

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

Šimatović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:933768>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Šimatovi

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

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

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

Zahvala

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

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

ANA ŠIMATOVI

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

Proteini od interesa, Rad51 i Rad51D, imaju vrlo važnu ulogu kod sisavaca u održavanju integriteta genoma. Postojanje ovih proteina utvrđeno je i kod drugih kralježnjaka, te kod beskralježnjaka. Modelni organizam, morska spužva *Suberites domuncula* pripada koljenu Porifera, najstarijim danas živim mnogostaničnim organizmima, i stoga je vrlo zanimljiva za istraživanje evolucijski sačuvanih gena/proteina. Metodama umnožavanja DNA lančanim reakcijom polimeraze i određivanja slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom utvrđeno je nukleotidni slijed gena *rad51* i *rad51D* te položaj introna. Pomoću algoritma BLAST i programa Clustal X i GeneDoc uspoređene su dobivene proteinske sekvence s njihovim ortolozima u drugim organizmima. Proteinske sekvence i položaj introna otkriveno pokazuje veće u homologiju s ortolozima iz kralježnjaka, nego iz beskralježnjaka. Gen *rad51D* ukloniran je u ekspresijski vektor kojim su transformirane stanice BL21. Nedovoljna koncentracija proteina se zadržava u topljivoj fazi, većina odlazi u talog gdje se agregira u obliku inkluzijskih tijela.

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

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

Voditelj: dr. sc. Helena Četković

Ocjenitelji: dr. sc. Mirjana Kalafatić, prof.

dr. sc. Maja Matulić, doc.

dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, doc.

Rad prihvaćen: 01. srpnja 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

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

Ana Šimatovi

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

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

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

Thesis deposited in Central Biological Library.

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

Supervisor: dr. sc. Helena Četković

Reviewers: dr. sc. Mirjana Kalafatić, Prof.

dr. sc. Maja Matulić, Doc.

dr. sc. Željka Vidaković Čifrek, Doc.

Thesis accepted: 01. July 2009.

SADRŽAJ

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

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

1. UVOD

1.1. Spužve

1.1.1. Op a obilježja

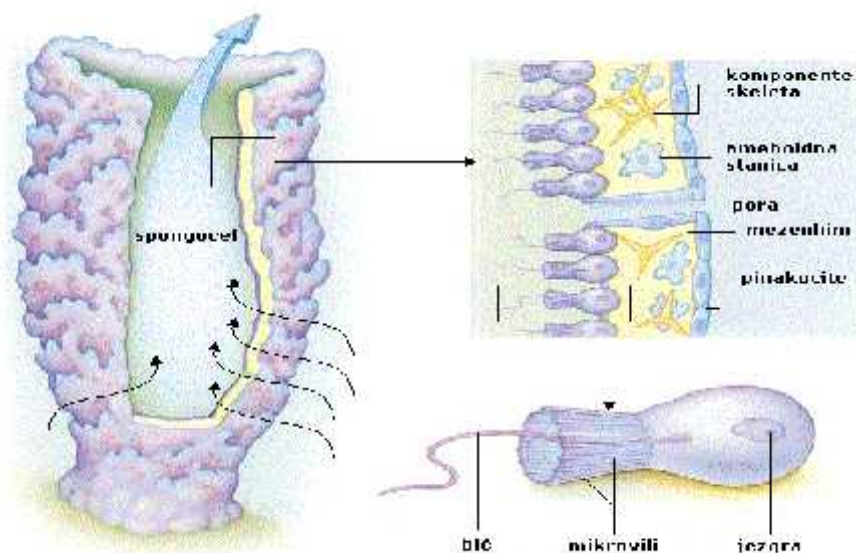
Spužve, koljeno Porifera, su najstarije žive koljeno Metazoa. Sesilni su organizmi, građeni od mnoštva pora i kanala koji čine sustav za filtriranje i prehranu što je u skladu s njihovim sjedilima u životu (Hickman i sur. 2000).

Poznato je više od 5000 vrsta spužvi koje žive u moru i oko 150 vrsta koje žive slatkim vodama. Većinom su kolonijalne, variraju u veličini od nekoliko milimetara pa i do dva metra. Manji broj je radijalno simetričan, redovito one manje, dok je većina ipak nesimetrična i razgranjena. U površinskim, ali i u ostalim dijelovima tijela nalaze se različiti pigmenti pa postoje i narančasto, crveno, žuto, zeleno ili ljubičasto obojene spužve (Matonkin i sur. 1998).

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

1.1.2. Osnovni plan gra e tijela

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



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

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

- pinakocite su epitelne plosnate stanice koje prekrivaju vanjsku površinu i dio unutrašnjosti. Rubovi nekih pinakocita mogu se stezati i rastezati i na taj način regulirati veličinu površine.

- porocite su stanice slične cjevicama, prostiru se od vanjske površine do spongocela.

- hoanocite su stanice jednim dijelom pričvršene za mezenhim, a drugim slobodno strše u spongocel. Slobodni dio ima bič koji je okružen ovratnikom građenim od mikrofibrila. Bič stvaraju struju vode koja čestice nosi prema ovratniku gdje se filtriraju.

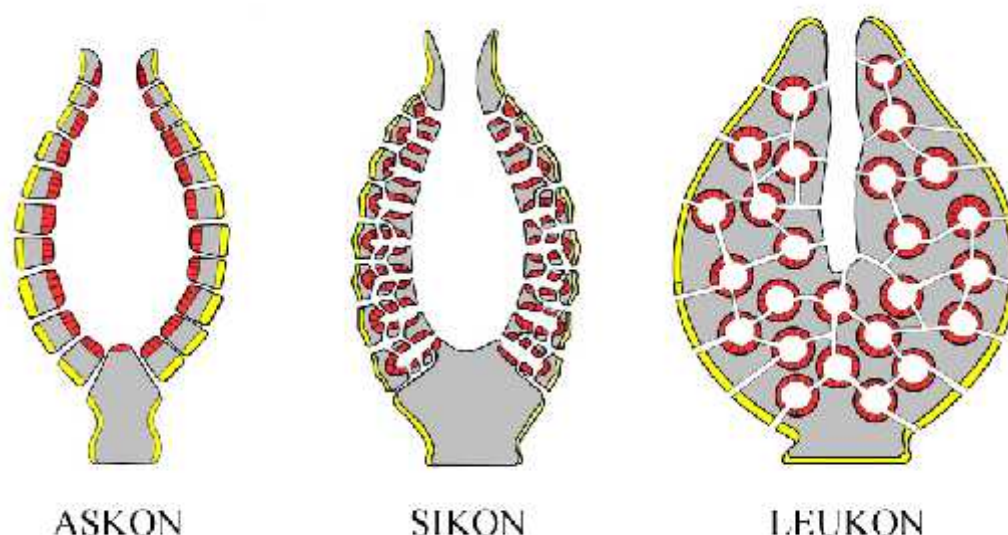
- archeocite su ameboidne stanice koje obavljaju mnoštvo funkcija i mogu se razviti u specijaliziran tip stanica: skleroblasti (prema vrsti skeleta koji izgrađuju razlikuju se: kalkoblasti, silikoblasti i spongoblasti), miociti, kromociti i spolne stanice.

Skelet je građen od iglica (spikula) različitog oblika i mineralnog sastava ili bjelancevinastih vlaknaca (spongina) (Matonkin i sur. 1998; Hickman i sur. 2000).

Život spužve ovisi o struji vode koju stvaraju hoanocite. Struja vode donosi im hranu i kisik, a odnosi metaboli ki otpad. Hrane se esticama veli ine od 0,1 do 50 μm . Prehrana se sastoji od bakterija, algi, protista i razli itih suspendiranih organskih estica (Miller i Harley 1999).

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

Spužve kod kojih je nabiranje stjenke tijela još jednostavno nazivaju se sikoidne spužve. Vodu primaju dolaznim kanalima koji se granaju u radijalne kanale obložene hoanocitama. Radijalni kanali se ulijevaju u spongocel, obložen epitelnim stanicama. Najve i stupanj nabiranja postignut je kod leukonoidnih spužva. To je najsloženiji tip i najbolje adaptiran za pove anje veli ine spužve. Tu je potpuno nestala radijalna simetrija, a oblik spužve je nepravilan. Spongocel je nestao, a voda se filtrira u bi astim komoricama.



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

1.1.3. Razmnožavanje i embrionalni razvoj

Spužve se razmnožavaju spolno i nespolno. Djelomi no su dvospolci, djelomi no razdvojenog spola. Nespolno se razmnožavaju fragmentacijom, imaju veliku mo regeneracije, i unutrašnjim pupanjem pri emu stvaraju rasplodna tijela koja nazivamo gemule. Spolne stanice nastaju iz amebocita, ali i iz hoanocita. Oplodnja je unutrašnja, što je odvedena osobina za ovo koljeno koje se smatra jednostavnim, ili rje e vanjska.

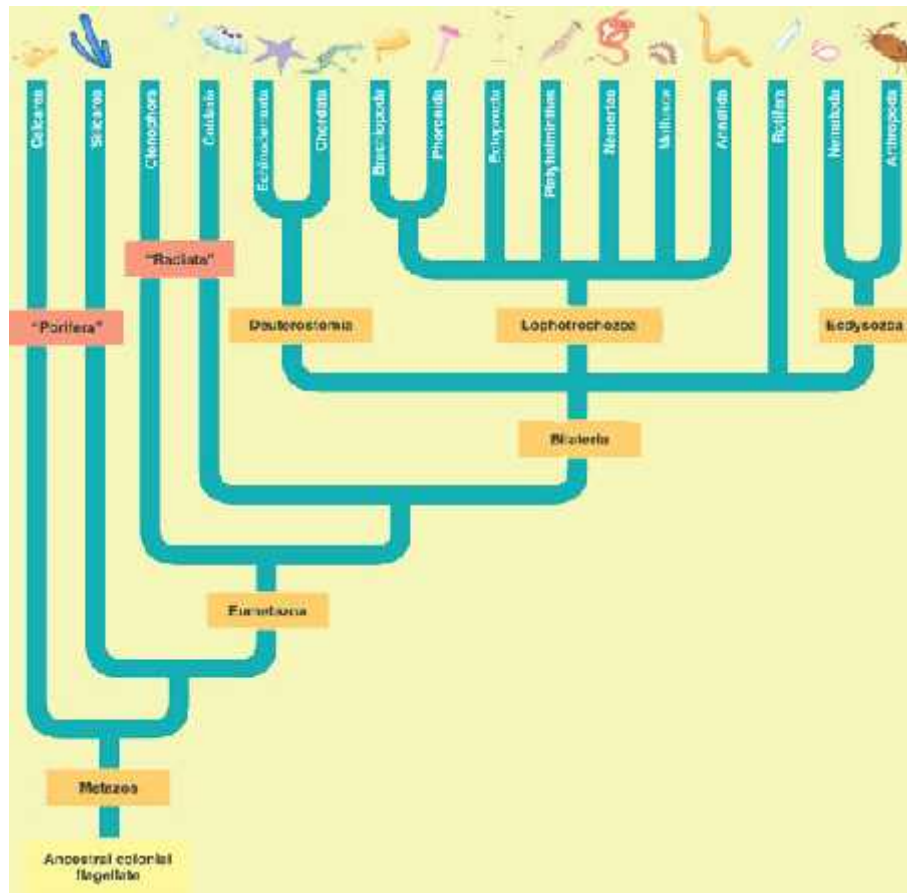
U embriogenezi spužve poznate su dvije vrste li inki. Kod li inke amfiblastule trepetljikave stanice predodre ene za razvoj sloja hoanocita nalaze se na jednom njenom kraju. Kod najve eg dijela spužava unutrašnjost blastule je mnogobrojnim dijeljenjima stanica potpuno ispunjena, pa se takva li inka naziva parenhimula (Habdija i sur. 2004).

1.1.4. Filogenija

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

Zbog specifi ne organizacije, diferencijacije stanica i embriogeneze, njihova je sistematika složena. esto su smatrane prijelaznim koljenom između Protoctista i Metazoa. U brojnim sistematikama odvojene su od ostalih Metazoa u skupinu pod nazivom Parazoa ili Archaeometazoa. Mnogi znanstvenici smatraju da su se spužve razvile iz okovratnih bi aša. Neki se protive toj hipotezi jer se okovratna struktura javlja kasnije u embriološkom razvoju spužve. Vanjske stanice larve imaju bi eve, ali ne i ovratnike. One postaju hoanocite tek kada do u u unutrašnjost (Hickman i sur. 2000).

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



Slika 3. Filogenetski položaj koljena Porifera.

Preuzeto s www.biology.lsu.edu.

1.1.5. Biološka raznolikost spužvi, klasifikacija

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

Demospongia- kremenorožnja e

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

Hexactinellida- stakla e

Ovo je razred dubokomorskih spužvi. Skelet je građen od šesterozrakastih silicijevih iglica. Neobične su zbog svog sincicijalnog tipa tkiva. Sikonoidnog su ili leukonoidnog oblika. Uglavnom su blijedo žute do bijele boje. Najstariji ostatci mnogostanih organizama upravo su spikule ove porodice iz perioda kasnog proteozoika.

Calcarea- vapnenja e

Skelet vapnenjaka sastavljen je od spikula građenih od kalcijeva karbonata. Ovdje su uključena sva tri građevna plana spužava: askonoidni, sikonoidni i leukonoidni. Uglavnom su male, od nekoliko milimetara do 30 cm, raznih su oblika. Sve vrste su morske (Hutchins i sur. 2003).

1.1.6. Obilježja genoma

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

Introni su vrlo kratki, većina ih pripada u razred introna veličine 0,1 – 2 kb. Do sada nisu pronađeni introni veći od 5 kb (Müller W. E. G. 2003).

