Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije

Vranić, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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/urn:nbn:hr:217:954976

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

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

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

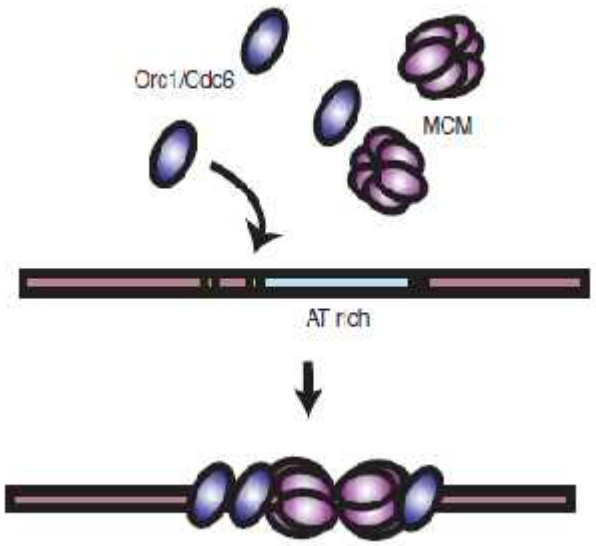
Zagreb, 2014.

Sadržaj

1. Uvod **2**
2. Ishodište replikacije *Haloferax volcanii* **4**
2.1. Karakterizacija dinamike replikacije 4
2.1.1. Analiza replikacijskih profila pomoću metode *„deep sequencing“* 5
2.1.2. Analiza GC-kosine (*engl.* GC skew) 6
3. Test korištenja ishodišta replikacije u laboratorijskom soju H26 ..... **7**
4. Dva moguća mehanizma raspršene inicijacije replikacije **9**
4.1. Inicijacija replikacije kod bakteriofaga T4 9
4.1.1. Mehanizam inicijacije replikacije ovisan o ishodištu replikacije 10
4.1.2. Mehanizam replikacije ovisan o homolognoj rekombinaciji (RDR) 10
4.2.1. Inducirana stabilna replikacija DNA 11
4.2.2. Konstitutivna stabilna replikacija DNA 12
4.2.3. Mutanti *sdrT* 13
5. Uloga proteina RadA u replikaciji DNA u *H. volcanii* **13**
6. Inicijacija replikacije bez ishodišta replikacije u arheji *Haloferax volcanii* **14**
6.1. Kako se odvija replikacija u mutantima *ΔoriC1,2,3,pHV4* arheje *Haloferax volcanii* ? 14
7. Koja je uloga ishodišta replikacije? **15**
8. Zaključak **17**
9. Literatura **18**
10. Sažetak **20**
11. Summary **21**

1. Uvod

Inicijacija replikacije započinje s definiranih mjesta nazvanih ishodišta replikacije što je zajedničko trima domenama života: prokariotima, eukariotima i arhejama. Arheje za inicijaciju replikacije koriste jedno (*Pyrococcus sp*.) ili više ishodišta replikacije (*Sulfolobus sp., Haloarchaea*) [1], dok prokarioti koriste jedno ishodište, a eukarioti više ishodišta. Također, postoje razlike u organizaciji ishodišta replikacije. Osnovna struktura arhealnog ishodišta replikacije evolucijski je sačuvana među arhejama. Tipično uključuje AT-bogatu taljivu regiju (*engl*. AT-rich melting region), tzv. regiju DUE (*engl.* duplex unwinding element) okruženu s nekoliko elemenata ORB (*engl.* origin recognition box), tj. ponavljajućih invertnih sekvenci. Elementi ORB bivaju prepoznati od proteina Orc1/Cdc6 ili proteina Orc, a smješteni su pored gena koji kodira za protein inicijator replikacije [1]. Protein Orc homologan je proteinima Orc1 i Cdc6 eukariota pa se smatra da ima ulogu specifičnog prepoznavanja ishodišta replikacije i vezanja helikaze MCM (*engl.* minichromosomal maintenance) na ishodište [1]. Helikaza MCM analogna je helikazi DnaB prokariota koja se pomoću proteina Cdc6 i Cdc1 eukariota, slično funkciji proteina DnaC prokariota, postavlja na ishodište replikacije [1]. Sl. 1. prikazuje model prepoznavanja arhealnog ishodišta replikacije *oriC1* vrste *S. solfataricus* [2]. Ishodište i gen za protein inicijator zajedno čine sustav replikator-inicijator koji je sličan sustavu *oriC-dnaA* kod prokariota, a neki sustavi potječu od ekstrakromosomalnih elemenata [1]. Dakle, arhealna ishodišta replikacije definirana su specifičnim sekvencijskim elementima kao i kod bakterija i kvasca *S. cerevisiae* – jedinog eukariota za kojeg se zna da ima jasno definirana ishodišta replikacije zvana autonomno replicirajuće



