stanicama stavljamo u zasebnu Eppendorf tubicu od 2 ml, dodamo im 1.5 ml otopine lizozima (1 mg/ml lizozima u 0.05 M EDTA, pH 8,0) te inkubiramo preko noći (najmanje 16 h) pri temperaturi od 45ºC. Tretman lizozimom dovodi do lize bakterijskih stanica i oslobađanja molekule DNA. Nakon inkubacije, otopina lizozima se uklanja iz kiveta i zamijeni sa 1.5 ml otopine proteinaze K (1 mg/ml proteinaze K u 0.5 M EDTA + 1 % lauroil-sakozin) te se takve tubice ponovno inkubiraju preko noći na 45ºC. Uloga proteinaze K je razgradnja postojećih proteina u agaroznim blokovima. Slijedeći korak je uklanjanje otopine proteinaze te dvostruko ispiranje agaroznih blokova u 1.5 ml 0.5 M EDTA, te ispiranje tri puta u 1.5 ml TE pufera (pH 7,6). Na ovaj način priređeni agarozni blokovi se mogu odmah upotrijebiti za elektroforezu ili se mogu pohraniti na dulje vrijeme u 0.5 M EDTA u hladnjaku na 4°C.

3.2.4.3. Obrada uzoraka za PFGE restrikcijskim enzimom NotI

Restrikcijski enzimi ili endonukleaze su enzimi koji imaju sposobnost cijepanja sekvenci baznih parova na specifičnim mjestima u molekuli DNA. Ovi enzimi su među najdjelotvornijim i najšire primjenjivanim sredstvima u biotehnologiji upravo zbog njihove mogućnosti prepoznavanja određenog slijeda nukleotida (4-8 baza) i razdvajanja dugih molekula DNA u kraće fragmente pogodnije za daljnje manipuliranje. NotI je restrikcijski enzim koji razgrađuje DNA bakterije *D. radiodurans* na 11 fragmenata točno određene veličine (slika 10). S obzirom na svoju veličinu, svaki fragment DNA putuje određenom brzinom kroz gel i stvara jedinstven obrazac na gelu.

Agarozne blokove s uklopljenim stanicama inkubiramo u 1.5 ml TE pufera (pH 7,6) 30 min. na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije prebacujemo ih u svježi TE pufer i ponovno inkubiramo 30 min. na sobnoj tempertauri. Za restrikciju, svaki blokić stavimo u zasebnu Eppendorf tubicu i dodamo mu 0.5 ml odgovarajućeg pufera za restrikciju (1 x RE pufer) te ih inkubiramo 30 min. na 4ºC. Zatim uklanjamo pufer i pripremamo svježu otopinu 1 x RE pufera koja sadrži 30 jedinica enzima NotI u ukupnom volumenu od 100 µl za svaki blokić. Tako pripremljena smjesa se pažljivo promiješa mikropipetom te inkubira 12-16 sati na temperaturi od 37ºC. Nakon provedene digestije blokovi se inkubiraju u TE puferu sat vremena na 4°C nakon čega su spremni za PFGE.



Slika 10. DNA bakterije *D. radiodurans* (veličine 3,3 Mbp) razgrađena enzimom NotI (linija 1) i ljestvica DNA faga λ kao standard molekulske mase (linija 2) razdvojeni opisanom metodom PFGE.

Tablica 5. Smjesa za digestiju

H2O	86 µl
10x NE Buffer 3 („New England Bio-Labs“)	10 µl
BSA	1 µl
NotI (10 U/ml, „New England Bio-Labs“)	3 µl

3.2.4.4. Priprema agaroznog gela

Gel smo pripremili tako da smo 1,2 g agaroze (Pulsed Field Certified Agarose, „Bio-Rad“) otopili u 120 ml 0,5xTBE pufera zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja, dok agaroza ne postane u potpunosti prozirna. Nakon toga 110 ml tako pripremljene agaroze ohlađene na 60°C se izlije u kalup za gel u kojem se prethodno postavi češalj, te se ostavi 30 min. na ravnoj površini kako bi se agaroza u potpunosti ohladila i polimerizirala. Nakon što se gel polimerizira, izvadi se češalj koji ostavlja jažice u gelu, u koje se zatim stavljaju agarozni blokići s uklopljenom bakterijskom DNA. Završni korak ovog procesa je „zatvaranje“ jažica nakapavanjem ostatka rastaljene agaroze.

3.2.4.5. Radni uvjeti metode PFGE

Gel koji sadrži blokiće sa bakterijskom DNA stvaljamo u kadu za elektroforezu u koju se ulije 0,5xTBE pufera koliko je potrebno da se prekrije cijeli gel (približno dvije litre). Na uređaju za elektroforezu postavimo radne uvjete i uključimo pumpu koja omogućuje stalni protok pufera kroz sustav i hlađenje, kako bi sustav bio na određenoj, konstantnoj temperaturi. Radni uvjeti koje smo koristili su bili sljedeći:

- Temperatura : 12ºC
- Vrijeme : 22 h
- „Switch time“ : 10-60 sekundi
- Kut : 120º
- Napon : 6 V/cm^2