Fahey i sur. (2008) su usporedbom nekodirajućih regija (nekada zvane engl. junk DNA) kod spužve *Amphimedon*, žarnjaka *Nematostella vectensis* i nekoliko drugih bilaterija, razlikovale veličine genoma, uo ili kako geni kod vrste *Amphimedon* imaju izrazito kraće i sljedove izmeću gena u odnosu na druge prethodno spomenute vrste. Nikakve druge veće razlike kod regulatornih gena koje su proučavali nisu uočile. To je dovelo do pretpostavke kako je upravo ta razlika u duljini nekodirajućih regija ključna za razlike u ekspresiji regulatornih gena koje su uočene tijekom embriogeneze. Takve podatke dobili su i Breter i sur. (2003) za genome spužvi *Suberites domuncula* i *Geodia cydonium*, čiji se genom

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

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

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

1.2. Rad 51 i njegovi paralozi

1.2.1. Rad51 je homolog proteina RecA

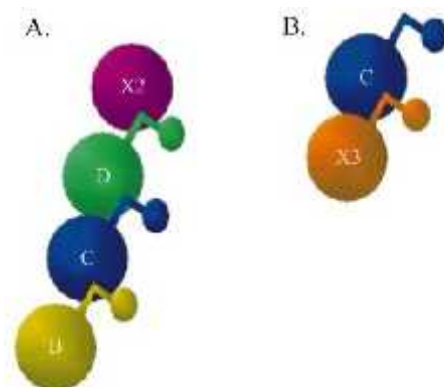
Sve stanice u organizmu podložne su djelovanju endogenih i egzogenih mutagena koji ošte uju DNA. Me u najopasnijim ošte enjima su dvolan ani lomovi (van Gent i sur. 2001). Nakupljanje takvih ošte enja vodi ka promijenjenoj funkciji stanica, onkogenezi ili stani noj smrti, stoga su sustavi za popravak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

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

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

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

- Rad51B-Rad51C-Rad51D-Xrcc2 (BCDX2)
 - Rad51C-Xrcc3 (CX3)
- (Masson i sur. 2001; Liu i sur. 2002)

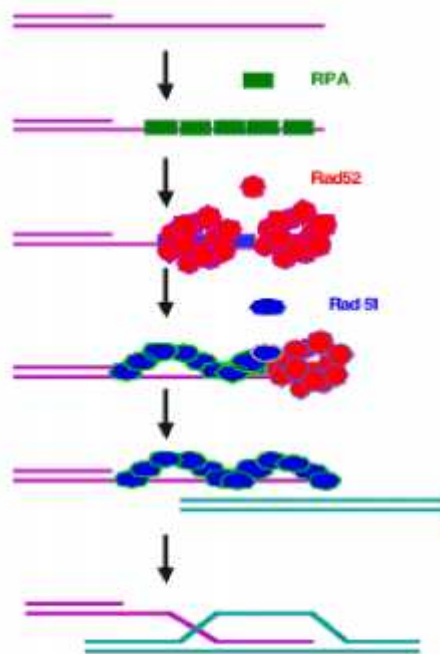


Slika 4. Grafički prikaz kompleksa BCDX2 (A) i CX3 (B) koji sudjeluju u procesu homologne rekombinacije. Preuzeto od Masson i sur. 2001; Liu i sur. 2002.

Promjene u funkciji Rad51 dovode do stanice smrti, dok nedostatak funkcije nekog od paraloga nije važna za vijabilnost stanica, ali dolazi do promjena u fenotipu (Kawabata i sur. 2005).

1.2.2. Uloga Rad51 i njegovih paraloga u stanici

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



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

DNA izdužena za oko 50% u odnosu na njenu duljinu u B-formi (Bianco i sur. 1998). Kompleks katalizira homologno sparivanje jednog lanca DNA s drugim i izmjenu

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

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

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

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

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

Rad51D je jedinstven između Rad51 paraloga, osim u popravku dvostranih lomova DNA sudjeluje i u održavanju duljine telomera i sprečavanju njihove fuzije (Tarsounas i sur. 2004). Reverzna transkriptaza replicira telomerne sljedove, a specifični proteini vežu se i štite krajeve (Yanowitz 2007).

Kod ionizirajućeg zračenja i radijacije dolazi do prekomjerne ekspresije Rad51B. On fosforilira proteine važne u kontroli staničnog ciklusa, kao što su cdk2, ciklin E, p53 što dovodi do zaustavljanja ciklusa u G1 fazi (Havre i sur. 2000). Protein također stupa i u interakciju s histonima (Coleman i sur. 2003).

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

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

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

1.3. Introni

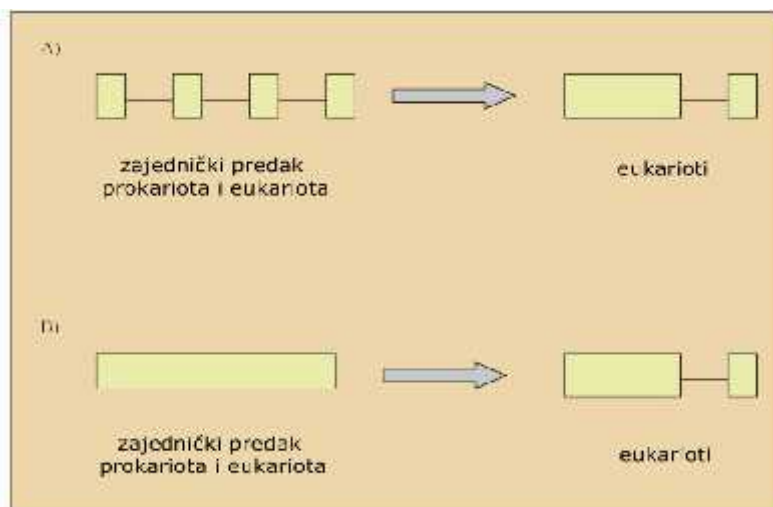
1977. godine otkriveno je da su geni eukariota isprekidani nekodiraju im regijama-intronima, koji se uklanjaju kompleksom RNA i proteina. Sekvence koje prekidaju gene prona ene su i kod bakterija i u genomima organela (mitohondrij, kloroplast), no one se same izrezuju, a nazivaju se parazitski elementi.

Broj i veli ina introna varira izme u organizama i gena. Tako je kod npr. kvasca ve ina gena neprekinuta, dok geni kod sisavaca imaju puno introna.

Ve ina introna je nevažna za funkciju gena, no kod nekih su unutar introna prisutne regulacijske sekvence ili njihova prisutnost osigurava nastanak više razli itih transkripata (Pagel i sur. 2002).

Iako nukleotidna sekvenca introna brzo evoluirala, lokacija introna unutar gena može biti visoko o uvana izme u udaljenih vrsta ili paraloga nastalih duplikacijom unutar genoma (Federov i sur. 2002).

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



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

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

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

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

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

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. HIPOTEZA

Spužve, iako najstarije žive koljeno Metazoa kod kojeg nije došlo do razvoja tkiva i organa, posjeduju brojne evolucijski sačuvane gene i proteine uključene u odvedene funkcije i predstavljaju zanimljiv modelni organizam za evolucijsko istraživanje.

Dosadašnja istraživanja na spužvi pokazala su da u njele geni/proteini spužava pokazuju veći i stupanj konzerviranosti strukture s homolognim/ortolognim genima i proteinima kralježnjaka, nego s homolozima/ortolozima iz beskrležnjaka. Stoga očekujemo da će i proteini Rad51 i Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula*, s obzirom da su važni za vijabilnost i normalnu funkciju stanica, također imati nisku stopu promjene aminokiselinske sekvence i najvjerojatnije pokazivati najveću sličnost s homolognim proteinima kralježnjaka.

Pretpostavljamo također da će kod gena za te proteine i položaj i faza introna biti evolucijski sačuvana. U dosadašnjim istraživanjima na genomu spužvi utvrđeno je kako njezini geni ne posjeduju duge introne. Stoga za introne u genima *rad51* i *rad51D* očekujemo da neće biti dulji od 2 kb.

2.2. CILJ ISTRAŽIVANJA

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

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Pokusni organizam

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

Klasifikacija: Kraljevstvo: Animalia

Koljeno: Porifera

Razred: Demospongia

Red: Hadromerina



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

Suberites domuncula, odnosno narančasta plutača, je vrsta spužve široko rasprostranjena na Mediteranu, a nalazimo je još i u Crnom moru. Jedinke su sferične, maksimalnog promjera do 10 cm. Površina je većinom glatka, sadrži samo male kanale koji su često ravni i javljaju se pojedinačno. Različito su obojene: od narančaste do svijetlo plave boje.

Obojene su zahvaljujući i složenoj mješavini ugljikohidrata s pigmentima sličnim alfa-karotinu, beta-karotinu, likopenu i torulenu (Matonić i sur. 1998).

Primarno nastanjuju muljevita i pjeskovita dna, a često ih nalazimo i u simbiozi s rakom *Paguristes eremita*. Ova vrsta raka nastanjuje prazne školjke na koje se onda prihvatiti spužva. Spužvama ova simbioza omogućuje bijeg od sjedila koga inače životinja što onda znači i rasprostranjenje gameta na širem prostoru i veći donos hrane. Zauzvrat luge i toksine odbija moguće predatore i na taj način štiti raka.

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

3.1.2. Osnovne kemikalije

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

3.1.3. Osnovne puferske otopine

Korišteni su puferi:

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

3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline

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

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

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

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

Po etnice za gen *rad51*

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

Po etnice za gen *rad51D*

fw1	5'-CGCATATGCAAACGCATGTGAAC-3'	(Invitrogen)
fw2	5'-CATGCCATATGAATAGTCTGTC-3'	(Invitrogen)
rv	5'-AGATGATTTTCGGGATCCTAGC-3'	(Invitrogen)

Po etnice su osmišljene pomoću programa za kreiranje po etnica NetPrimer.

Ne posjeduju os simetrije drugog reda i nisu komplementarne vektorskoj DNA ili podrujima DNA koja su pročitana.

3.1.5. Plazmidi

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

3.1.6. Proteini i enzimi

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

3.1.7. Boje

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

3.1.8. Hranjive podloge za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterije *E. coli* korištena je:

- LB tekuća podloga (5g/L kvasac ekstrakt, 10g/L tripton, 5g/L NaCl, 0,1g/L MgCl₂)
- LB kruta podloga (12g/L agara)
- Selektivne podloge su sadržavale 100 µg/mL ampicilina.

3.1.9. Bakterijski sojevi

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

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

3.1.10. Ostali materijali

Korišteni su komercijalni paketi:

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

Za Western-analizu proteina korišteni su:

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

Za PCR reakciju korišten je PCR Ready Mix (Sigma)

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

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupne DNA iz spužve *Suberites domuncula*

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

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

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

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

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

3.2.2. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

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

Neophodno je poznavati slijed DNA koji se umnaža. To će poslužiti za odabir početnica, to jest para kraćih oligonukleotida koji predstavljaju granice (lijevo i desno) odsjeka DNA koji se umnaža. Osim početnica za samu reakciju potrebna su i četiri deoksiribonukleozidtrifosfata (dNTP), te termostabilna DNA-polimeraza.

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

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

Osobine početnica koje će osigurati njihovo snažnije sparivanje s kalupom:

- duljina početnica 18-24 pb
- temperatura sparivanja između 50-65°C
- udio G i C nukleotida 45-55%
- 5' i 3' krajevi završavaju s nukleotidom G ili C, ili GC odnosno CG dinukleotidom

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

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

Ukupni volumen PCR reakcija je 25 μL.

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

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

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

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

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

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

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

Za DNA kalup korištena je cDNA biblioteka i genomska DNA.

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

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

3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Većina bioloških makromolekula je električki nabijena, te se stoga gibaju u električnom polju. Elektroforeza nukleinskih kiselina temelji se na uinku molekularnog sита. Omjer naboja i mase gotovo je jednak za sve polinukleotide stoga se male molekule gibaju brže od velikih. Razdvajanje nukleinskih kiselina u agaroznom gelu provodi se u svrhu restriksijske analize, određivanje veličine DNA-fragmenta i plazmida, određivanje količine, isto je izolirane DNA ili produkta reakcije PCR te izolacije fragmenata za potrebe kloniranja. Kako su molekule DNA velike potreban je gel s velikim porama. U tu svrhu najčešće se koriste agarozni gelovi. Elektroforezom DNA u gelu agaroze moguće je razdvojiti fragmente veličine 50 pb-50 kb. Agaroz je linearni polimer u kojem se izmjenjuju ostaci D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Gel se priprema otapanjem agaroze u puferu i zagrijavanju do vrenja. Polimerne molekule hlađenjem tvore gel međusobno se povezuju i vodikovim vezama. Velikina pora, a time i raspon molekularnih masa molekula koje se mogu uspješno odijeliti, kontrolira se mijenjanjem koncentracije agaroze u gelu. Uzorcima je potrebno dodati boju koja omogućuje praćenje fronte uzoraka tijekom elektroforeze. Radi određivanja veličine fragmenata, u zasebnu jažicu dodaje se smjesa DNA biljega. Vizualizacija razdvojenih fragmenata DNA postiže se pomoću etidij-bromida, uključenog u pufer za izradu agaroznog matriksa. Etidij-bromid se interkalira u DNA i pobuđen UV svjetlom fluorescira u narančastom dijelu spektra.

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

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

3.2.4. Izolacija DNA iz agaroznog gela

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

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

3.2.5. Određivanje slijeda nukleotida u molekuli DNA Sangerovom dideoksi metodom

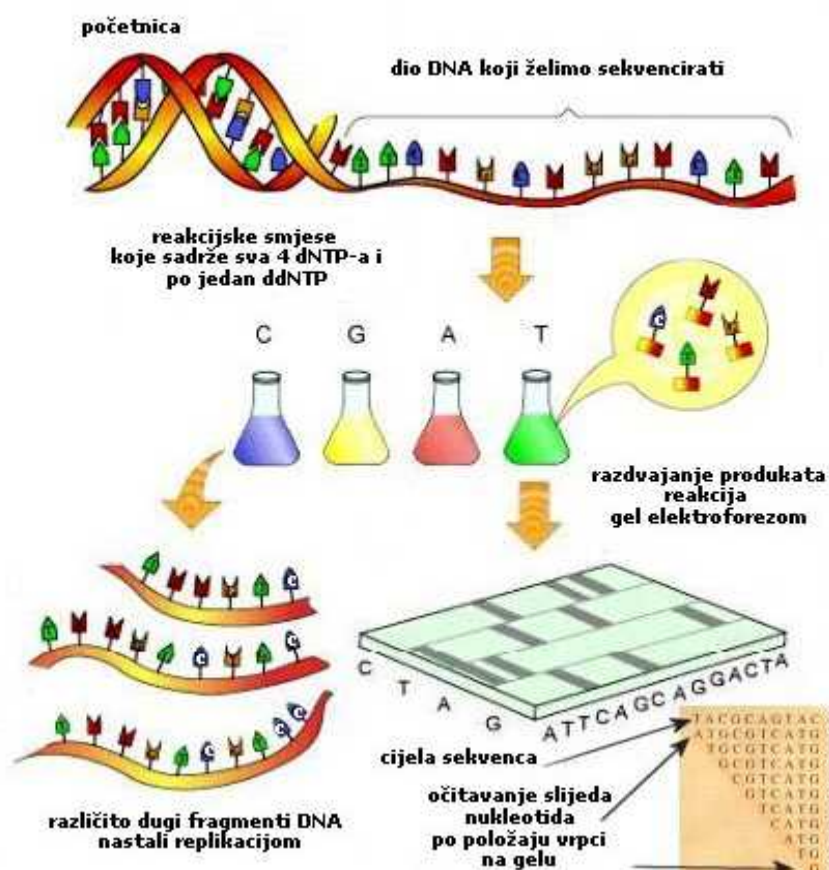
Metodu za određivanje slijeda nukleotida (sekvenciranje) u molekuli DNA koja je danas u upotrebi razvio je sredinom sedamdesetih godina 20. stoljeća Frederic Sanger sa suradnicima u Cambridgeu. Za svoje otkriće 1980. godine dobio je Nobelovu nagradu. Metoda sekvenciranja molekule DNA zasniva se na zaustavljanju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

Prirodni supstrati za sintezu DNA su deoksiribonukleozid-trifosfati (dNTP): dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Sinteza DNA ide u 5'-3' smjeru, a preduvjet za sintezu je postojanje po etnice koja pronalazi sebi homologan slijedi i njegovim produžavanjem nastaje novi DNA lanac. DNA polimeraze, enzimi koji sintetiziraju DNA, mogu ugraditi u rastu i lanac i analoge dNTP-ova, dideoksiribonukleozid-trifosfate (ddNTP) koji nemaju hidroksilnu

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

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

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

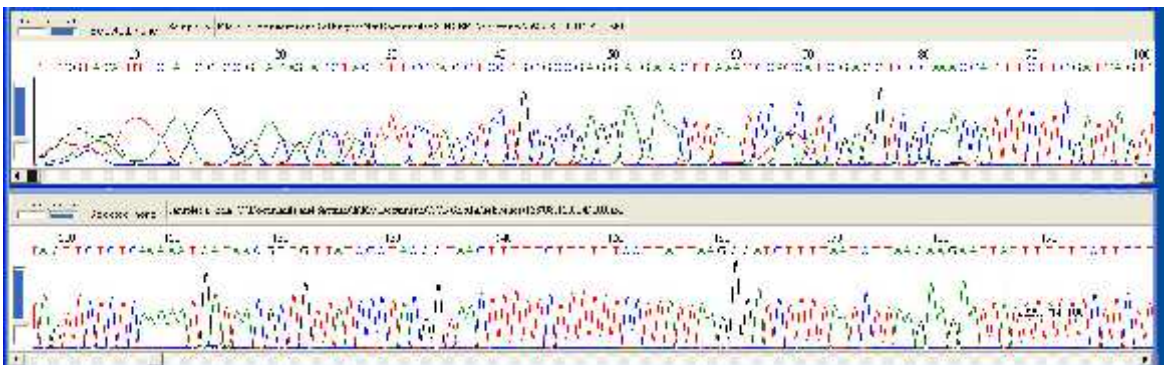


Slika 8. Sekvenciranje DNA, četiri odvojene reakcijske smjese. Preuzeto s www.scq.ubc.ca.