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

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

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

2. Ishodište replikacije *Haloferax volcanii*

Halofilna arheja *Haloferax volcanii* ima multireplikonski genom koji se sastoji od glavnog kromosoma, tri sekundarna kromosoma pHV1, pHV3 i pHV4 i plazmida pHV2 [14]. Geni za inicijacijski protein Cdc6/Orc1 koji su smješteni susjedno od ishodišta replikacije, nalaze se u svim replikonima osim na plazmidu pHV2 i djeluju *in trans* na ciljnu autonomno replicirajuću sekvencu u *H. volcanii* [14]. Struktura ishodišta replikacije tipična je za arheje - AT bogate regije potrebne za odmatanje i/ili savijanje ishodišta okružene su klasičnim elementima ORB. Sl. 2. prikazuje tipičnu strukturu elementa ORB *Haloferax volcanii* [13]. U njemu se nalazi slijed G baza (*engl.* G-string) koji veže protein Cdc6/Orc1 i element mini-ORB koji veže protein inicijator s puno manjim afinitetom [2]. Broj gena koji kodira za proteine inicijatore veći je od broja ishodišta replikacije. Smatra se da neki proteini Cdc6/Orc1 djeluju pod definiranim fiziološkim uvjetima [14]. Vjerojatno postoji hijerarhija ishodišta replikacije, jer kompetiraju za zajedničke replikacijske faktore, zbog čega se ne aktiviraju i ne koriste jednako često [13-14].



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

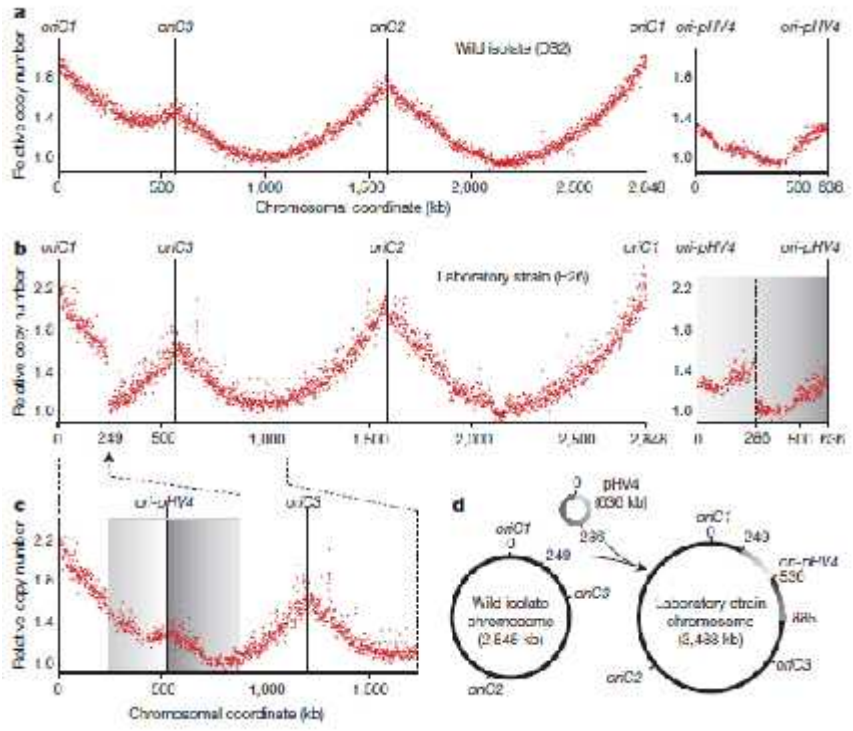
2.1. Karakterizacija dinamike replikacije