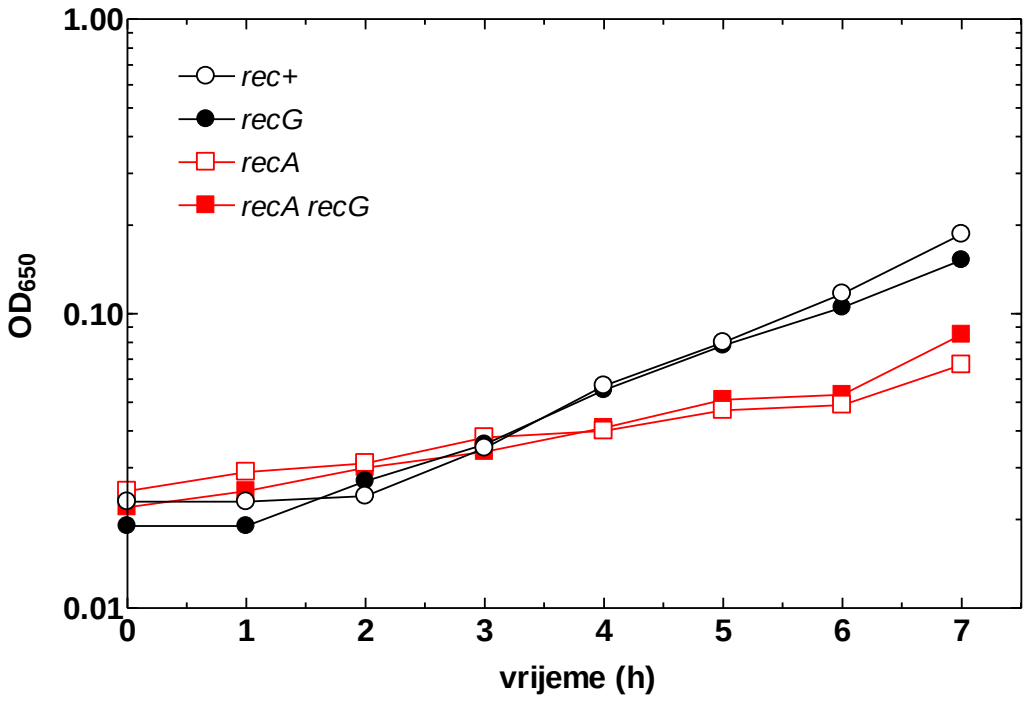
3.2.4.6. Vizualizacija molekule DNA

Nakon završetka PFGE, agarozni gel sa uzorcima DNA se vadi iz kade za elektroforezu i stavlja se u kadu za bojanje te se boji otopinom etidij-bromida, završne koncetracije 0,5 μg/ml, tijekom 30 min. Etidij-bromid je interkalirajući agens koji se ugrađuje između parova baza dvolančane DNA molekule, a kada se izloži UV-svjetlu fluorescira i čini DNA vidljivom na gelu. Nakon bojanja otopina etidij-bromida se odlije, a gel se uroni u destiliranu vodu 15 min. kako bi se uklonio višak etidij-bromida. Vizualizaciju gela smo proveli na uređaju Image Master VDS („Pharmacia“), a gel fotografirali pomoću programa GeneSnap.

4. Rezultati

4.1. Rast mutanata *recA* i *recA recG* bakterije *D. radiodurans*

Rezultate praćenja rasta mutanata *recA* i *recA recG*, kao i rast parentalnog soja divljeg tipa te mutanta *recG* bakterije *Deinococcus radiodurans*, smo prikazali krivuljama rasta na kojima se može uočiti porast optičke gustoće bakterijskih kultura pri 650 nm (OD_{650}) kroz vrijeme na logaritamskoj skali (Slika 11).



Slika 11. Rast mutanata *recA*, *recG* i *recA recG* u usporedbi s parentalnim sojem divljeg tipa (rec^+) bakterije *D. radiodurans*

Krivulje prikazuju rast bakterijskih stanica tijekom sedam sati uzgoja pri 30°C u tekućoj hranidbenoj podlozi TGY, uz aeraciju. Tijekom prva dva sata odvija se faza suzdržanog rasta, zbog prilagodbe na nove uvjete okoline, nakon čega slijedi faza eksponencijalnog rasta. Eksponencijalni rast je puno brži kod stanica divljeg tipa i mutanta *recG*, koji rastu podjednakom brzinom. Stanice dvostrukog mutanata *recA recG* i parentalnog mutanta *recA* se umnažaju znatno sporije od stanica divljeg tipa i mutanta *recG*.

Na temelju eksponencijalnog dijela krivulja rasta bakerijskih kultura izračunali smo vrijeme udvostručenja stanične mase, odnosno generacijsko vrijeme (G) za svaki soj, i to prema formuli:

G = t/3.3 log b/B

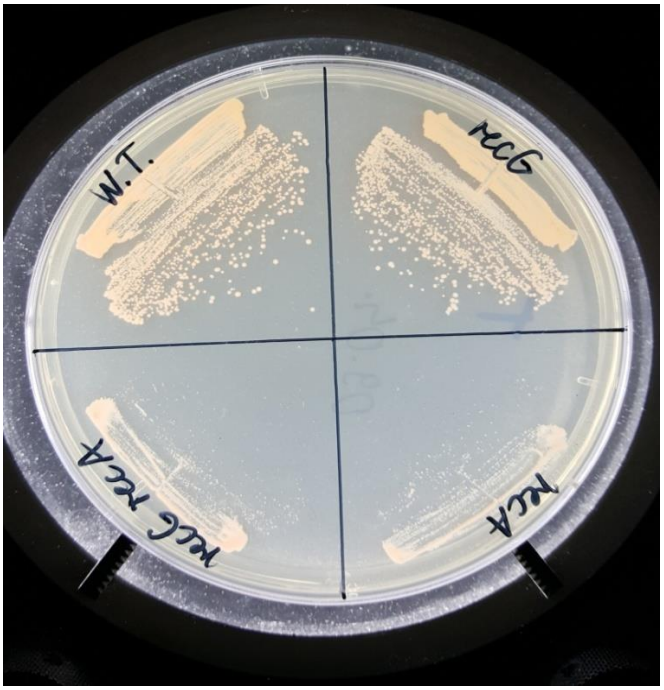
gdje je t=vremenski interval (u minutama), B=broj bakterija (odnosno izmjerena optička gustoća) na početku vremenskog intervala i b=broj bakterija (odnosno izmjerena optička gustoća) na kraju vremenskog intervala. Generacijska vremena za svaki od pojedinih sojeva prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Generacijsko vrijeme (u minutama) za različite sojeve bakterije *D. radiodurans*