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

Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer

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



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

Protokol za metodu obilježavanja ddNTP-ova s četiri fluorescentne boje

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

Tablica 5. Program reakcije sekvenciranja pomoću PCR-a.

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

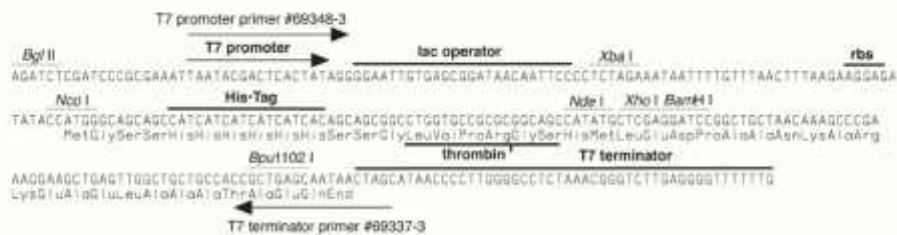
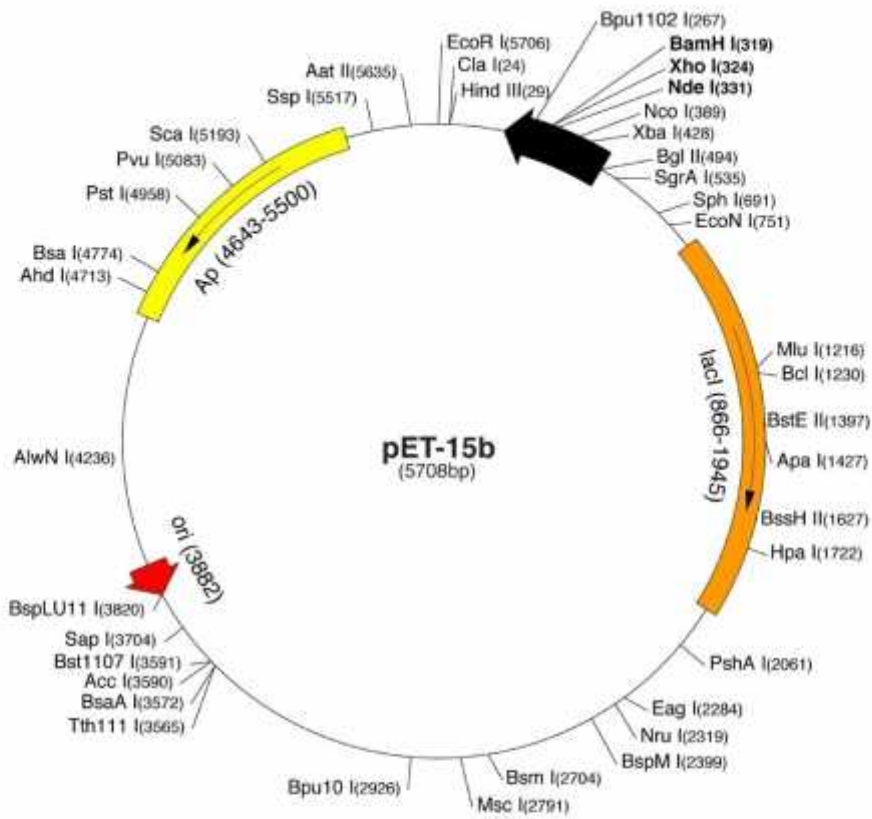
Brzo ohladiti pri 4°C i kratko centrifugirati

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

3.2.6. Stvaranje rekombinantne DNA

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

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

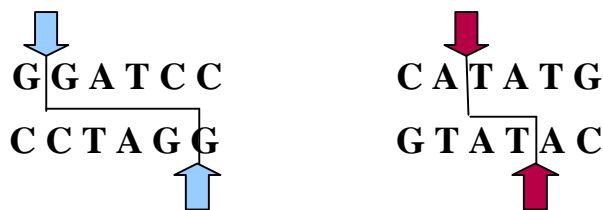


Slika 10. Ekspresijski vektor pET15b. Specifi na mjesta prikazana su na cirkularnoj mapi, a na dnu slike je prikazana kloniraju a regija. Preuzeto s <http://depts.washington.edu/>.

3.2.6.1. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama

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

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



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

Za ukloniravanje su osmišljene tri početnice:

- početnica fw1 je dizajnirana od prvog metionina na slijedu nukleotida: CGAGCATGCAAACGCATGTGAAC, s tim da su nukleotidi AGC zamijenjeni s nukleotidima CAT da smo dobili restrikcijsko mjesto za *Nde* I enzim
- početnica fw2 kreće se od drugog metionina, u slijedu: CATGCATAATGAATAGTCTGTC, ATA je zamijenjeno s CAT (napravljeno je restrikcijsko mjesto također za *Nde* I enzim)
- početnica rv je dizajnirana na slijedu: GCTACAATCACGAAATCATCT, gdje smo slijed CAATCA zamijenili s GGATCC da dobijemo restrikcijsko mjesto za *Bam* HI

Reakcije razgradnje izvedene su u volumenima od 20 μ L, u odgovaraju im puferima i uvjetima optimalnim za pojedini enzim (po naputku proizvođača). Po završetku reakcije fragmenti DNA razdvojeni su gel elektroforezom i pročišćeni upotrebom komercijalnog paketa *QIAquick Gel Extraction Kit*.

3.2.6.2. Povezivanje fragmenata DNA

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

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

Sastav pufera za DNA-ligazu T4:

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

3.2.7. Transformacija bakterijskih stanica

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

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

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

Protokol pripreme stanica za elektroporaciju

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

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

Protokol za elektroporaciju bakterijskih stanica

- korišten je uređaj Gene-Pulser (Biorad)

- kivete za elektroporaciju su ohlađene na -20°C
- kompetentne stanice su otopljene i inkubirane u ledu
- u 40 μL kompetentnih stanica dodano je 3 μL taloga ligacijske smjese prethodno otopljene u 20 μL vode
- stanice su prenesene u ohlađenu kivetu koja je pomoću hladnog nosača umetnuta u uređaj za elektroporaciju
- primijenjen je puls 2,5 kV/cm u trajanju 4,5 ms
- stanice su resuspendirane u 1 mL tekućeg medija LB i inkubirane 40 minuta na 37°C
- stanice su nasađene na selektivnu podlogu s ampicilinom

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

3.2.8. Izolacija plazmidne DNA

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

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

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

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

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

3.2.9. Indukcija ekspresije gena

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

Protokol za indukciju ekspresije gena

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

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

3.2.10. Pro iš avanje proteina

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

Postoji nekoliko različitih načina pripreme bakterijskog staničnog lizata, postupci uključuju enzimsku ili mehaničku razgradnju bakterijske stijenke i membrane.

3.2.10.1. Sonikacija

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

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

Protokol za pripravu lizata bakterijskih stanica

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

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

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

300 mM NaCl

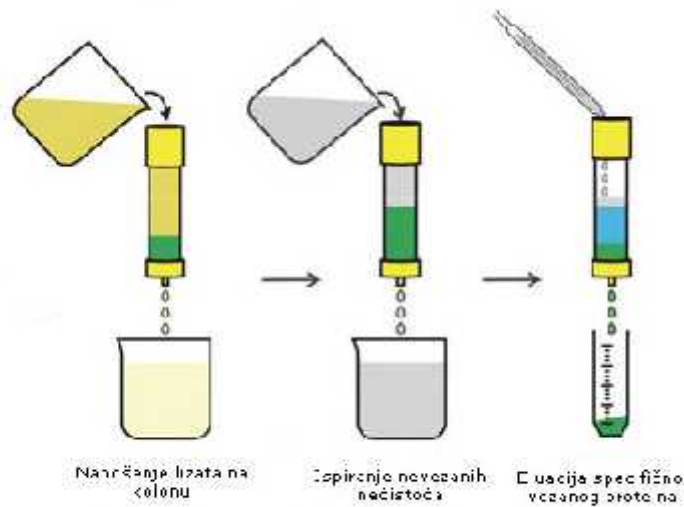
10 mM imidazol

3.2.10.2. Afinitetna kromatografija

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

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

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



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

Protokol za pro iš avanje Rad51D proteina iz lizata bakterijskih stanica

- kolona za pro iš avanje proteina puni se s 0.75 mL Ni-NTA agaroze, a zatim ispire s 10 mL pufera za lizu
- 15 mL supernatanta izdvojenog centrifugiranjem nanosi se na kolonu
- uzorak koji je prošao kroz stupac se ponovno nanosi na kolonu
- kolona se ispire s dodatnih 10 mL pufera za lizu
- nespecifi no vezani proteini se ispiru s 10 mL pufera za ispiranje
- vezani protein se ispire s 5 mL pufera za ispiranje, a eluat se skuplja u frakcijama od 1 mL

Sastav pufera korištenih za pro iš avanje proteina IMAC metodom

- pufer za lizu:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

10 mM imidazol

- pufer za ispiranje nespecifi no vezanih proteina:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

30 mM imidazol

- pufer za ispiranje specifi no vezanih proteina:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

300 mM NaCl

500 mM imidazol

3.2.10.3. Određivanje koncentracije proteina Bradford metodom

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

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

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

Sastav Bradford otopine :

2,375% etanol

4,4% H₃PO₄

0,07% Coomassie Brilliant Blue

3.2.10.4. Elektroforeza u SDS-poliakrilamidnom gelu

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

Protokol za razdvajanje proteina u poliakrilamidnom gelu

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

- gel smjestiti u aparaturu za elektroforezu (korišten uređaj Mini-Protean II (Biorad))
*ako se koristi samo jedan gel potrebno je s druge strane elektrode uvrstiti stakleni predložak, da bi se spriječio i kratki spoj
- uliti pufer za elektroforezu u komoru kadice i u prostor između gela i elektrode
- nanijeti uzorke, 5 μL uzorka po jažici; u jednu jažicu nanijeti biljeg (korišten je proteinski biljeg širokog raspona)
- dodati pufer za elektroforezu u gornji spremnik, poklopiti poklopcem i priključiti elektrode

Uvjeti elektroforeze:

- sabijanje u gornjem dijelu gela 7,5 V/cm
- razdvajanje u donjem dijelu gela 12 V/cm
- kada boja dođe do donjeg ruba isključiti napajanje

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

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

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

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

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

Tris	24 g
glicin	114 g
<u>SDS</u>	<u>10 g</u>

do 1 L dopuniti reH₂O

- prije upotrebe pufer razrijediti 10 puta

- ✓ Pufer za nanošenje uzoraka

1 M Tris (pH 6.8)	0,5 mL
glicerol	1 mL
<u>bromfenol plavilo</u>	<u>5 mg</u>

Nadodati deH₂O do 10 mL

3.2.10.5. Bojanje proteina u gelovima

Postupak se koristi za detekciju proteinskih pruga u gelu.

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

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

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

-priprema otopine za odbojavanje:

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

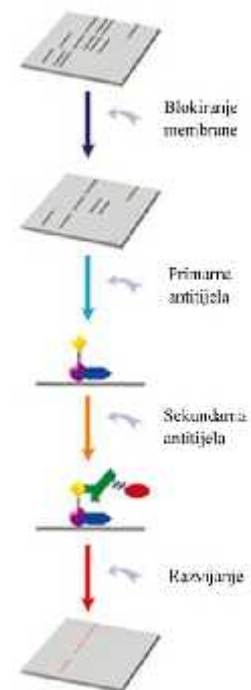
* kako bi se proces odbojavanja ubrzao može se mijenjati otopina za odbojavanje

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

3.2.10.6. Western-analiza proteina

Western blot je analiti ka metoda koja omogu uje prijenos proteina razdvojenih elektroforezom s poliakrilamidnog gela na nitrocelulozu ili najlon, podloge na koje se proteini vrsto vežu, i njihovu detekciju. Na gel se stavlja membrana, a zatim filter papir. Sve zajedno se zatim prenosi u pufersku otopinu koja se djelovanjem kapilarne sile pomi e po filter papiru prema gore i prenosi proteine na membranu. Druga metoda prijenosa proteina je *elektroblotting* (engl.) gdje se za prijenos proteina koristi protok struje. Proteini se prenose na membranu zadržavaju i raspored koji su imali na gelu. Tako vezani proteini pogodni su za analizu protein-ligand interakcija. Naj eš e se koriste antitijela za detekciju odre enih, specifi nih antigena. Takva proba može biti obilježena i omogu avati detekciju, ali eš e se biljezi stavljaju na sekundarno antitijelo. Kao biljezi mogu se koristiti radioaktivni spojevi, fluorokromi ili enzimi. Prednost stavljanja biljega na sekundarno antitijelo je u pove anju osjetljivosti metode te u injenici da se takvo sekundarno antitijelo

može koristiti za detekciju razli itih proba. Kako su membrane od ovih materijala izabrane baš zbog svojeg svojstva da vežu proteina, a i antitijela su proteini potrebno je takvu interakciju onemogu iti. Blokiranje takvog nespecifi nog vezanja postiže se izlaganjem membrane razrije enoj otopini proteina. Za to se koriste BSA (Bovine serum albumin) ili nemasno mlijeko uz dodatak male koli ine deterdženta. Proteini iz otopine prihva aju se

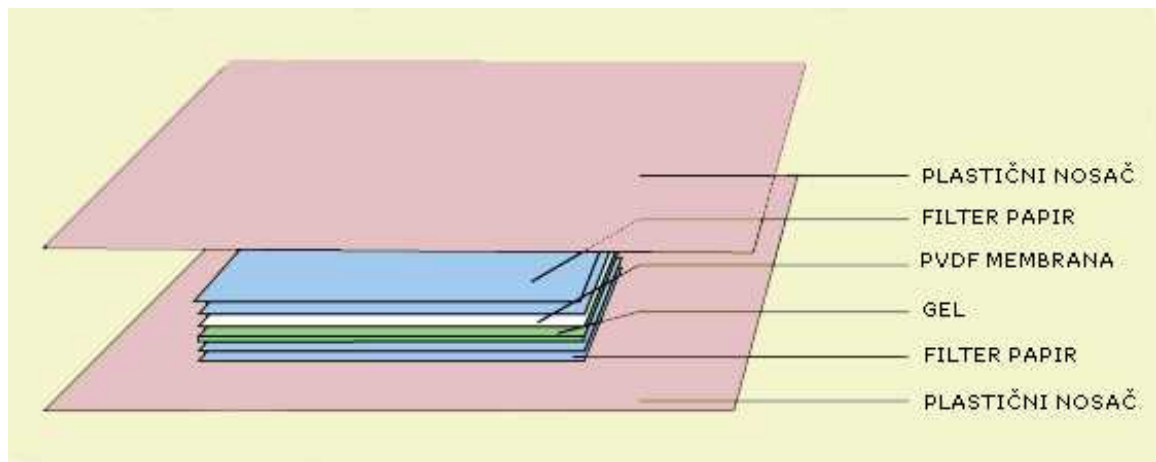


Slika 13. Shematski prikaz detekcije antigena vezanih na membranu. Preuzeto s www.tata-box.com.