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

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

2.1.1. Analiza replikacijskih profila pomoću metode „*deep sequencing*“

Ishodišta replikacije razlikuju se po trenutku aktivacije, što znači da se određene genomske regije repliciraju u karakteristično vrijeme – ranije u fazi S ili pak kasnije u fazi S. Neka ishodišta su aktivna u većini stanica dok su druga „uspavana“ i rijetko se aktiviraju. Pomoću SOLiD (*engl.* Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) sekvenciranja moguće je izmjeriti relativno vrijeme aktivacije replikacije i odrediti smještaj ishodišta u genomu. Potrebno je iz asinkrone stanične kulture odvojiti stanice koje su u fazi S od stanica koje su u fazi G2. Stanice u fazi G2 služe kao referentna kontrola za normalizaciju stanica u fazi S jer se ne repliciraju. Izmjeri se relativni broj kopija svake sekvence pomoću kvantitativnog „deep“ sekvenciranja. Kratka očitanja (*engl.* short reads) mapiraju se prema odgovarajućoj regiji u kromosomu.



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

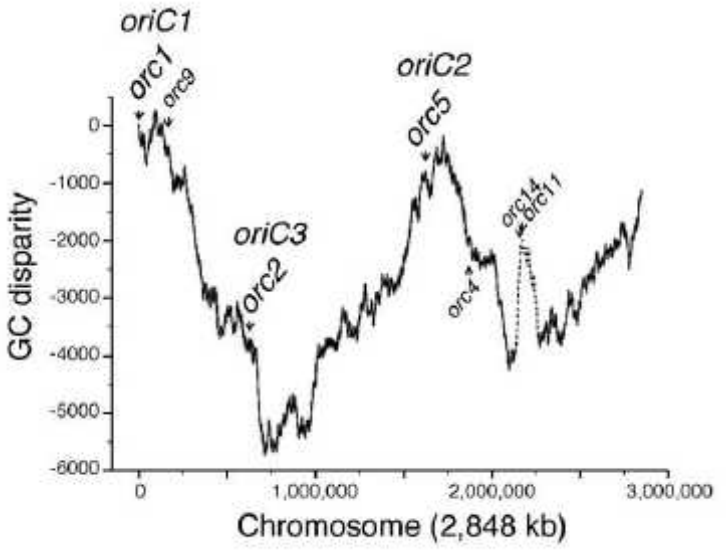
Sekvence koje se repliciraju ranije u fazi S prisutne su u većem relativnom broju kopija nego sekvence replicirane u kasnoj fazi S. Na temelju replikacijskog profila izradi se graf položaja na kromosomu i relativnog broja kopija. Sekvence koje se repliciraju rano pridonose povećanju pika, a one koje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

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

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

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

Vodeći i zaostali lanci bakterijskog i arhealnog genoma razlikuju se po sastavu baza, a veća zastupljenost gvanina u odnosu na citozin uočena je obično u vodećim lancima tijekom replikacije [14]. Isprekidane promijene sastava nukleotida koji je specifičan za određeni lanac ukazuju na prisutnost ishodišta replikacije ili terminatora replikacije [14,19]. U haloarhealnom genomu, GC-kosina je obrnuta - vodeći lanac bogat je citozinom, a zaostali lanac bogat je gvaninom [14]. Sl. 4. prikazuje ovisnost GC dispariteta o koordinatama