Soj	Generacijsko vrijeme
divlji tip	105 min
recG	116 min
recA	250 min
recA recG	242 min

Prema ovim podacima možemo zaključiti da dvostruki mutant *recA recG* raste podjednakom brzinom kao mutant *recA*, s generacijskim vremenom od oko 4 sata, za razliku od divljeg tipa i mutanta *recG* kojima generacijsko vrijeme iznosi nešto manje od 2 sata.

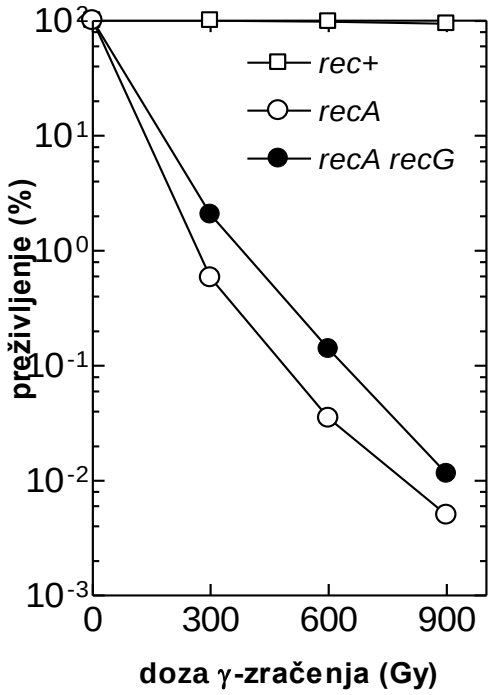
Na slici 12 je prikazan rast sojeva bakterije *D. radiodurans* na krutoj hranidbenoj podlozi. Bakterijske kulture su uzgojene u tekućoj podlozi i pomoću sterilizirane eze nanesene na krutu podlogu. Nakon tri dana rasta u termostatu na 30°C, vidljivo je da mutanti *recA* i *recA recG* rastu znatno sporije od divljeg tipa i mutanta *recG*.



Slika 12. Kolonije bakterija *D. radiodurans* divljeg tipa (wt) te mutanata *recG, recA* i *recA recG* nakon tri dana rasta na krutoj hranidbenoj podlozi na 30°C

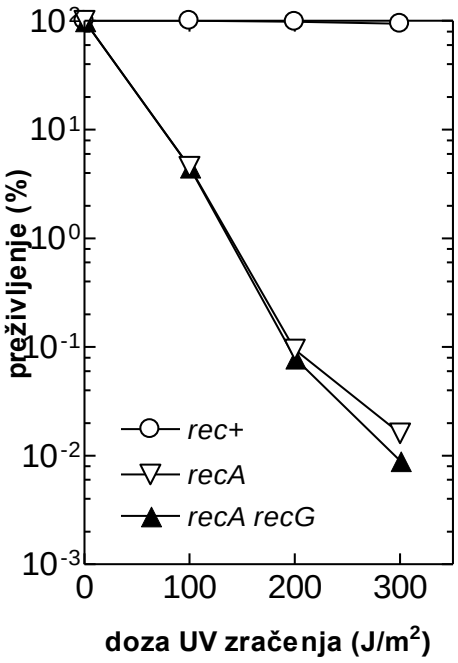
4.2. Osjetljivost mutanata *recA* i *recA recG* bakterije *D. radiodurans* na gama i UV zračenje

Na slici 13 prikazani su rezultati preživljenja bakterijskih sojeva, odnosno mutanata *recA* i *recA recG* nakon gama zračenja u odnosu na preživljenje soja divljeg tipa (rec^+) bakterije *D. radiodurans*. Nakon ozračivanja dozama od 300, 600 i 900 Gy bakterijske stanice divljeg tipa nisu izgubile na vijabilnosti, odnosno preživljenje im je ostalo gotovo 100 %-tno, dok se mutant *recA* pokazao puno osjetljivijim. Kod doze od 300 Gy preživljenje mutanta *recA* smanjilo se za otprilike 2 reda veličine, odnosno vijabilnost mu je iznosila oko 0,8 %, a pri dozi zračenja od 900 Gy je iznosila 0,007 %. Dvostruki mutant *recA recG* se kod istih doza zračenja pokazao tek malo otpornijim od mutanta *recA;* nakon ozračivanja s 900 Gy, njegovo preživljenje je iznosilo 0,01 %.