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

Protokol za prijenos proteina s gela na membranu

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



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

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

3.2.11. Bioinformatika obrada

Blast (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) omogućuje usporedbu aminokiselinskih sekvenci različitih proteina ili nukleotidnih sekvenci sa sekvencama pohranjenim u genskoj banci podataka, te identifikaciju sekvence koja sliči traženoj sekvenci.

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

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

Koristili smo ga za prikupljanje proteinskih sekvenci Rad51 i Rad51D kod različitih organizama, za određivanje položaja introna, te za određivanje aminokiselina koje sudjeluju u ključnim i važnim motivima.

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

Sekvence poravnate u Clustal X programu obrađene su u programu GeneDoc (Nicholas i sur. 1997) gdje su prilagođene za prijenos u Word dokument i printanje. Pomoću ovog programa je utvrđena i sličnost, odnosno broj identičnih baza u poravnanim sekvencama. Program i njegov detaljan opis mogu se naći na Internet stranici:

<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/index.html>.

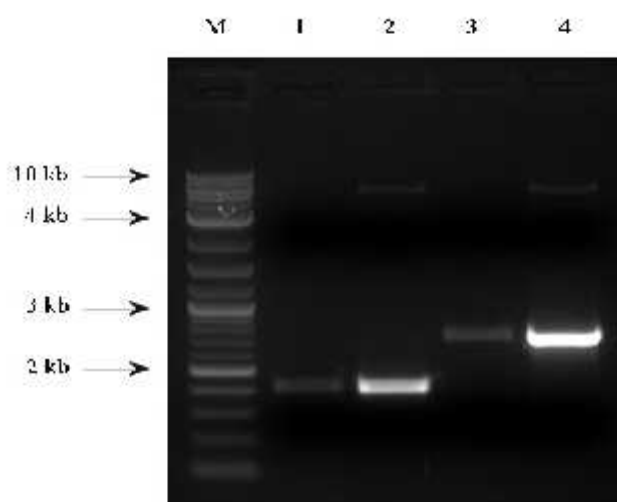
ExpASy (**E**xpert **P**rotein **A**nalysis **S**ystem) je server Švicarskog instituta za bioinformatiku (SIB) koji je specijaliziran za analizu proteinskih sekvenci i struktura. Preko servera je omogućen pristup brojnim bazama podataka povezanim s istraživanjem proteina (Gasteiger i sur. 2003). Internet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

4. REZULTATI

4.1. Pretraživanje cDNA biblioteke

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

Radi proučavanja strukture gena *rad51* i njegove daljnje manipulacije, na osnovi poznatog dijela nukleotidne sekvence osmišljene su i naručene po etnicama slijedeći je naveden u poglavlju 3.1.4. Nukleotidi, oligonukleotidi i nukleinske kiseline. U kombinaciji s po etnicama T3 i T7, karakterističnim za pBK-CMV plazmid u kojem se nalazi cDNA biblioteka, rije su karakteristike također opisane u prethodno navedenom poglavlju, provedene su PCR reakcije na biblioteci. Uvjeti u kojima su se reakcije provodile naznačeni su u poglavlju 3.2.2. Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze (PCR), u Tablici 2. Rezultati PCR reakcija provjereni su u jedan postotnom agaroznom gelu.



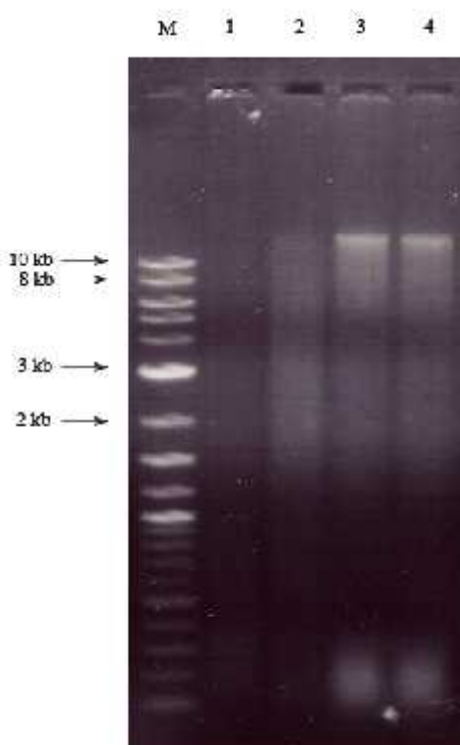
Slika 15. Umnažanje gena *Rad51* iz cDNA biblioteke napravljene na genomu vrste *Suberites domuncula*. U liniji M je marker veličine 0,1 do 10 kb, u liniji 1 je PCR produkt umnožen s po etnicama T3 i rd1, u liniji 2 je pozitivna PCR kontrola, plazmid s ugraenim poznatim dijelom gena *Rad51* umnožen po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

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

4.2. Izolacija genomske DNA

Nakon homogenizacije tkiva u tekućem dušiku talog, koji sadržava stanice, je obrađen po naputcima iz paketa *Qiagen Genomic DNA*, *Qiagen Blood and cell culture DNA*. Rezultat izolacije je provjeren elektroforezom u agaroznom gelu. Na gel je stavljeno po 5 μL svakog od četiri uzorka.

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



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

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

4.3.1. Rad51

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

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

Nukleotidna sekvenca je u programu ExPasy prevedena u proteinsku. Protein Rad51 ima 338 aminokiselina, po inje aminokiselinom metionin iji kodon je AUG, a završava stop kodonom koji je kodiran tripletom UAA. Pomo u algoritma BLAST, preko dobivene aminokiselinske sekvence, utvr eni su o uvani motivi karakteristi ni za Rad51 porodicu gena, njihov položaj i primarna struktura. Prisutna su etiri motiva: Walker A i Walker B motivi koji sudjeluju u vezanju i hidrolizi ATP-a, ATP i BRC motiv. Walker A motiv stupa u kontakt s fosfatnim dijelom ATP molekule, a Walker B motiv ima ulogu koordinacije Mg^{2+} . Op enita primarna struktura Walker A motiva sastoji se od osam aminokiselina i ima slijed (Gly/Ala)XXXXGlyLys(Thr/Ser), gdje X ozna va bilo koju aminokiselinu. Kod proteina Rad51 iz morske spužve *Suberites domuncula* prva aminokiselina ovog motiva, glicin, nalazi se na 126. mjestu proteinske sekvence a cjelokupni slijed glasi Gly-Glu-Phe-Arg-Thr-Gly-Lys-Thr. Odre ena je i struktura Walker B motiva, koja se sastoji od pet aminokiselina. Prva aminokiselina, leucin, nalazi se na

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

```

agatatgtacgtggagtcgtgagtcctctcaaaagtaaacttaactactgatatggctatg
                                     M A M
caagcagaagtacagcatacagaagagcaagttgacgacgaacaatttgggccacagctt
Q A E V Q H T E E Q V D D E Q F G P Q L
gtcaacaaattagaaggacaggggtatcagtagcaatgatgtaaagaaactaagtgatgca
V N K L E G Q G I S T N D V K K L S D A
ggctaccacactatagagtcagtgccctatgcccccaagaaggctctcatactcatctct
G Y H T I E S V A Y A P K K A L I L I S
ggaataagtgaagctaaagtagacaagatagacaagaatgaagctgccaagcttgtgcctatg
G I S E A K V D K I Q N E A A K L V P M
ggattcaccacagcaacggagtttcatcaacgctcagagattatccaactcacaaca
G F T T A T E F H Q R R S E I I Q L T T
ggctcaaaagagctcgataaaacttttaggggggtggtatagagacgggatccattacagaa
G S K E L D K L L G G G I E T G S I T E
atggtcgggagaatttagaactggaaaagactcaactttgtcacacacttgctgttacttgt
M F G E F R T G K T Q L C H T L A V T C
cagttaccaatagatggaggaggtggtaggggaaagtgtctgtacattgacacacagggc
Q L P I D G G G G E G K C L Y I D T E G
acattcagaccagagagactgctagctgtagctgaaaggtatggtttgtctggatcagat
T F R P E R L L A V A E R Y G L S G S D
gtggttgataatgtagcatatgctcgagcctacaacactgaccatcaaggtcagctactg
V L D N V A Y A R A Y N T D H Q G Q L I
ttgcaagcgtcagccatgatggcagaatcaagatatgctctactcatcgtcgacagtgcc
L Q A S A M M A E S R Y A L L I V D S A
acggcattatatcgacagactactctggcagaggtgagctgagtgcgagacaatgcact
T A L Y R T D Y S G R G E L S A R Q C T
tggcaagaatatctcagaactttgctcctactggcagacgagtttgggggtgcccgtggtg
W Q E Y L R T L L L L A D E F G V A V V
ataactaatcaggtagtgccacaagtggtgggcatcaatgtttgctactgaccccaag
I T N Q V V A Q V D G A S M F A T D P K
aaaccaattggaggggaacattattgcacatgctctactacaagattatatctcaaaaag
K P I G G N I I A H A S T T R L Y L K K
gacgaggggggagaccagaatatgtaagatatgattctccctgtttgctgaagcagag
D E G E T R I C K I Y D S P C L P E A E
gcaatgtttgctatcaatgctgatggatttgagactccaaggactaaactgtatgtgtgc
A M F A I N A D G I G D S K D
aagtattttcattcatctcagattttgtgtacaatagttcatctgcctaacttgccttg
ctttgtgtaaagcaacatgtatgtcattgttttgttggcacagttgcaccaataagacatt

```

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

Zeleno-Walker A motiv, roza-Walker B motiv, ljubičasto-BRC domena, podcrtano-aminokiselinski ostatci u izravnoj vezi s ATP molekulom. Sivo označeni kodoni za početak i kraj proteina Rad51, crveno počinje kodon pronađen u cDNA biblioteci.

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

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

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

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

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

```

SD : -----MAMQAEVQ-HTEEQVDDQEQFQQLVWKLKGGQISTNDVKKLSDAGYHTTESVAYAFKKKALLISIGISEAKVDKI : 73
HS : -----MAMQMQLANADTSVEEESFGPQPHSRLEQCCGINANDVKLLEAGFHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKADKI : 74
RN : -----MAMQMQLANADTSVEEESFGPQPHSRLEQCCGINANDVKLLEAGYHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKADKI : 74
MM : -----MAMQMQLASADTSVEEESFGPQPHSRLEQCCGINANDVKLLEAGYHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKADKI : 74
BT : -----MAMQMQLANADTSVEEESFGPQPHSRLEQCCGINANDVKLLEAGFHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKADKI : 74
GG : -----MAMQVQFEASTDTSAEESFGPEPHSRLEQCCGINANDVKLLEAGYHTVESVAHAFAKKKELLNKIGISEAKADKI : 74
XL : -----MAMQAHYQAEAT---EEENFGPQATRLLEQCCGINANDVKLLEDAGFHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKAEKI : 71
DR : -----MRNASRVEVEAEVE-EEENFGPQPVSRLEQSGISSSDIKLEEDGGFHTVEAVAYAFKKKELLNKIGISEAKADKI : 73
CI : -----MSVMQSVSENKEN-IEEENCGPLLINKLEQSGISAGDIKKLKEHGHTVEALAYAFKKKELGKVGKISEAKADKI : 73
SP : -----MAMQMHNAEQEVS---EEFGPLCHSRLEASGISSNDVKLLEAGMHTVESVAYSTKKBELCAVKGISEAKADKI : 70
DM : -----MEKLTNVQAQQEIEEIEEGLPSVTKLIGGSITAKDKLKLQOASLHTVESVANA TKKQLMAIPGIGGGKVEQI : 71
CE : MSAQASRQKSDQEQRAADQALLNAAIEDNAMEQDENFTVLDKLESSGISSGDISLKEAGYHTVESLAFTRRBLRNVKGISDQKAEKI : 90
DD : -----MASRQREEEVDIENEQQQEEEEEEESYLSINKLEGNINAADLKLQOGLNTOAVAFYTKKTLTGKIGISEQKADKL : 84
AT : -----MTTMEQRRNQNAVQQQDDDEETQHGPFVLEQLQAAGIASVDVKLIRDAQLCTVEGVAYTFRKDLQIKIGISEAKVDKI : 77

```

```

SD : QNEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 163
HS : LAEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 164
RN : LAEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 164
MM : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 164
BT : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 164
GG : LAEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 164
XL : LAEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 161
DR : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKAMYIDTEG : 163
CI : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQICHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 163
SP : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 160
DM : LTEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 161
CE : MKEAMKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 180
DD : LAEAAKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 174
AT : VEAASKLV-MGFTTATEFHQRSEIIQITGSKEDKLLGGIETGSITEMFGEFRGKTQLCHTLAVTQCPIDRGGEGKCLYIDTEG : 167

```

```

SD : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMAESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 253
HS : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 254
RN : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 254
MM : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 254
BT : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 254
GG : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 254
XL : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMAESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 251
DR : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMVESRYALLIVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 253
CI : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 253
SP : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 250
DM : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 251
CE : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 270
DD : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 264
AT : TFRPERLLA-VAERYGLSGSDVLDNVAYARAYNTDHQGLLQASAMMSETRYAVIVVDSATAYRDTYSGRGELSAQRCQWQEYLRITLL : 257

```

```

SD : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDSKD- : 338
HS : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 339
RN : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 339
MM : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 339
BT : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 339
GG : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKE- : 339
XL : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 336
DR : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFAADPKKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 338
CI : LADEFGVAVITNQVVAQVDG-AMFADPKKPIGGHIMAHSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 338
SP : LADEFGVAVITNQVVAQVDGA-AMFADPKKPIGGHIMAHSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 335
DM : LADEFGVAVITNQVVAQVDG-AMFADPKKPIGGHIMAHSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 336
CE : LADEFGVAVITNQVVAQVDG-AMFADPKKPIGGHIMAHSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 357
DD : LADEFGVAVITNQVVAQVDG-AMFADPKKPIGGHIMAHSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 351
AT : LADEFGVAVITNQVVAQVDGS-ALFAGPQPKPIGGNIIAHSSTTRLYLRKGRGETRICKIYDSPOLPEAEAMFAINADGVEDAKD- : 342

```

Slika 18. Usporedba primarne strukture proteina Rad51 iz vrste *Suberites domuncula* sa strukturom ortologa kod 13 različitih eukariota. Crno su označene akosuvane kod svih organizama, tamno sivo akosuvane kod većine odabranih vrsta, svijetlo sivo akosuvane kod manjeg broja vrsta. Zvezdicama su označene akosuvane iz Walker A i B motiva, akosuvane u izravnom kontaktu s ATP molekulom, akosuvane iz BRC motiva.