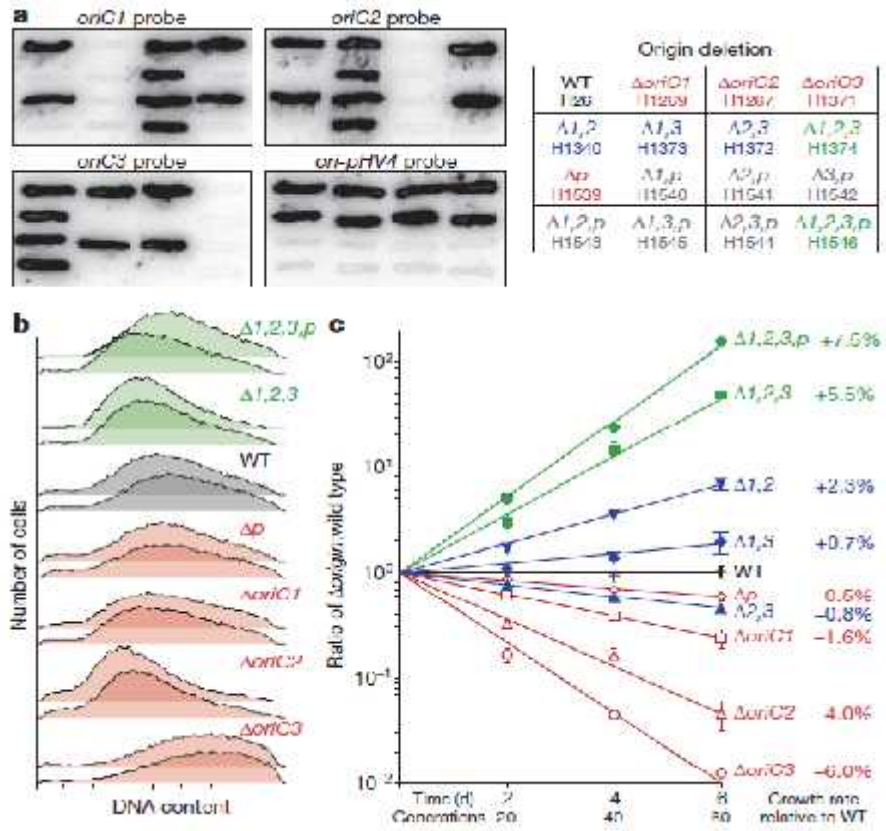


Sl. 4. | GC-disparitet glavnog kromosoma soja DS2 divljeg tipa [13].

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

3. Test korištenja ishodišta replikacije u laboratorijskom soju H26

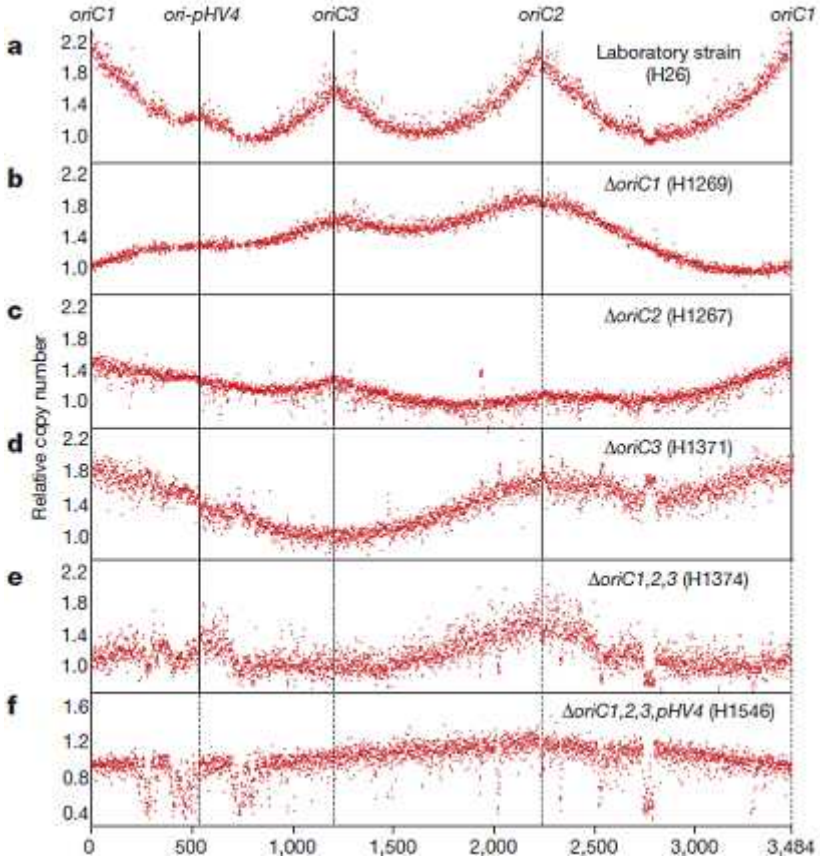
Autori su uočili varijabilnu aktivaciju ishodišta replikacije. Kako bi detaljnije proučili aktivnost ishodišta testirali su vijabilnost arheja nakon delecija pojedinačnih ili kombinacija ishodišta replikacije. Sl. 5. prikazuje karakterizaciju sojeva s deletiranim ishodištima [13]. Stanice su ostale vijabilne čak i nakon delecije sva četiri ishodišta replikacije – *oriC1*, *oriC2*, *oriC3* i *ori-pHV4* [13]. Zanimljivo je da je soj bez ijednog ishodišta pokazao veći sadržaj DNA od divljeg tipa, a sojevi s uklonjenim jednim ishodištem pokazali su neznatne promijene sadržaja DNA [13].