Slika 13. Preživljenje nakon gama zračenja mutanata *recA* i *recA recG* u usporedbi s preživljenjem soja divljeg tipa (*rec*$^{+}$) bakterije *D. radiodurans*

Preživljenje mutanata *recA* i *recA recG* u usporedbi s preživljenjem divljeg tipa bakterije *D. radiodurans* nakon UV zračenja prikazano je na slici 14. Ono što možemo zaključiti na temelju dobivenih rezultata je da je preživljenje divljeg tipa ostalo isto, odnosno stanice nisu izgubile na vijabilnosti, dok su, kao i kod gama zračenja, mutanti *recA* i *recA recG* bili znatno osjetljiviji. Kod doze od 300 J/m^2 preživljenje mutanta *recA* je smanjeno otprilike 4 reda veličine, što iznosi oko 0,01 %. Dvostruki mutant *recA recG* pokazao se jednako osjetljivim na UV zračenje kao i mutant *recA* .



Slika 14. Preživljenje nakon UV zračenja mutanata *recA* i *recA recG* u usporedbi s preživljenjem soja divljeg tipa (*rec*$^{+}$) bakterije *D. radiodurans*

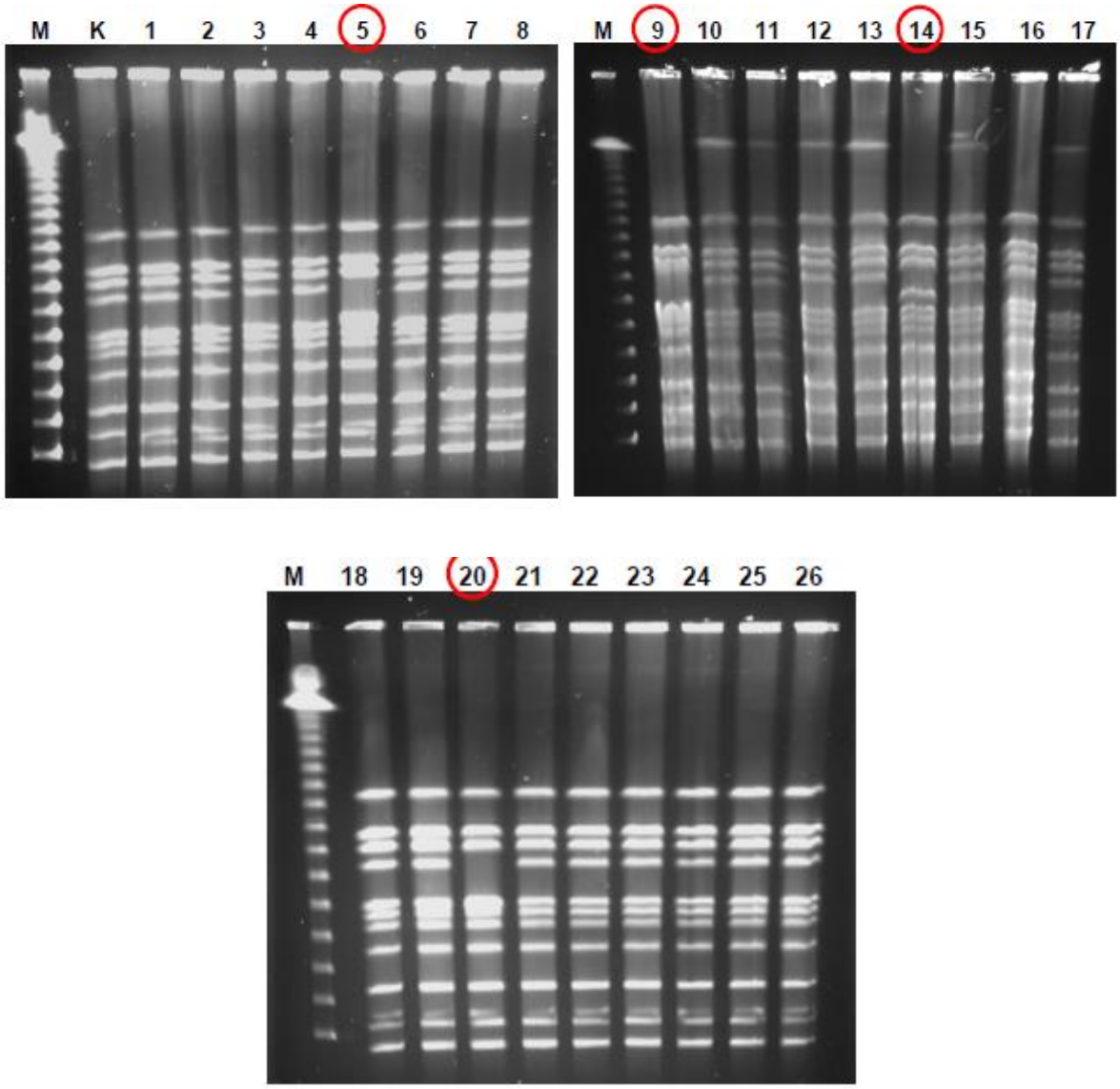
4.3. Detekcija genomskih rearanžmana kod mutanata *recA* i *recA recG* bakterije *D. radiodurans*

Rezultati analize DNA mutanata *recA* i *recA recG* bakterije *D. radiodurans* dobiveni metodom elektroforeze u promjenjivom električnom polju (PFGE) su prikazani na slikama 15 i 16.

Na slici 15 su rezultati analize DNA iz 26 pojedinačnih kolonija stanica *recA* koje su preživjele 2 kGy gama zračenja. Uzorci DNA su tretirani restrikcijskim enzimom NotI i analizirani metodom PFGE, kao što je opisano u poglavlju 3.2.4..