Uz pomoć programa GeneDoc sličnost sekvenci je iskazana u postotcima.

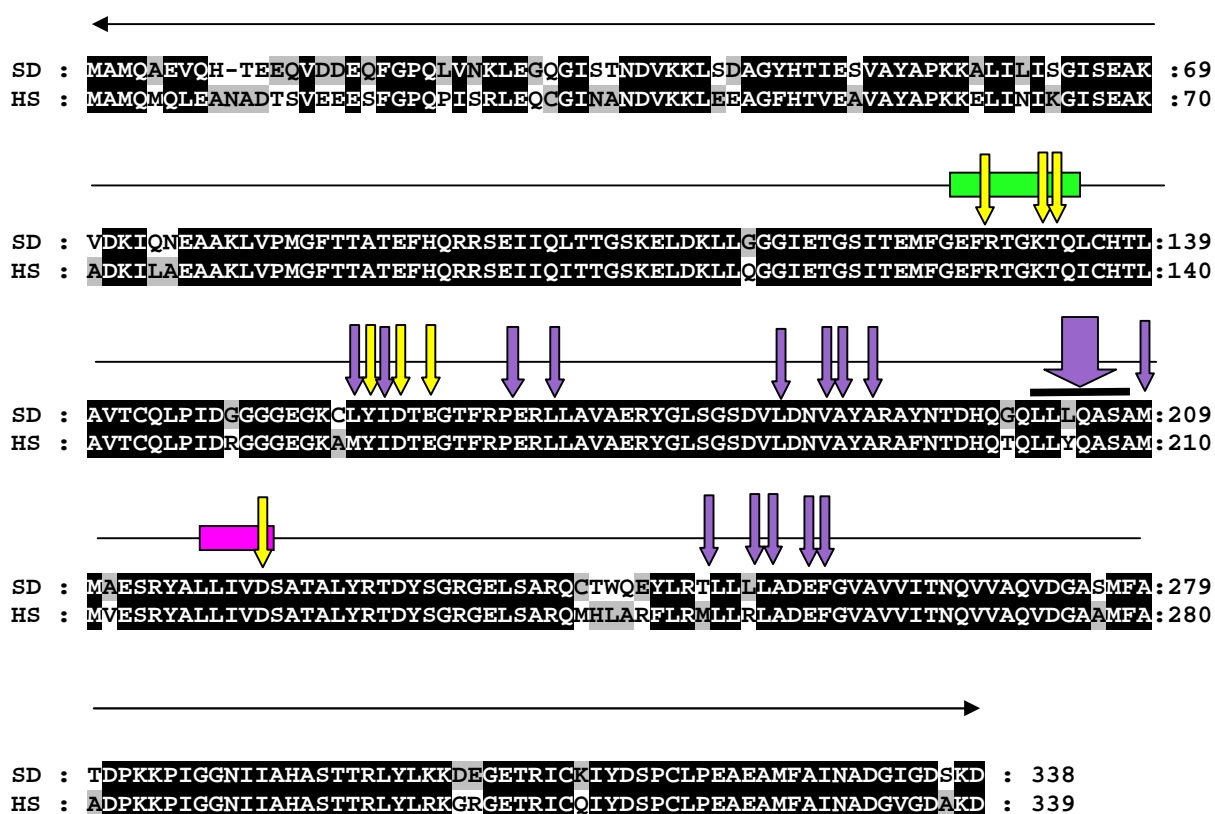
Tablica 6. Udio identičnih i sličnih aminokiselinskih ostataka u proteinu Rad51 iz vrste *Suberites domuncula* usporedbom s 13 različitih eukariotskih organizama. Plavo osjenčani postotci označavaju udio identičnih aminokiselina, a postotci bez ispune označavaju broj sličnih aminokiselina.

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

Sekvenca proteina Rad51 najbliža je sa sekvencama kod organizama *Rattus norvegicus* (RT), *Mus musculus* (MM) i *Xenopus laevis* (XL) s kojima ima 83% identiteta aminokiselina. Udio sličnosti aminokiselina koje se pojavljuju na istom položaju je najveći i za čovjeka *Homo sapiens* (HS) i iznosi 90%. Proteinska sekvenca ovog proteina je u visokom postotku slična sa sekvencama kod svih odabranih kralježnjaka. Sličnost je nešto manja ako se uspoređuje sekvenca ovog proteina sa sekvencama beskralježnjaka kao što su: *Drosophila melanogaster* (DM), *Caenorhabditis elegans* (CE) i *Dyctiostelium discoideum* (DD). Udio identiteta, odnosno sličnosti aminokiselina s *Arabidopsis thaliana* (AT), jedinim predstavnikom biljaka iznosi 64 i 80%.

Proteinska sekvenca proteina Rad51 iz *Suberites domuncula* uspoređena je s proteinskom sekvencom *Homo sapiens* kako bi se proučilo očuvanje aminokiselinskih ostataka koji su važni za funkciju ovog proteina. Vrsta *Homo sapiens* je odabrana kao predstavnik kralježnjaka s kojim je utvrđena visoka homologija ove proteinske sekvence.

Područja Walker A i Walker B motiva dijele sve aminokiseline, imaju 100% homologiju. Aminokiseline na tim položajima su identične. Sedam aminokiselina koje su u direktnom doticaju s ATP- molekulom kad se ona nalazi u aktivnom mjestu također su identične u proteinima kod oba organizma. Razlike se javljaju samo kod BRC motiva koji sudjeluje u povezivanju monomera ovog proteina. Prvih 11 aminokiselina je identično, a zatim je Leu-204, aminokiselina s nepolarnim bočnim ogrankom kod spužve, kod čovjeka zamijenjena polarnom aminokiselinom tirozinom. Slijede četiri aminokiseline su opet identične, a zatim se na mjestu Thr-250 kod čovjeka nalazi metionin, a na mjestu Leu-253 arginin. Tri posljednje aminokiseline koje čine BRC motiv su zatim ponovno identične u proteinima Rad51 iz oba organizma.



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

4.3.2. Rad51D

Izolirana cDNA za gen *rad51D* duga je 960 pb. Njena nukleotidna sekvenca je pomoću programa ExPasy prevedena u proteinsku sekvencu. Na N-kraju te sekvence nalaze se dva AUG kodona koji kodiraju za metionin i označavaju potencijalni početak kodiranja i regije, odnosno kodiraju za start. Prvi start kodon počinje nukleotidom na desetom mjestu, a drugi nukleotidom na četrdesetom mjestu. Stop kodon UGA nalazi se na 883. mjestu nukleotidne sekvence. Usporedbom s proteinskim sekvencama Rad51D kod drugih organizama pretpostavljamo da sinteza Rad51D proteina kod morske spužve *Suberites domuncula* počinje od prvog metionina na N-kraju te stoga protein ima 291 aminokiselinski ostatak, a ne 281 koliko bi bilo u slučaju da translacija kreće od drugog metionina. Kodirajuća DNA je duga 885 nukleotida. Određeni sljedovi nukleotida analizirani su putem www-servisa izravno na internetu pomoću programa BLAST, koji traži moguće homologije s proteinima pohranjenim u bankama podataka. Usporedbom dobivene proteinske sekvence za protein Rad51D kod spužve *Suberites domuncula* s homolognim proteinskim sekvencama kod drugih vrsta, utvrđeno je položaj visoko očuvanih domena. Domena ključna za vezanje i hidrolizu ATP-a sastoji se od dva prostorno odvojena motiva: Walker A motiv koji stupa u kontakt s fosfatnim dijelom ATP molekule i Walker B motiv u čijem sastavu je važna aminokiselina aspartat koja ima ulogu koordinacije Mg^{2+} . Walker A motiv ima slijed (Gly/Ala)XXXXGlyLys(Thr/Ser), gdje X označava bilo koju aminokiselinu, u ovom slučaju Walker A motiv počinje Gly na 108 mjestu i ima slijedeću u primarnu strukturu: Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Gly-Lys-Tre. Walker B motiv građan je od pet aminokiselina Leu-Val-Ile-Ile-Asp, a prva aminokiselina Leu nalazi se na 205 mjestu proteinske sekvence.

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

```

ggcaccgagcatgcaaacgcatgtgaacgcatcatgcataatgaatagtctgtctgaggag
M Q T H V N A S C I M N S L S E E
gtccgtagcaagctgaaggtggcaggtatcagatcagttggttgattacgtatcctgcct
V R S K L K V A G I R S V V D Y V S C P
cctgaaagaatagcctcaaaaactggatttccatataaggaagtcggtgaaatacgcaga
P E R I A S K T G F P Y K E V V E I R R
aagtttctacatcagtttggatgccgccccggttggcgtagcaacctgtggaaagagctt
K F L H Q F G C R P V A A S N L W K E L
tcgtcaacatcagcaatcttaccacaggttgcagaaatctagatgagttattggatgga
S S T S A I L P T G C R N L D E L L D G
gggctcttgaccggtgagctgacagagttgtgtggacctccaggtgctgggaaacacag
G L L T G E L T E L C G P P G A G K T Q
gtatgtctctccgtggcgggcatgttgccatgacaacaagctccactgtagcatatata
V C L S V A G H V A M T T S S T V A Y I
gactgtgctggtagcattttgatgctcaacttgttgaacgaatcgtaacatcacgtttagac
D C A G T F D A Q L V E R I V T S R L D
gaagggcaagagagtggttgagtggtcattgagcaggattcgtgtgttcaatgtgttttca
E G Q E S V E C S L S R I R V F N V F S
atattttatctactctcttttcttatcatctcttcaagatgacatcgtaaatacaggtggat
I F Y L L S F L S S L Q D D I V N Q V D
gcgtattatgaacaccttcatcttgcataattgacctgtgacctctctcatatctccc
A Y Y S N L H L V I I D P V T S L I S P
caccttgggtggacatcagactcacggtcacagtttgatggccaactggctcttggctctg
H L G G H Q T H G H S L M V Q L V L A L
agagtcctggccaatgatcatgcaatagctgtactgtacacaaacaatatggatgatagat
R V L A N D H A I A V L Y T N N M V I D
ttcaacagtggtggtttgaaaccagccctgggcctcacatgggtcacacactccctccaca
F N S G G L K P A L G L T W S H T P S T
cgagtcacgcttggcaccaccctcacagatgagggcgagccccgaaattagctacaatca
R V T L G T T L T D E A S P -
cgaaatcatctaaacaggttgtaggtgtgtccacaacattcaccatcacaagcagtgaggag

```

Slika 20. Usporedan prikaz nukleotidne i proteinske sekvence proteina Rad51D

Zeleno-Walker A motiv, roza-Walker B motiv, plavo-domena za povezivanje podjedinica u kompleksu, podcrtano-aminokiselinski ostatci u izravnoj vezi s ATP molekulom.