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

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

Kako je moguće da je rast stanica brži što je ishodište replikacije slabije aktivno? Tajna je u helikazi MCM i njezinom afinitetu vezanja na ishodište replikacije o čemu je riječ na kraju seminara. Ova vrsta arheje pokazuje da ishodišta replikacije, tj. replikacija inicirana s ishodišta, usporava rast vrste. Kako bi dokazali da se replikacija događa neovisno o utvrđenim ishodištima replikacije, autori su napravili replikacijske profile sojeva s uklonjenim ishodištima, a rezultati su prikazani na Slici 6. Oštri pikovi na replikacijskim profilima prikazuju prava mjesta ishodišta replikacije, a zaobljavanje pika posljedica je inicijacije replikacije na raspršenim mjestima po genomu [13]. Tamo gdje je ishodište uklonjeno, ne pojavljuje se pik. Profil soja *ΔoriC1,2,3* pokazuje zonu koja je obogaćena kopijama DNA oko ishodišta *oriC2*. Budući da na tom mjestu nema oštrog pika, nema ni „uspavanog“ ishodišta replikacije na što se sumnjalo, jer je kod kvasaca zabilježen slučaj „uspavanih“ ishodišta replikacije [13]. Profili sojeva *ΔoriC1,2,3* i *ΔoriC1,2,3,pHV4* pokazuju inicijaciju replikacije na raspršenim mjestima neovisnima o ishodištima replikacije. Dakle, inicijacija replikacije može se odvijati neovisno od utvrđenih ishodišta replikacije s malo ili niti malo mjesne specifičnosti.



Sl. 6. | Replikacijski profili sojeva s uklonjenim ishodištima replikacije. Usporedba replikacijskih profila laboratorijskog soja H26 (**a**) s mutantima *ΔoriC1* (**b**), *ΔoriC2* (**c**), *ΔoriC3* (**d**), *ΔoriC1,2,3* (**e**) i *ΔoriC1,2,3,pHV4* (**f**) [13].

4. Dva moguća mehanizma raspršene inicijacije replikacije

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

U sojevima *ΔoriC1,2,3* i *ΔoriC1,2,3,pHV4* znanstvenici su uočili zonu obogaćenu kopijama DNA u regiji od 2230 kb. Ta je regija blizu ribosomskog RNA (rRNA) operona *rrnB* koji je 6 kb udaljen od ishodišta *oriC2* [13,14] (Sl. 6e, f; 2234-2239 kb). Smatra se da operon *rrnB* sudjeluje u homolognoj rekombinaciji s operonom *rrnA* koji je 200 kb udaljen od ishodišta *oriC1* [14]. Ti isti operoni orijentirani su u suprotnom smjeru od ishodišta replikacije, vjerojatno da bi se izbjegao sudar između replikacijske vilice i transkripcijske rRNA mašinerije [14]. Visoka razina transkripcije DNA povezana je s povišenom razinom homologne rekombinacije [13], zbog čega autori smatraju da ipak D-omča i/ili R-omča olakšavaju inicijaciju replikacije u operonima *rrn*. Takav je način replikacije detaljno opisan kod faga T4 na temelju petnaestogodišnjeg istraživanja [6], a nastanak D-omči ili R-omči zabilježen je za vrijeme replikacije inducirane oštećenjem (ili ne) u bakteriji *E. coli* – tzv. „stabilna replikacija DNA" [5].