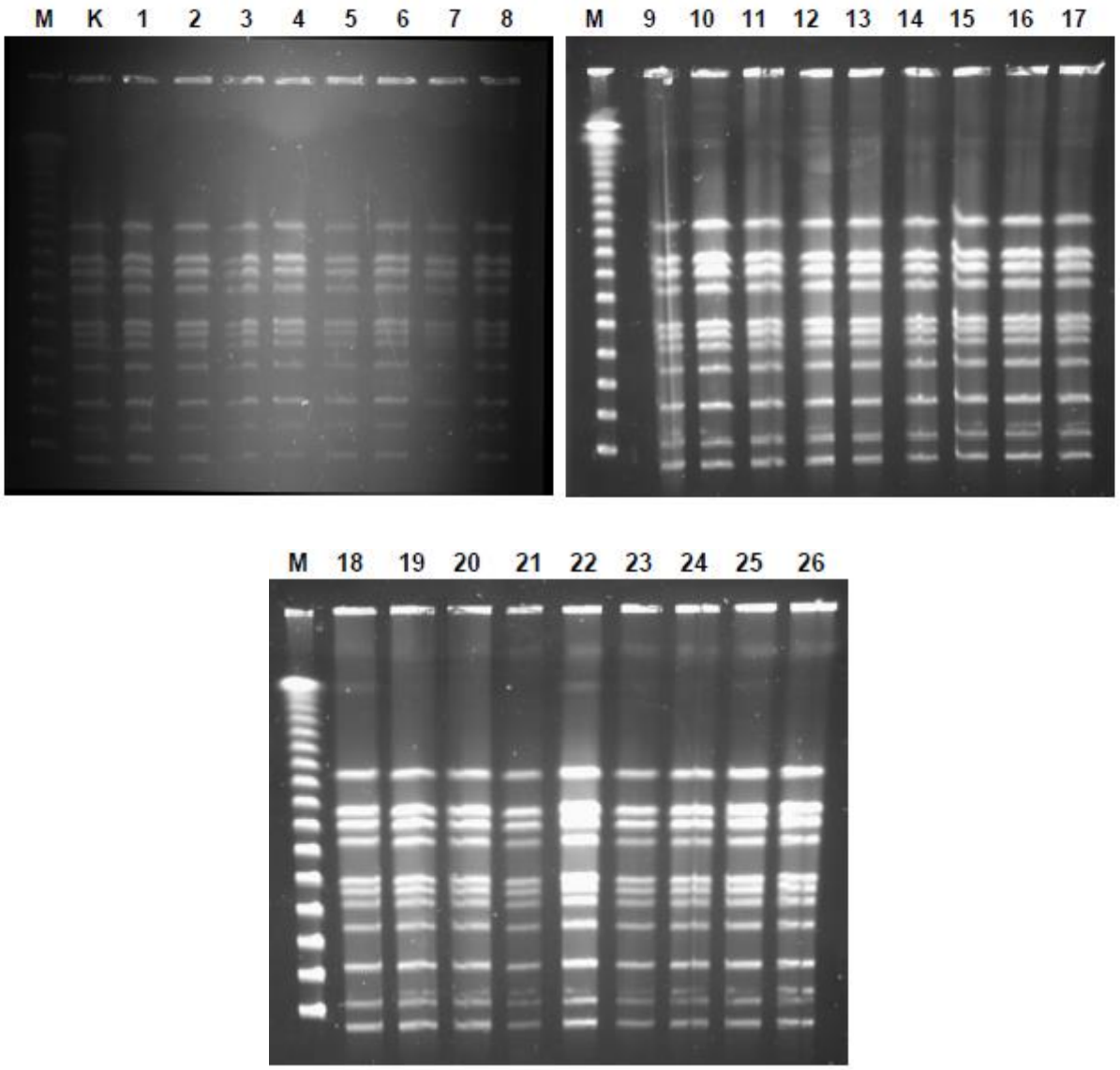
Temeljem analize gela sa DNA uzorcima možemo vidjeti da četiri od 26 uzoraka (15%) pokazuju promijenjeni NotI obrazac u odnosu na neozračenu kontrolu, čime je potvrđen raniji nalaz da mutant *recA* stvara genomske rearanžmane nakon gama zračenja. U sva četiri promijenjena obrasca, radi se o gubitku (deleciji) četvrtog NotI fragmenta. Gubitak fragmenta je najčešće praćen pojavom novog fragmenta manje molekulske mase, kao što se vidi iz uzoraka br. 5, 9 i 14. No u jednom slučaju (uzorak br. 20), gubitak četvrtog fragmenta nije praćen pojavom novog fragmenta. Osim toga, možemo uočiti da se novi fragment razlikuje po veličini; u uzorku br. 14 novi fragment je veće molekulske mase nego onaj u uzorcima br. 5 i

9. Možemo, dakle, zaključiti da su se u ozračenim stanicama *recA* mutanta pojavile (najmanje) tri vrste rearanžmana DNA.



Slika 15. Analiza DNA stanica mutanta *recA* bakterije *D. radiodurans* iz kolonija izraslih nakon 2 kGy gama zračenja. Uzorci DNA su tretirani restrikcijskim enzimom NotI i podvrgnuti metodi PFGE. M označava λ DNA kao standard molekularne mase, K označava neozračeni kontrolni uzorak, a brojevi 1 do 26 su oznake različitih kolonija iz kojih su dobivene stanice za analizu DNA. Zaokruženi su uzorci koji pokazuju promjene u NotI obrascu u odnosu na neozračenu kontrolu.