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


```
SD : ----MQTHVNASCIMNSLSEEVRSKLVAGIRSVVDYVSCPPERTASKTGFPYKREVVEIRRRKFHQFGCRPVAASNWKELSSSTSAILPTGCRN : 90
HS : -----MGVLRVGLCPGLTEEMTQLLRSHRIKTVVDLVADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS : 88
RN : -----MGMLRAGLCPGLTEEVQLLRGRKIKTVADLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS : 88
MM : -----MGMLRAGLCPGLTEETVQLLRGRKIKTVADLAAADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS : 88
BT : -----MGVLRAGLCPGLTQDMVQLLQSRGIKTVVDLVADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKTSTAILSTGIGS : 88
GG : -----MVLRLAGLCPGLTEEMTQLLRANNIRTVVDFVSSDLEDAQSCSLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTGNPS : 88
XL : -----MVLRLAGLCPGLSTGIVAALKANNVKTVIDLVADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTANRK : 88
DR : -----MVLRLAGLCPGLTQDMVQLLQSRGIKTVVDLVADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTGNPS : 88
CI : -----MPSLLAGLCPGLTQDMVQLLQSRGIKTVVDLVADLEEVAQKCGLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTGNPS : 88
SP : -----MVLRLAGLCPGLTEEMTQLLRANNIRTVVDFVSSDLEDAQSCSLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTGNPS : 51
DM : -----MGSHQLHFAVFGSCGFADTLVEISGPGNSGKSLVQLVAHCLVYKFGGR-QWSVILINLSHKINRESLAKSIRMEKAYSVE--- : 84
CE : -----MVLRLAGLCPGLTEEMTQLLRANNIRTVVDFVSSDLEDAQSCSLSYKALVALRRVLLAQFSAFPVNGADLYEELKSSTAILPTGNPS : 33
DD : MEEESISGLEVRFYQTCQLSEDNVIFKFNENGYPMIDLILFSDAYQIQRNTSIPITVTLIQNQLRQFSVPIINGYQHVLVDFKFKTHYSSEGIKL : 95
AT : -----MFVLMFAFLKIAVED-----FLIHDLYELTAFSQRQTNADRLREGTIIILSLIERQCRPLVNLKILLEDLHRNKHTLSTGDK : 77
```

```
SD : LDDELLDG-GLLTGELTETLCPGPGAGKTQVCLSVAGHVAMTTSSTVAYIDCAGTFDAQLVERIVTSRLDE-----G : 159
HS : LDKLLDA-GLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCMAANVAHGLQONVLYVDSNGGLTASRLQLLQARTQ-----D : 156
RN : LDKLLDA-GLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQONVLYVDSNGGMTASRLQLLQARTQ-----D : 156
MM : LDKLLDA-GLYTGEVTEIVGGPGSGKTQVCLCVAANVAHSLQONVLYVDSNGGMTASRLQLLQARTQ-----D : 156
BT : LDKLLDA-GLYTGEVTEIVGAPGSGKTQVCLCVAHVAHGLQONVLYVDSNGGLTASRLQLLQARTQ-----D : 156
GG : LDKLLDA-GLYTGEVTEIVGAPGSGKTQVCLCVAASVSLGRQHVFFLDSGGFTASRYQMLQARVE-----D : 156
XL : LDKLLDS-GLYTGEVTEIAGAAGSGKTQMCQSIIVNAVAYSLKQTVLYVDITGGTLASRLQLVQSRTE-----N : 156
DR : LDKLLDS-GLYTGEVTEITGSPGSGKTQVCFVAVNISHQLKQTVVYIDTKGGMCANRLQLMLQTKTP-----N : 156
CI : LDKLLDA-GIYTGEVTEIVGPPSSGKTQLCETFVAVNVAASFDQNVYIDTAGGFSAVRVGEIFKFRFS-----S : 156
SP : LDKLLDG-GVYTSLETEIVGQAAVGKTFCLTLASCVAVSSEQNVLFIDINGGFHASRPHDIIAHKST-----S : 119
DM : --EVIAAKCPTEQLAETACECMSRVRFVNCFANDDVSTSLIDARYAINDPGIQLVADTSL----- : 145
CE : LDKVLEL--HPKCYEIDGDLGVGKTIQCYFIAKFLQTKKTAKMGWIGATPLRTHLHLHEHFGN----- : 98
DD : LDKLLGNGFTSGEIVYELVGNVSCGKTIQSMCCSLNSQOYNSNIYIDSNSNFSPPRLIEIFKSNYLKQKQKQKQKQKQKQKQKQENNDKIE : 190
AT : TDSLILQG-GFREQLTEIVGPPSSGKTQFCMQAASVAENHLGRVLYLDTGNFSARRIAQFICSSSD----- : 144
```

```
SD : QESVECSIRSRIRVFNVSIFYLLSFLSSIQDDVNVQVDAY-----YSNDHLVITDPVTSLSIFHLG-CHQTHCHSLMVQLVLAIRVLANDHAI : 246
HS : EEEQAEAFQRIQVHAFDIFQMLDVLQELRGTVAQVVTGS-----SGTVKVVVDSVTAVVSPLLQ-CQOREGLALMMQLARELKTLLARDLGM : 243
RN : EEQASAFQRIQVHVSFDIFQMLDMLQDLRGTAQQATAS-----SGTVKVVVDSVTAVVAPLLQ-CQOREGLALMMQLARELKTLLARDLGM : 243
MM : EEQASAFQRIQVRSFDIFRMLDMLQDLRGTAQQEATS-----SGAVKVVVDSVTAVVAPLLQ-CQOREGLALMMQLARELKTLLARDLGM : 243
BT : EEEQAGAFQRIQVRAFDIFQMLDVLQDLRGAVSQVSSS-----SGTLKVVVDSVAVVAPLLQ-CQOREGLALMMQLARELKTLLARDLGM : 243
GG : KEEQLEAFQRIQVVRMFDIYEMLRALHEVRDCLSQVVESS-----AGPTKAVLDSVSAVLSPLLQ-CQOREGLALMMQLARELKTLLAKFSV : 243
XL : EDEQVASHQRIEVRVFDIYKLLDAFQDLRHKLSQQLLS-----GEPRLVITDSVCAVIYPLMG-CKHTEGMAIMMQLARELQTMADHYHL : 243
DR : EQEQMEAFQRIQVFRVDFVFSLLACLQNLRLSTGLQKMSVGF-----GGSVKALMDSVSAVLSPLLQ-CKQNEGMSLLMQVAGELKMIKDFNI : 243
CI : HN-TSATSRIRSRVSELRRETLDLVRRKMSAQDETF-----FSSLKVVVDSVTSLLSTVLYNGTFVEMASLQSIGROLNALAKDFAL : 243
SP : EKITSAPHKVCHATTFLYDLDLLESIKASIDSEAF-----YSSLTKVVVDSVTAVVAPLLQ-CKHSE-----GEHFIV : 191
DM : --EFYWDDEPKIAKRMSMYRHYRLQARLEKCKDAIVCG-----MYTVESAFLENRFGENLEAG--IKYHVRMOKIQNQILLNGPLSFSN : 229
CE : -QTNEDIDRIVCKRVEKIAELQDSITRELDITN-----IQLVIVENDAIILHDTVY--HKEMGRSMQSDVVERIR-KLTKLEI : 173
DD : QDKILKIDRIKVFNCFDSSITLLELSTIDSTLSIISDEIPTFENQFYKGRMVDSDSITGLLAPIIG-CKQTQGHYTMMSRLIKYIADTYQI : 284
AT : ATLGQKVMDSRIKCHTVYDIYTLFDTLQDEITLRQMNVN-----ESRIRLVVDSVTSLLSTVILG-ESGSQLRALMVAIGYLLKLAHEHSI : 231
```

```
SD : AVLVYTNMVIDFNSSGGLK-----PALGLTWSHTPSTRVLTGTT-----LTDEASP----- : 291
HS : AVVVYTNHTRDRDSGRLK-----PALGRSWSFVPSTRILLDTIEGAGASG-GRRMACLAKSRRQPTGFQEMVDIGTWGTSEQSATLQGDQT- : 328
RN : AVVVYTNHTRDRDSRRFK-----PALGRSWSFVPSTRILLDTIEFEGAGTLGRSQRVRLIKSPRQPTGLQEVIDIGTLGTEEQSPPELPGKQT- : 329
MM : AVVVYTNHTRDWGRRFK-----PALGRSWSFVPSTRILLDVTEGAGTLGSSQRTVCLTKSPRQPTGLQEMIDIGTLGTEEQSPPELPGKQT- : 329
BT : AVLVYTNHTRDRDSGQLK-----PALGRSWSFVPSTRILLDSTQSSGSLG-SWRVCLTKSPRLPTGCQETVDLGSGLGTPAFQGDHKGH--- : 326
GG : AVVVYTNQTRDSSGTGALK-----SALGRSWSFVPSTRILLQGRAVWEEGAAPHTACLAKSPRQPTGMQVQLDIGSDAVQEQRPVPTPT--- : 327
XL : AILVYTNHTRDKG-AASIR-----PALGRSWSFVPSTRILLTQNV-----ELNGLCTVSLVKSQRQPTNLKVDVEIGTCGLEENNPSSSDTS- : 324
DR : AVLVYTNHTRDKG-NGQVK-----AGLGLSWSHVRTRVLLQQRVEN--EESISLRATLTKSSRQACHMTKEFDLCHWSEERTTSISGKRKLD : 327
CI : AVVITNDMVTGPDQKTGFQSRKPALGRVWTFVPSVVRVQIQPHIAPCLHVGVNKILARLTKSTRCGYRATSCVITSSGIESEKPS----- : 328
SP : QGPVQSLSFMTNDKNH-----QPS----- : 208
DM : GHLDTNTSKEITEALLT-----QPS----- : 250
CE : TVILYTNHTHWRGYPAPA-----LGAFNWSQINNRFFIEKRN-----DSDIRIVSAMKGEQDDGMNRIEFKIGDRGLKAVE----- : 245
DD : IFILYTNHTVGGNSFDNKA-----ALGEAWSMVPHQMLNHQYN--DDENEERSIYIEKSTRLPVSIIFIINLYWLF----- : 354
AT : AILVYTNHTVGGGEGGKT---KPALGETWKSIPHVRLSIRSRDHK-----NSNCTISILKHTSLPSGQAARTLTKRENQOQCP----- : 304
```

Slika 21. Usporedba primarne strukture proteina Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* sa strukturom njegovih ortologa kod 13 različitih eukariota. Crno su označene akosuvane kod svih organizama, tamno sivo akosuvane kod većine odabranih vrsta, svijetlo sivo akosuvane kod manjeg broja vrsta. Zvezdicama su označeni akosuvani Walker A i B motiva, akosuvani izravnom kontaktu s ATP molekulom i akosuvani iz domene za povezivanje u BCDX2 kompleks.

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

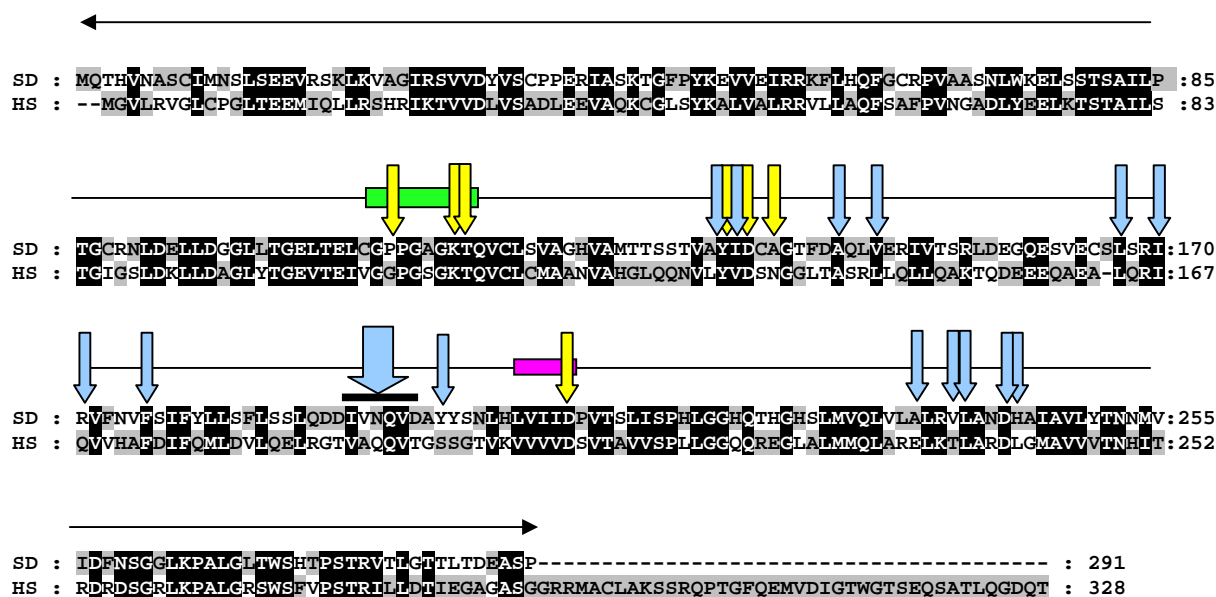
Tablica 7. Udio sličnih i identičnih aminokiselinskih ostataka u proteinu Rad51D iz vrste *Suberites domuncula* usporedbom s 13 različitih eukariotskih organizama. Plavo osjenjani postotci označavaju udio identičnih aminokiselina, a postotci bez ispune označavaju sličnih aminokiselina.

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

Vidimo kako protein Rad51D kod spužve ima ve u sli nost sa sekvencama odabranih kralježnjaka nego beskralježnjaka. Udio identi nih aminokiselina najve i je izme u spužve i goveda *Bos taurus* (BT), a iznosi 36% aminokiselina, zatim slijedi ovjek *Homo sapiens* (HS) koji dijeli 35% identi nih aminokiselina s ovom spužvom. Udio sli nih aminokiselina je u oba slu aja jednak i iznosi 53% od ukupnog broja aminokiselina. Najmanja podudarnost sekvenci uo ena je s vinskom mušicom *Drosophila melanogaster* (DM) i obli em *Caenorhabditis elegans* (CE). U slu aju vinske mušice udio identi nih aminokiselinskih ostataka je 9%, a udio sli nih 22%, kod *C. elegans* ti udjeli iznose 15% odnosno 26%.

Promatraju i usporedni prikaz proteinske sekvence Rad51D kod spužve i sekvenci ovog proteina kod razli itih kralježnjaka, s kojima ona pokazuje najve u sli nost, uo ava se da je o uvanost slijeda aminokiselina na N-terminalnom kraju i u središnjem dijelu ve a nego na C-terminalnom kraju. C-terminalni kraj kod spužvi je i kra i za nekih 25-30 aminokiselina u odnosu na slijed kod kralježnjaka.

Proteinska sekvenca za protein Rad51D morske spužve *Suberites domuncula* uspore ena je samo s proteinskom sekvencom kod ovjeka da bi utvrdili koliko su o uvani položaji aminokiselina koje su važne za funkciju samog proteina. U Walker B motivu svih pet aminokiselina je identi no i kod spužve i ovjeka. Od osam aminokiselinskih ostataka koji su dio Walker A motiva razlikuju se aminokiselina na položaju 108, prolin kod spužve je kod ovjeka zamijenjen aminokiselinom druk ijeg karaktera, glicinom, i alanin na položaju 112 je zamijenjen serinom. Ostali aminokiselinski ostatci su identi ne aminokiseline. Izmijenjena aminokiselina na položaju 108 sudjeluje i u domeni za vezanje ATP-a. To je u ovom slu aju jedina izmijenjena aminokiselina, ostalih šest je identi no u oba organizma. Kod domene koja sudjeluje u povezivanju proteina Rad51D u BCDX2 kompleks od dvadeset aminokiselina devet je zamijenjeno aminokiselinom druga ijeg karaktera: Ala-135 zamijenjen je s Leu, Arg-174 s Gln, Val-193 s Ala, Asn-194 s Gln, Asp-197 s Thr, Tyr-199 sa Ser, Ala-236 s Glu, Val-239 s Ile, His-244 s Leu.



Slika 22. Poravnate proteinske sekvence Rad51D iz morske spužve *Suberites domuncula* i ovjeka *Homo sapiens*. Crno su osjenjane identične i slične aminokiseline. Zeleni pravokutnik se nalazi iznad aminokiselina koje sačinjavaju Walker A motiv, a roza pravokutnik iznad Walker B motiva. Žutim strelicama su označene aminokiseline koje su u izravnom kontaktu s molekulom ATP-a. Plavim strelicama su označene aminokiseline koje su dio motiva za povezivanje Rad51D u BCDX kompleks (šest uzastopnih aminokiselina označene su debljom strelicom i dodatno označene crnom crtom).

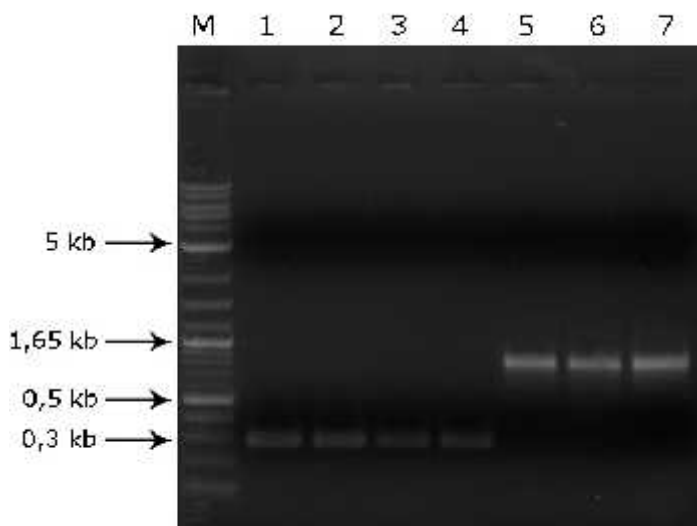
4.4. Određivanje nukleotidnog slijeda i položaja introna u genima *rad51* i *rad51D*

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

Dobiveni fragmenti razdvojeni su u jedan postotnom agaroznom gelu.