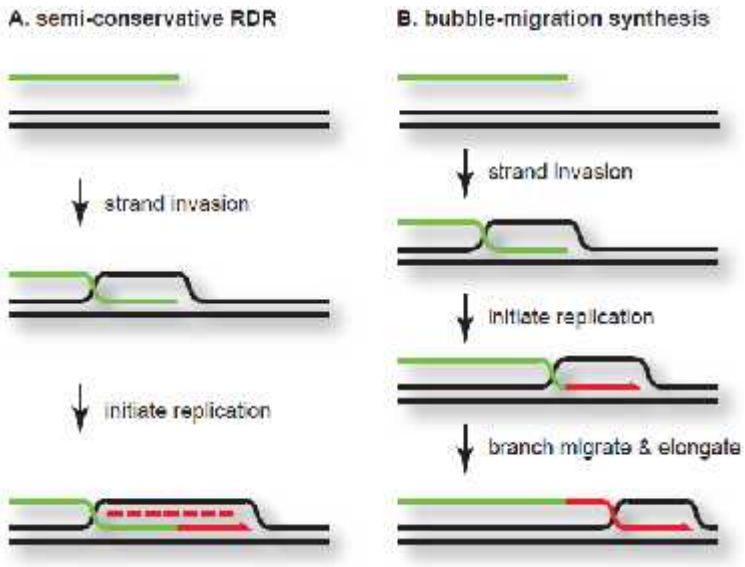
4.1. Inicijacija replikacije kod bakteriofaga T4

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

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

4.1.1. Mehanizam inicijacije replikacije ovisan o ishodištu replikacije

Iako sam naslov kaže da fag T4 koristi mehanizam inicijacije replikacije stvaranjem R-omči na ishodištima replikacije, dokazano je da se stvaranje takvih R-omči za inicijaciju replikacije ne mora zbivati na specifičnim sekvencama – sekvencama DUE, već i na heterolognim odmatajućim mjestima. Nadalje, u *in vitro* testu proučavanja mehanizma replikacije faga T4 pomoću R-omči, pokazalo se da ishodišta replikacije nisu potrebna za stvaranje omči već regije DUE, tj. DNA odmatajuće regije [6].



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

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

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

4.1.2. Mehanizam replikacije ovisan o homolognoj rekombinaciji (RDR[1])

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

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

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

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

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

4.2.1. Inducirana stabilna replikacija DNA

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

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

4.2.2. Konstitutivna stabilna replikacija DNA

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

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

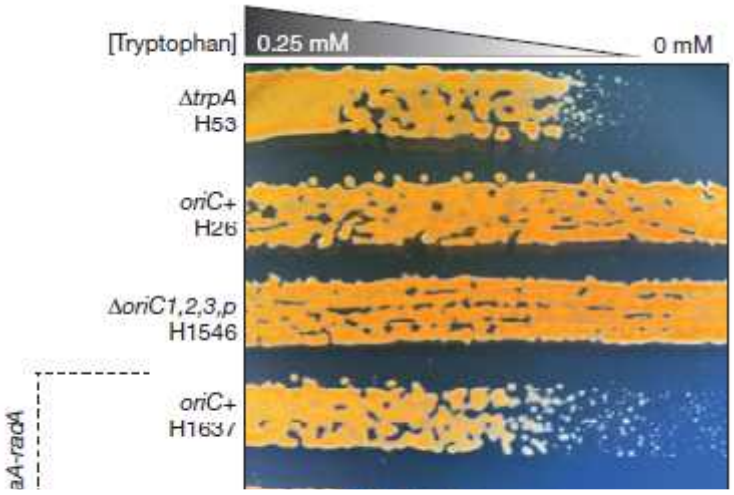
Zanimljivo je napomenuti kako se već ranije uočilo nagomilavanje R-omči na mjestima operona *rrnB in vitro* i *in vivo* te da formiranje R-omči uvelike ovisi i o sastavu baza - R-omče favoriziraju mjesta bogata purinima. Ustanovljeno je da protein RecG inhibira stvaranje R-omči jer je sposoban ukloniti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