Slika 16 prikazuje rezultate analize DNA dvostrukog mutanta *recA recG*, također iz kolonija izraslih nakon 2 kGy gama zračenja. U ovom slučaju, niti jedan od 26 ispitanih uzoraka ne pokazuje promjenu u NotI obrascu, što znači da u ovom mutantu nije došlo do pojave genomskih rearanžmana.



Slika 16. Analiza DNA stanica mutanta *recA recG* bakterije *D. radiodurans* iz kolonija izraslih nakon 2 kGy gama zračenja. Uzorci DNA su tretirani restrikcijskim enzimom NotI i podvrgnuti metodi PFGE. M označava λ DNA kao standard molekularne mase, K označava neozračeni kontrolni uzorak, a brojevi 1 do 26 su oznake različitih kolonija iz kojih su dobivene stanice za analizu DNA.

5. Rasprava

Nedostatak proteina RecA u ozračenim stanicama bakterije *D. radiodurans* drastično smanjuje preživljenje stanica, usporava popravak dvolančanih lomova DNA te je vezan uz pojavu genomskih rearanžmana (Zahradka i sur., 2006; Repar i sur., 2010). Glavna uloga proteina RecA u bakterijama, kao i njegovih analoga kod eukariota, je homologno sparivanje i izmjena lanaca DNA tijekom homologne rekombinacije i rekombinacijskog popravka dvolančanih lomova DNA. Protein RecA omogućava korištenje informacije sadržane u homolognim sekvencama u različitim kopijama genoma za pravilno spajanje dvolančanih krajeva DNA, što omogućava veliku preciznost popravka. Točnost ovakvog rekombinacijskog popravka DNA može biti ugrožena prisutnošću ponavljajućih (repetitivnih) sekvenci u genomu. Usprkos tome što u genomu bakterije *D. radiodurans* postoji znatan broj repetitivnih sekvenci (Makarova i sur., 2001), rekombinacijski popravak dvolančanih lomova DNA u ovoj bakteriji je vrlo točan; nakon 5 kGy gama zračenja, doze koja uzrokuje više stotina dvolančanih lomova, u preživjelim stanicama nisu detektirani genomski rearanžmani (Repar i sur., 2010). Pokazano je, međutim, da je točnost popravka DNA u ovoj bakteriji narušena u odsutnosti funkcionalnog proteina RecA (tj. unošenjem mutacije *recA*). U tom slučaju, u stanicama se odvija RecA-neovisni popravak DNA koji je slabo učinkovit i neprecizan, što se očituje u pojavi velikih genomskih rearanžmana (Repar i sur., 2010).

U ovom radu potvrđen je karakterističan fenotip *recA* mutantata bakterije *D. radiodurans* – *recA* mutanti rastu znatno sporije od stanica divljeg tipa (slika 11) i izuzetno su osjetljivi na gama zračenje (slika 13) i UV zračenje (slika 14). Nadalje, u populaciji r*ecA* stanica koje su preživjele 2 kGy gama zračenja detektirali smo genomske rearanžmane (slika 15), čime je potvrđeno postojanje nepreciznog RecA-neovisnog popravka DNA u bakteriji *D. radiodurans*.

Analiza DNA iz 26 pojedinačnih kolonija stanica *recA* koje su preživjele 2 kGy gama zračenja pokazala je četiri promijenjena DNA obrasca, odnosno četiri genomska rearanžmana (slika 15). U sva četiri slučaja radi se o gubitku (deleciji) četvrtog NotI fragmenta; u tri od četiri slučaja ta je delecija praćena pojavom novog fragmenta manje molekulske mase. Radi se o istim tipovima rearanžmana kakvi su već ranije detektirani kod bakterije *D. radiodurans* (Repar i sur., 2010). Ovaj nalaz potvrđuje da genomski rearanžmani u *recA* mutantima nisu posljedica nasumičnih rekombinacijskih događaja, već se radi o nekoliko definiranih genomskih promjena koje se ponavljaju. Može se stoga pretpostaviti da u genomu bakterije *D. radiodurans* postoje određena rekombinacijska "žarišta" (engl. *hot spots*). Tipična "žarišta" za

nastanak rearanžmana u genomima bakterija, kvasca, kao i viših eukariota, su repetitivne sekvence DNA (Aguilera i Gomez-Gonzales, 2008). Jedan od rearanžmana pronađenih u mutantu *recA* bakterije *D. radiodurans* povezan je s insercijskom sekvencom (IS*Dra5*) koja je prisutna u dvije identične kopije na dva kromosomska elementa (Repar i sur., 2010). Iz toga se može zaključiti da je RecA-neovisan popravak u bakteriji *D. radiodurans* podložan određenom tipu grešaka, odnosno krivom spajanju dvolančanih krajeva DNA u području repetitivnih sekvenci.

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati moguću ulogu proteina RecG, produkta istoimenog gena, u RecA-neovisnom popravku dvolančanih lomova DNA u bakteriji *D. radiodurans*. Protein RecG je otkriven i relativno dobro istražen kod bakterije *E. col*i; to je DNA helikaza koja sudjeluje u obradi rekombinacijskih intermedijera tijekom homologne rekombinacije i rekombinacijskog popravka DNA, a smatra se da ima ulogu i u stabilizaciji replikacije DNA (Michel i Leach, 2013; Lloyd i Rudolph, 2016). No uloga ovog proteina u bakteriji *D. radiodurans* je nepoznata. Također nije nikada istraženo je li i kako mutacija u genu *recG* utječe na preživljenje i genomsku nestabilnost mutanata *recA* nakon gama zračenja. U ovom radu po prvi je puta provedena genetička karakterizacija dvostrukog mutanta *recA recG* - ispitan je njegov rast, preživljenje nakon UV i gama zračenja te učestalost pojave genomskih rearanžmana.