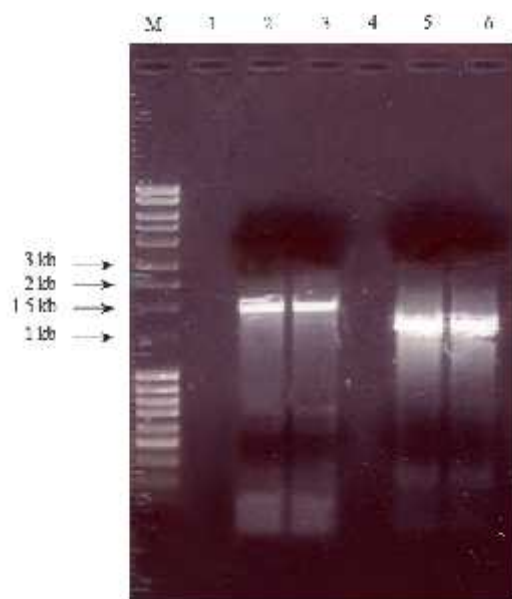
Gen *rad51* je umnožen pomoću primera rd2, rd3, rd4 i rdrv.

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



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

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

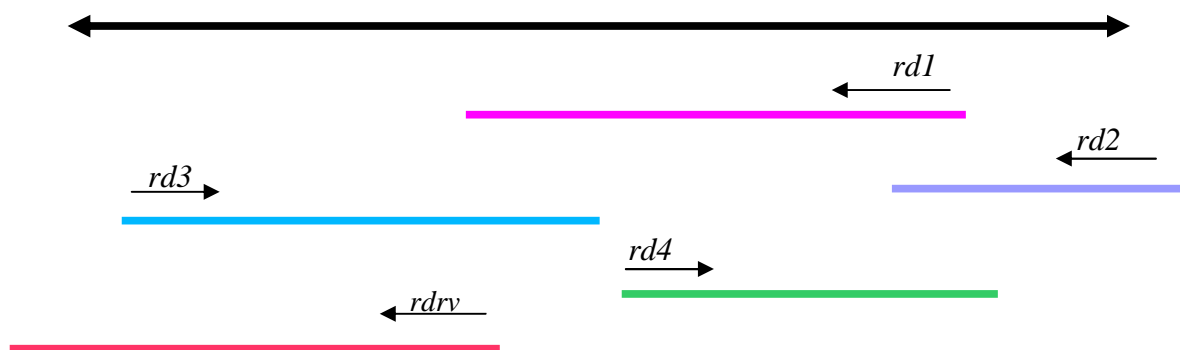


Slika 24. Umnažanje *rad51D* na genomske DNA. U liniji M je marker u rasponu 0,1 do 10 kb. U liniji 2 i 3 su fragmenti nastali umnažanjem s po etnicama fw1 i rv, u linijama 5 i 6 su fragmenti nastali umnažanjem s po etnicama fw2 i rv.

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

- Gen *rad51*

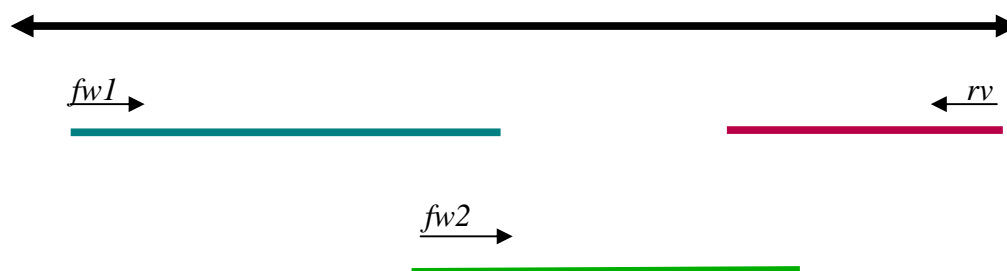
Nukleotidna sekvenca gena *rad51* određena je sekvenciranjem fragmenata dobivenih PCR reakcijama. Za sekvenciranje cjelovitog gena korišteno je pet različitih po etnicima: rd1, rd2, rd3, rd4 i rdv. Ove specifične po etnice su osmišljavane u nekoliko navrata nakon što bi sekvenciranjem otkrili novi segment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



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

- Gen *rad51D*

Uz pomoć triju po etnicima, fw1, fw2 i rv, određena je cijela nukleotidna sekvenca gena *rad51D*.



Slika 26. Shematski prikaz pretraživanja gena *rad51D*. Plavo je označen dio gena sekvenciran pomoću po etnice fw1, zeleno dio gena sekvenciran po etnicom fw2, a crveno po etnicom rv.

- Položaj i faza introna kod gena *rad51*

S obzirom da u cDNA biblioteci nije pronađen 5' kraj gena *rad51*, usporedba genomske DNA i translirane regije koja je pohranjena u biblioteci nije bila dovoljna za otkrivanje položaja i faze svih introna. Introni na 5' kraju su određeni usporedbom nukleotidne sekvence dobivene sekvenciranjem, sa sekvencama koje su pohranjene u bankama podataka na internetu. Na taj način su regije koje nemaju homologiju sa sekvencama proteina Rad51 iz drugih raznih organizama i regije koje pokazuju visok stupanj homologije, za koje je onda zaključeno da su kodirajuća DNA. *rad51* ima pet introna, prvi intron je duljine 67 pb i to je najkraći intron u ovom genu. Drugi ima 166 pb, treći 140 pb, a četvrti 103 pb. Posljednji peti intron je najduži i ima 316 pb.

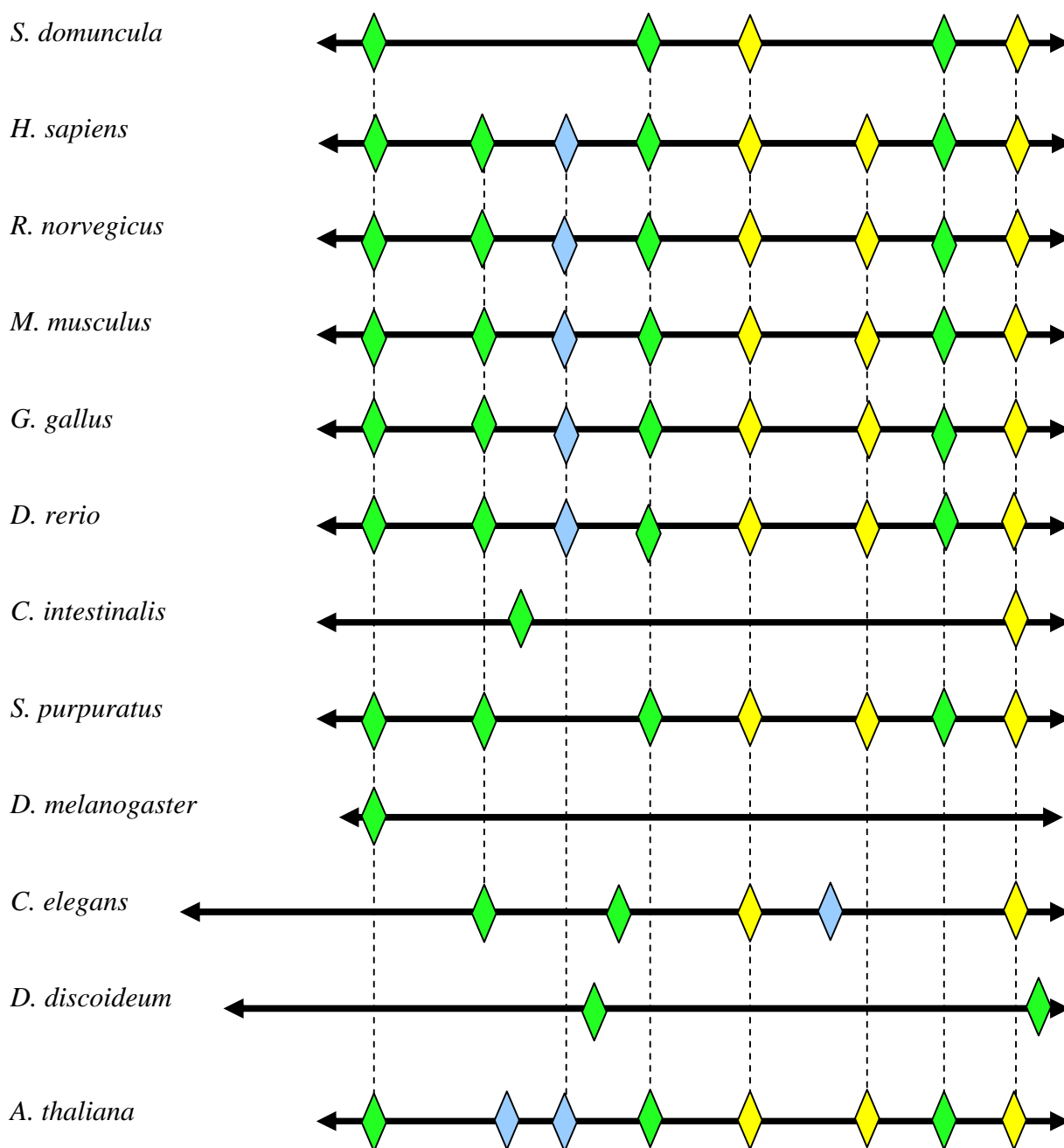
```

ATGGCTATGCAAGCAGAAGTACAGCATAACAGAAGAGCAAGTTGACGACGAACAATTTGGT
CCACAGCTTGTCAACAAATTAGAA GTGAGTATTCAAGATATCCAGTACAAAAGTAGCTAG
GTGTATGCTAACTAATTCCTCTTGCATTCAG GGACAGGGTATCAGTACCAATGATGTAAA
GAACTAAGTGATGCAGGCTACCACACTATAGAGTCAGTGGCCTATGCCCCAAGAAGGC
TTCATACTCATCAAAGGAATAAGTGAAGCTAAAGTAGACAAGATACAGAATGAAGCTGC
CAAGCTTGTGCCTATGGGATTCACCACAGCAACGGAGTTTCATCAACGTCGCTCAGAGAT
TATCCAACCTACAACAGGCTCAAAAGAGCTCGATAAACTTTTAGGGGGTGGTATAGAGAC
GGGATCCATTACAGAAATGTTCCGAGAATTAAGAAGTGGGAAAAGACTCAACTTTGTCCAC
CACACTTGCTGTTACTTGTTCAG GTGAGCTCATGTTTGAAAAATTGATCTATCCAATCTCTG
GCTAAATTAGGTCAATGGTGTGTATTTT CAGAATGATAGTAAAATCGTAGTAGTATGGCTAG
AGTGTCTAATCAAGCAAGCCTTCAATGGTGACTAAGATGTACCAAGGTCTTGTGTGTGT
CTCAG TTACCAATAGATGGAGGAGGTGGTGAGGGAAAGTGTCTGTACATTGACACAGAGGG
CACATTAGAGACTGCTAGCTGTAGCTGAAAG GTAGGGCCATTATTTTCGTTTG
TGAGAATTTTCAGTGTAGTTATCTTTTACAGTACTGTATATCATGTGTAGCTGTACTCAGTT
CTATGACGCTAGGTCAACTGCCTGTGCGTCAAGGTACTATACTCTGTTACACATAG GTAT
GGTTTGTCTGGATCAGATGTGTTGGATAATGTAGCATATGCTCGAGCCTACAACACTGACC
ATCAAGGTCAGCTACTGTTGCAAGCGTCAGCCATGATGGCAGAATCAAGATATGCTCTACT
CATCGTCGACAGAGACACGGCATTATATCGCACAGACTACTCTGGCAGAGGTGAGCTGAGT
GCGAGAACAATGCACTTGGCAAGAATATCTCAGAAGTTTGTCTACTGGCAGACGAG GTT
GGTTGATAATCATTGGTATTGTGTGTGTGTTATGTAGTCAATATAAGAACAGTGTGATAGT
GTTTATGGTATTAGTATATACCCTCTATCTATTGTATAG TTTGGGGTTGCCGTGGTGATAA
CTAATCAGGTAGTGGCACAAGTGGATGGGCATCAATGTTTGTACTGACCCCAAGAAACC
AATTGGAGGGAACATTATTGCACATGCGTCTACTACAAG GTTGGTATTACATTGATTGGAA
TTAGTACAATACATGTTACATGTGTAGAAACCTCAATAGTGACAGTGGTATTGTCTTACAA
GTGTTGTTTGTCTTACTTGTGTGTTATTTTCATGTGAGCCGAAATAGCTCAGTTGGGAGAGC
GTTAGACTGAAGATCTAAAGGTCCCTGGTTCGATCCCGGGTTTCGGCAAGTTTTTTTGTTA
TTTTTTTCTCTCCATTTTATTAGAATGAGATTTCAATACAAAAGATTCCACCTCTTTTCCA
ATATTTGAAAAGTTGCTCATTATTAGTTATTTTTGGGTAAATTGTACCTCCAG ATTATATCTCA
AAAAGGACGAGGGGAGACCAGAATATGTAAGATATATGATTCTCCCTGTTTGCCTGAAGC
AGAGGCAATGTTTGTCTATCAATGCTGATGGTATTGGAGACTCCAAGGACTAA

```

Slika 27. Gen *rad51*. Introni su označeni plavom bojom.