4.2.3. Mutanti *sdrT*

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

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

Arhealni protein RadA član je obitelji rekombinacijskih proteina u koju spadaju protein RecA iz bakterije *E. coli* i protein Rad51 iz kvasca *S. cerevisiae*. RadA je DNA ovisna ATP-aza, a za takvu aktivnost ovog enzima potreban je Mg^{+}, jednolančana DNA i visoka temperatura (65-85 °C). Potreban je za sparivanje i izmjenu homolognih DNA lanaca. Po svojstvima je sličniji eukariotskom proteinu Rad51, što pokazuju filogenetske analize i analize sekvenci [20].



Sl. 8. | Rekombinaza RadA esencijalna je u mutantu *ΔoriC1,2,3,pHV4*. Gen *radA* stavljen je pod kontrolu inducibilnog promotora kojeg inducira triptofan u sojevima *oriC*$^{+}$ i *ΔoriC1,2,3,pHV4* (H1637 i H1642). Soj H1637 raste sporije u odsutnosti triptofana, dok soj H1642 nije vijabilan jer nema sinteze proteina RadA. Odsutnost triptofana ne utječe na rast kontrolnih sojeva *oriC*$^{+}$ i *ΔoriC1,2,3,pHV4* (H26 i H1546); Soj H53 je triptofanski auksotrof i služi kao kontrola [13].

Delecijom gena *radA* u *Haloferax volcanii* nastaju mutanti u kojima je nemoguće odvijanje homologne rekombinacije, smanjena je sposobnost popravka DNA i smanjen je rast stanica. Neočekivano je otkriće u istoimenim mutantima da se plazmid pHV2 ne može replicirati. Dakle, protein RadA je nužan za replikaciju plazmida pHV2 koji ne sadrži sustav replikator-inicijator. Smatra se da se plazmid replicira Θ replikacijom, budući da ima slične sekvence kao i bakterijski Θ

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

Autori su pokušali ukloniti gen *radA* iz sojeva s uklonjenim ishodištima *oriC*. Nisu mogli ukloniti gen *radA* iz soja *ΔoriC1,2,3,pHV4* pa su zaključili da je rekombinacija esencijalna u odsustvu ishodišta *oriC*. Kako bi potvrdili zaključak stavili su gen *radA* pod kontrolu triptofanskog promotora. Sl. 8. prikazuje rezultate eksperimenta [13]. U odsustvu triptofana, kada je triptofanski promotor utišan, stanice divljeg tipa s inducibilnim genom *radA* rastu sporije, dok stanice bez ishodišta replikacije nisu vijabilne [13].

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

Rezultati prethodnog eksperimenta potvrdili su da se replikacija cijelog genoma bez ishodišta replikacije odvija rekombinacijom, budući da mutanti *ΔoriC1,2,3,pHV4* s utišanim genom *radA* nisu vijabilni. Da bi pokušali predložiti mehanizam ovakvog tipa inicijacije replikacije, autori su se pozvali na dosadašnja istraživanja. Poznato je da mutanti *oriC* u bakteriji *E. coli* koriste homolognu rekombinaciju da bi inicirali replikaciju genoma, no stanice su pokazale slabiji rast od divljeg tipa [5,13]. Nadalje, takav tip replikacije moguć je jedino u sojevima sa supresorskim mutacijama (npr. u mutantima *sdrA* protein RNaza HI je inaktiviran čime se stabilizira R-omča) [5,13].

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

6.1. Kako se odvija replikacija u mutantima *ΔoriC1,2,3,pHV4* arheje *Haloferax volcanii* ?

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

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

7. Koja je uloga ishodišta replikacije?

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

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

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

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

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

8. Zaključak

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

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

9. Literatura

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

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

10. Sažetak

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

11. Summary

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