Rezultati dobiveni u ovom radu pokazali su da dvostruki mutant *recA recG* raste podjednakom brzinom kao i jednostruki mutant *recA,* a to je znatno sporije od stanica divljeg tipa (slika 11). Na temelju dobivenih krivulja rasta, izračunali smo generacijsko vrijeme tj. vrijeme udvostručenja stanične mase za svaki od sojeva. Generacijsko vrijeme dvostrukog mutanta *recA recG* iznosi oko četiri sata, slično kao i za mutant *recA,* dok generacijsko vrijeme divljeg tipa iznosi nešto manje od dva sata (tablica 6).

Ispitivanje preživljenja nakon izlaganja različitim dozama UV i gama zračenja pokazalo je da je dvostruki mutant *recA recG* podjednako osjetljiv na UV zračenje kao i mutant *recA* (slika 14) te da je tek nešto malo otporniji na gama zračenje od mutanta *recA* (slika 13). U usporedbi s preživljenjem divljeg tipa, koji pri istim dozama zračenja preživljava gotovo 100%, možemo zaključiti da je mutant *recA recG* izuzetno osjetljiv na zračenje, kao što je to i mutant *recA*.

Intrigantan je, međutim, nalaz da u populaciji stanica *recA recG* koje su preživjele 2 kGy gama zračenja nismo detektirali genomske rearanžmane; od 26 ispitanih uzoraka DNA, niti jedan nije pokazao promjenu u NotI obrascu nakon razdvajanja DNA metodom PFGE (slika

16). Ovaj rezultat sugerira da je uvođenje mutacije *recG* dokinulo pojavu genomskih rearanžmana tipičnu za *recA* mutante. Drugim riječima, mogli bismo zaključiti da protein RecG potiče stvaranje genomskih rearanžmana u *recA* mutantima bakterije *D. radiodurans*. Da bismo to mogli ustvrditi sa većom sigurnošću, potrebno je analizirati veći broj uzoraka DNA iz preživjelih stanica mutanta *recA recG,* paralelno s DNA mutanta *recA* kao pozitivnom kontrolom.

Postavlja se pitanje kako se u bakteriji *D. radiodurans* odvija RecA-neovisni popravak DNA i koja bi mogla biti uloga proteina RecG u tom procesu? Pokazano je da RecA-neovisni popravak DNA u bakteriji *D. radiodurans* ne uključuje značajniju sintezu DNA (Zahradka i sur., 2006, Slade i sur., 2009). Dosad su poznata (najmanje) tri mehanizma kojima se mogu popraviti dvolančani lomovi DNA, a koji ne uključuju značajniju sintezu DNA: konzervativna homologna rekombinacija (HR), sljubljivanje jednolančanih krajeva DNA (engl. *Single-Strand Annealing*, SSA) i nehomologno spajanje krajeva DNA (engl. *Non-Homologous End-Joining*, NHEJ) (Haber, 2000; Aguilera i Gomez-Gonzales, 2008)). S obzirom da je za mehanizam HR neophodan protein RecA te da kod bakterije *D. radiodurans* nije detektirano postojanje mehanizma NHEJ, može se pretpostaviti da su rearanžmani detektirani u mutantima *recA* bakterije *D. radiodurans* posljedica popravka DNA mehanizmom SSA (slika 8).

U kvascu *S. cerevisiae* u mehanizmu SSA sudjeluju proteini koji imaju sljedeće aktivnosti: stvaranje jednolančanih 3' produžetaka DNA na mjestu dvolančanog loma, sparivanje jednolančanih produžetaka, popunjavanje jednolančanih praznina DNA pomoću sinteze DNA, uklanjanje jednolančanih "stršećih" krajeva DNA i ligacija (Haber, 2000). Kod bakterije *D. radiodurans* identificirana su dva proteina koja bi mogla sudjelovati u ovom mehanizmu: DdrA, koji štiti krajeve DNA od degradacije, i DdrB koji veže jednolančanu DNA (Slade i Radman, 2011).

O potencijalnoj ulozi proteina RecG u RecA-neovisanom popravku DNA u bakteriji *D. radiodurans* možemo raspravljati uz pretpostavku da on ima sličnu funkciju kao istoimeni protein opisan kod bakterije *E. coli*. Poznato je da u bakteriji *E. coli* protein RecG stabilizira rekombinacijske intermedijere, tzv. D-omče, što doprinosi uspješnosti rekombinacijskog procesa (Michel i Leach, 2013). Međutim, D-omče u normalnim uvjetima nastaju u procesu koji ovisi o proteinu RecA. U *recA* mutantima bakterije *D. radiodurans* D-omče bi mogle

nastati samo ako postoji neki drugi medijator koji bi omogućio invaziju jednolančane DNA u homolognu regiju drugog DNA dupleksa. Takav protein, međutim, do sada nije otkriven.

Druga mogućnost je da protein RecG djeluje u mehanizmu SSA na način da se veže na "stršeće" 3' jednolančane krajeve (engl.3'-*flaps*) nastale nakon spajanja jednolančanih regija dvaju krajeva dvolančanog loma (slika 8). U tom slučaju, protein RecG bi svojom helikaznom akativnošću mogao pomoći sljubljivanju "stršećeg" 3' kraja s homolognom sekvencom unutar drugog fragmenta DNA.

6. Zaključci

- U ovom radu je po prvi put genetički karakteriziran dvostruki mutant *recA recG* bakterije *D. radiodurans*.

- Tijekom uzgoja u tekućoj hranidbenoj podlozi pri 30ºC, dvostrnuki mutant *recA recG* bakterije *D. radiodurans* raste podjednakom brzinom kao i jednostruki mutant *recA*, a to je znatno sporije od stanica divljeg tipa.

- Slično mutantu *recA*, generacijsko vrijeme dvostrukog mutanta *recA recG* iznosi oko četiri sata, za razliku od divljeg tipa čije generacijsko vrijeme iznosi nešto manje od dva sata.

- Dvostruki mutant *recA recG* bakterije *D. radiodurans* je izuzetno osjetljiv na gama zračenje, slično kao i mutant *recA*. Doza od 900 Gy smanjuje njegovo preživljenje oko 10^4 puta.

- Dvostruki mutant *recA recG* bakterije *D. radiodurans* je izuzetno osjetljjiv i na UV zračenje, slično kao i mutant *recA*. Doza od 300 J/m^2 smanjuje njegovo preživljenje oko 10^4 puta.

- U populaciji stanica *recA recG* koje su preživjele 2 kGy gama zračenja nema pojave velikih genomskih rearanžmana, za razliku od mutanta *recA* kod kojega učestalost genomskih rearanžmana iznosi 15%.

- Moguće je da protein RecG potiče stvaranje genomskih rearanžmana tijekom RecA-neovisnog popravka DNA u bakteriji *D. radiodurans*.

7. Literatura

Aguilera, A., Gomez-Gonzales, B. (2008) Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. Nature Reviews Genetics 9: 204-217.

Azeroglu, B., Leach, D.R.F. (2017) RecG controls DNA amplification at double-strand breaks and arrested replication forks. FEBS Letters 591: 1101-1113.

Battista, J. R. (1997) Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annual Reviews in Microbiology 51: 203-224.

Bentchikou, E., Servant, P., Coste, G., Sommer, S. (2010) A major role of the RecFOR pathway in DNA double-strand-break repair through ESDSA in *Deinococcus radiodurans*. PLoS Genetics 6(1): e1000774.

Cox, M.M. (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. Annual Reviews in Microbiology 57: 551-577.

Cox, M.M., Battista, J.R. (2005) *Deinococcus radiodurans* - The consummate survivor. Nature Reviews Microbiology 3: 882–892.

Daly, M.J., Gaidamkova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.-M. W., Kemner, K.M., Fredrickson, J.K. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. PLoS Biology 5(4): e92.

Daly, M.J. (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. Nature Reviews Microbiology 7: 237-245.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., Ellenberger, T. (2006) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.

Haber, J.E. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. Trends in Genetics 16: 259–264.

Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. Annual Reviews in Microbiology 57:395-418.

Kim, J.I., Sharma, A.K., Abbott, S.N., Wood, E.A., Dwyer, D.W., Jambura, A., Minton, K.W., Inman, R.B., Daly, M.J., Cox, M.M. (2002) RecA protein from the extremely

radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization. Journal of Bacteriology 184: 1649–1660.

Kowalczykowski, S.C. (2000) Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends in Biochemical Sciences 25: 156-165.

Kriško, A., Radman, M. (2010) Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(32): 14373-14377.

Kriško, A., Radman, M. (2013) Biology of extreme radiation resistance: The way of *Deinococcus radiodurans*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5:a012765.

Lloyd, R.G., Rudolph, C.J. (2016) 25 years on and no end in sight: a perspective on the role of RecG protein. Current Genetics 62: 827–840.

Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., Daly, M.J. (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65: 44–79.

Mattimore, V., Battista, J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. Journal of Bacteriology 178: 633–637.

McGlynn, P., Lloyd, R.G. (2000) Modulation of RNA polymerase by (p)ppGpp reveals a RecG-dependent mechanism for replication fork progression. Cell 101: 35-45.

Michel, B., Leach, D. (2013) Homologous Recombination - Enzymes and Pathways. EcoSal Plus; doi:10.1128/ecosalplus.7.2.7.

Repar, J., Cvjetan, S., Slade, D., Radman, M., Zahradka, D., Zahradka, K. (2010) RecA protein assures fidelity of DNA repair and genome stability in *Deinococcus radiodurans.* DNA Repair 9: 1151-1161.

Slade, D., Lindner, A.B., Paul, G., Radman, M. (2009) Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. Cell 136: 1044-1055.

Slade, D., Radman, M. (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75: 133-191.

White, O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J. et al. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. Science 286: 1571-1577.

Wu, Y., Chen, W., Zhao, Y., Xu, H., Hua, J. (2009) Involvement of RecG in H2O2-induced damage repair in *Deinococcus radiodurans.* Canadian Journal of Microbiology 55: 841–848.

Wyatt, H.D.M., West, S.C. (2014) Holliday Junction Resolvases. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 6:a023192.

Zahradka, K., Slade, D., Bailone, A., Sommer, S., Averbeck, D., Petranovic, M., Lindner, A.B., Radman, M. (2006) Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. Nature 443: 569-573.

Zhang, L., Yang, Q., Luo, X., Fang, C., Zhang, Q., Tang, Y. (2007) Knockout of *crtB* or *crtI* gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability. Archives of Microbiology 188: 411-419.