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



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

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

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

- Položaj i faza introna kod gena *rad51D*

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

```

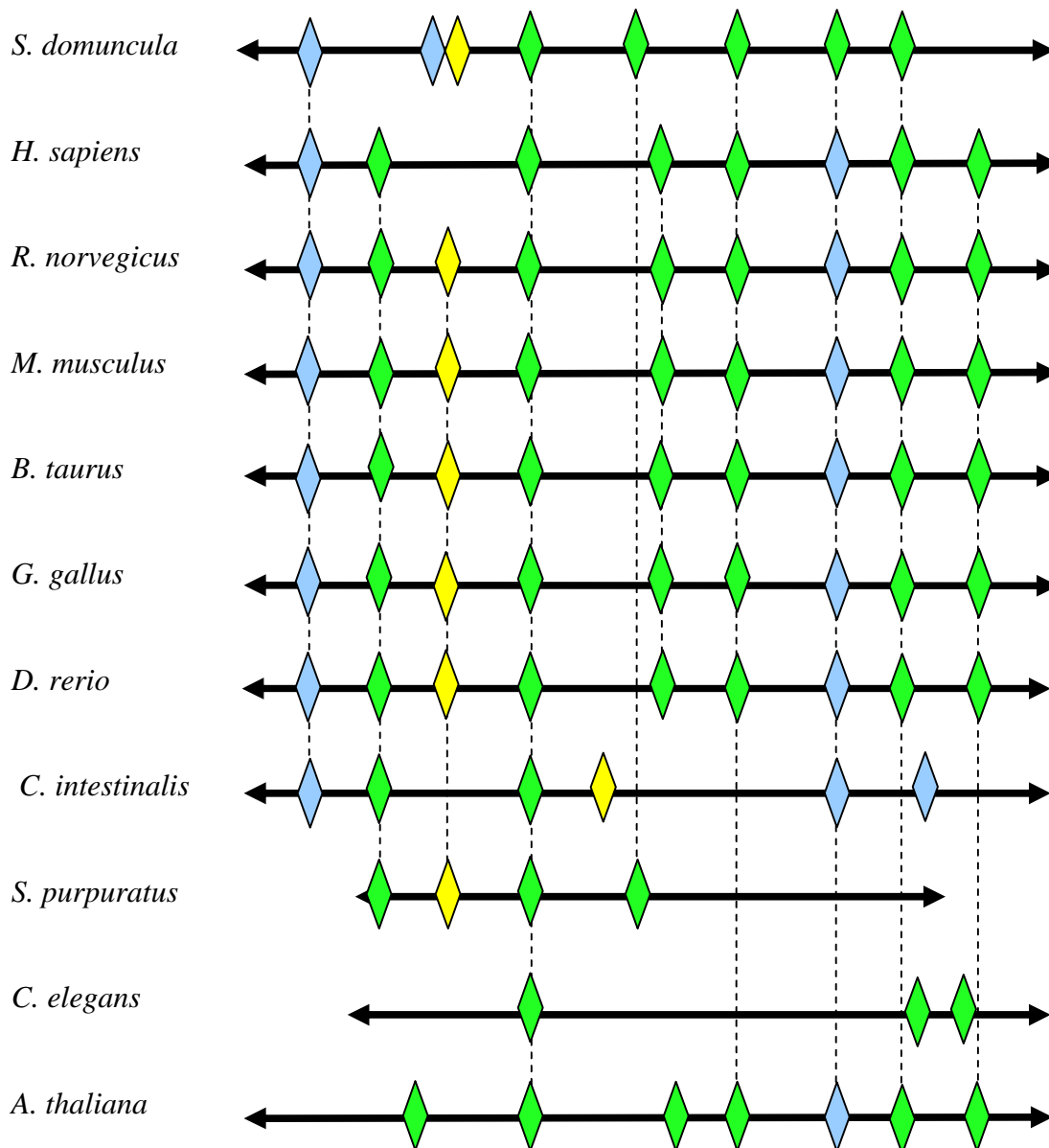
ATGCAAACGCATGTGAACGCATCATGCATAATGAATAGTCTGTCTGAGGAGGTCCGTAGCAAGCT
GAAGGTGGCAGGTATCAGATCAGGTAGTTTATAGACTGAGAACTCTGAAGACAGACATCAGAGGA
CATTGACCCTTGGGAGACTATGCATACGACTTAGACTAAAATCCCTTCCCCTCTCAGTTGTTGATT
ACGTATCCTGCCCCTCCTGAAAGAATAGCCTCAAAAACCTGGATTTCCATATAAGGAAGTCGTTGAA
ATACGCAGAAAGTTTCTACATCAGTTTGGATGCCGCCCGTTGCCGCTAGCAACCTGTGGAAAGA
GCTTTCGTCAACATCAGCAATCTTACCAACAGGTAAAATTTCCACACAATTTTCGATGATGTCGT
GACTATTTTCGTCCTTAGAGTGTACTATCCTCTTACACTTTTTCCTCATGTAGTTGCAGAAAAGTG
AGTTCGATGTACCCAGTTATAACACCTTTCCCTATCTATTTTATTGCTCCTGTATAGTCTAGATGA
GTTATTGGATGGAGGGCTCTTGACCGGTGAGCTGACAGAGTTGTGTGGACCTCCAGGTGCTGGGA
AAACACAGGTAGAAGAAATTTGGCAGAAATTTGCAATTTTGTAAATCTTTCTTCAGGTATGTC
TCTCCGTGGCGGGCCATGTTGCCATGACAACAAGCTCCACTGTAGCATATATAGACTGTGCTGGT
ACATTTGATGCTCAACTTGTGTAACGAATCGTAACATCACGTTTAGACGAAGGGCAAGAGGTAGT
GATGTTACTTGTATTATAGAACCATTTGATCTTCAATTATCCTCACAGAGTGTGAGTGTTCAT
TGAGCAGGATTCGTGTGTTCAATGTGTTTTCAATATTTTATCTACTCTCTCTTATCATCTCTT
CAAGATGACATCGTAAATCAGGCAGGTCAAAGGTCAAACACACGAACAAATGACTGATTATGTCT
TTATGCTTGTAGGTGGATGCGTATTATAGCAACCTTCATCTTGTGCATAATTGACCCTGTGACCTC
TCTCATATCTCCCCACCTTGGTGGACATCAGACTCACGTGAGCCTTGTGTACATAAAGTTAGGAT
ACTTGTTCATGAAATTAGGATACTTGTACATGAAGTTAGGATACTGTTAATTAGGGTAAATGATC
GAGAGTTTAGGATACTTGTACGTGAGGTTACATTATGAGGTTAGGATATTTGTACGTGAGATAACC
CGACAGATAACAACCTTAGTGATTTTTTTTTTTGACAGGGTCACAGTTTGATGGTCCAACCTGGTCT
TGGCTCTGAGAGTCTGGCCAATGATCATGCAATAGCTGTACTGGTGTGTGATAAACAACCGGT
GTGTGTGTGTTTGTATTGGATCAAACCTCACATTAGTACACCACATCATGGATTGCATGAGTTTGA
CAACCTTTCACAAGTATTGCATAATTATGACATTACTCTGCAGTACACAAACAATATGGTGATAG
ATTTCAACAGTGGTGGTTTGAACCAGCCCTGGGCCTCACATGGTCCACACTCCCTCCACACGA
GTCACGCTTGGCACCACCCTCACAGATGAGGCGAGCCCCCTGA

```

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

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

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



Slika 30. Usporedba pozicije i faze introna gena *rad51D*. Položaj introna označen je rombovima. Boja označava fazu. Zeleno-faza 0, plavo-faza 1, žuto-faza 2. Horizontalne linije povezuju introne s identičnim položajem.

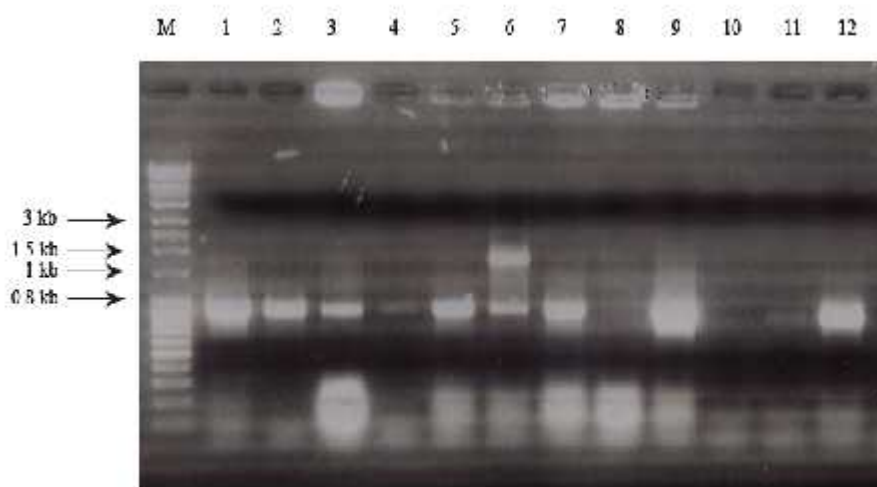
Određene su faze introna, odnosno njihov položaj u odnosu na kodon. Nažalost za vrste *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* i *Dyctiostelium discoideum* takvi podaci nisu

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

4.5. Stvaranje rekombinantne DNA i ekspresija gena za protein Rad51D

Pomo u specifi no dizajniranih po etnica s ugra enim restrikcijskim mjestima za enzime *Bam* HI i *Nde* I, PCR reakcijom, je umnožen gen *rad51D*. Plazmid pET15b i umnoženi fragment su zatim razgra ni prethodno navedenim enzimima. Osmišljavanje po etnica i sama metoda objašnjeni su u poglavlju 3.2.6.1. Razgradnja DNA restrikcijskim endonukleazama. Produkte razgradnje smo razdvojili elektroforezom u jedan postotnom gelu agaroze, a željene fragmente izrezali iz gela i pro istili pomo u paketa *QIAquick Gel Extraction Kit*.

U reakcijskoj smjesi s DNA-ligazom faga T4 gen za protein Rad51D ugra en je u ekspresijski vektor pET15b. Ligacijsku smjesu smo pomiješali s kompetentnim *E. coli* stanicama soja BL21 i transformirali elektroporacijom. Smjesa je zatim nasa ena na selektivne plo e s ampicilinom i ostavljena preko no i na 37°C. Na plo ama je naraslo stotinjak kolonija.



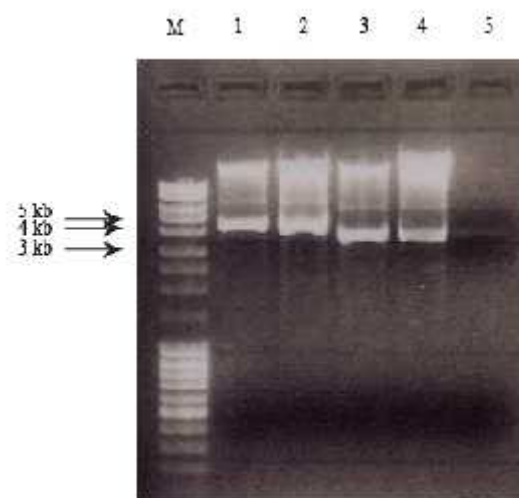
Slika 31. Kolonijski PCR na 12 kolonija *E. coli*, soj BL21, transformirane plazmidom pET 15b s ugra enim cDNA za protein Rad51D. U liniji M je marker raspona 0,1-1 kb. U linijama 1-12 fragmenti PCR reakcija na 12 razli itih kolonija.

Odabranih 12 klonova provjerili smo na dva načina: pomoću kolonijalnog PCR-a, a zatim i izolacijom plazmidne DNA i određivanjem njene sekvence. Rezultati su provjereni u agaroznom gelu. U uzorcima 1-7 dobiveni su fragmenti duljine 700 pb a u uzorcima devet, jedanaest i dvanaest su dobiveni nešto kraći fragmenti, veličine oko 600 pb. U uzorcima osam i deset utvrđeno je da te kolonije sadrže plazmid u koji se nije ugradio željena sekvenca gena *rad51D* (Slika 30).

Kolonije jedan, dva, devet i dvanaest, kod kojih je uočena najveća koncentracija plazmida, su odabrane za daljnju provjeru ugradnje gena *rad51D* u ekspresijski vektor pET15b.

Plazmidna DNA izolirana je pomoću komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep*.

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

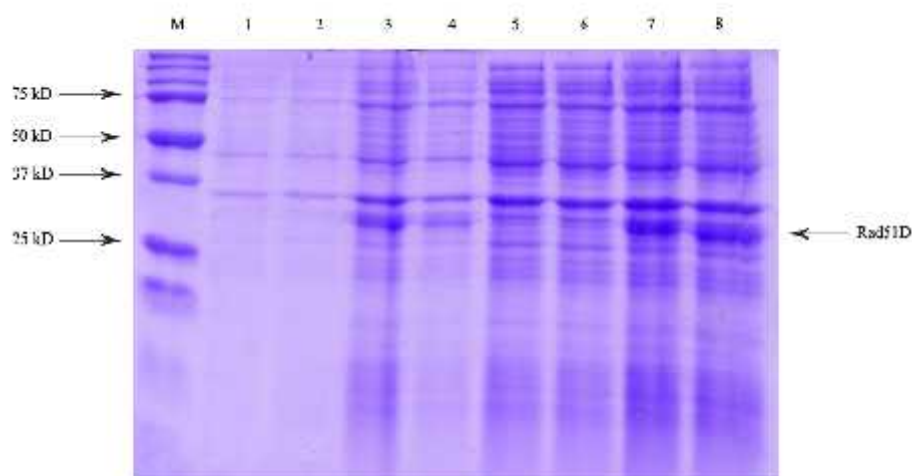


Slika 32. Plazmidna DNA izolirana pomoću komercijalnog paketa *QIAprep Spin Miniprep*. U laniji M je marker raspona 0,1-1 kb, u lanijama 1-4 su rezultati izolacije iz četiri različita soja, u laniji 5 je pozitivna kontrola-plazmid bez ugrađenog gena *rad51D*.

Točnost sekvence *rad51D* klonirane u pET15b provjerena je određivanjem primarnog slijeda nukleotida na uređaju *Abi-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer*. Rezultat sekvenciranja pokazao je kako je slijed za protein Rad51D ugrađen u ekspresijski vektor točan.

Za dobivanje većih količina proteina uzgojene su prekonone kulture transformiranih BL21 stanica na 37°C. Prvo je provedena indukcija na 10 mL LB medija da bi provjerili da li dolazi do ekspresije proteina. 100 µL prekonone kulture razrijeđeno je u 10 mL LB

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

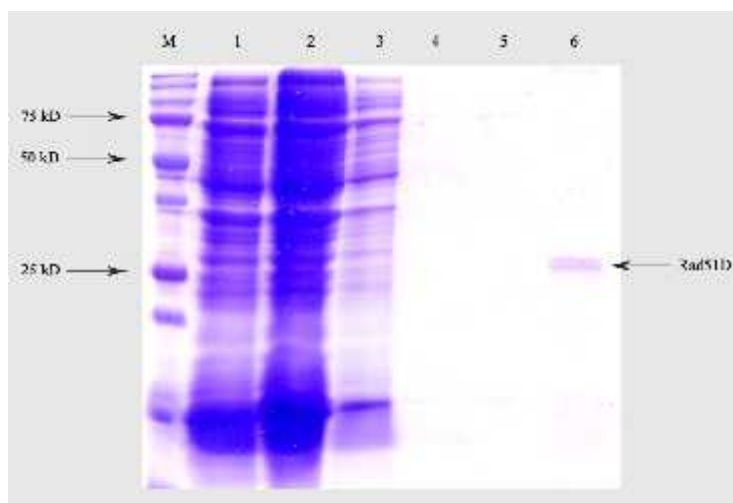


Slika 33. Elektroforetska analiza u poliakrilamidnom gelu proteinskih ekstrakata gena *rad51D* u stanicama *E.coli* BL21. U liniji M je proteinski biljeg širokog raspona, u liniji 1 i 2 su proteinski ekstrakti prije indukcije (1 μ L uzorka), u linijama 3 i 4 proteinski ekstrakti nakon indukcije (1 μ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

Nakon što je utvrđeno da dolazi do ekspresije željenog proteina napravljena je indukcija u 250 mL LB da bi smo dobili što veći u količinu proteina. 10 mL prekone kulture uzgajane na 37°C pomiješano je s 250 mL LB i 250 μ L ampicilina. Kada je dostignuta gustoća koja odgovara apsorpciji OD₆₀₀=0,7 potaknuta je ekspresija rekombinantnog proteina dodavanjem 0,8 M IPTG-a. Nakon dva sata sinteza je zaustavljena stavljanjem stanica na led. Suspenzija je centrifugirana, a dobiveni talog liziran sonikacijom. Supernatant u kojem se nalaze stanični proteini je zatim pročišćen na afinitetnoj koloni

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

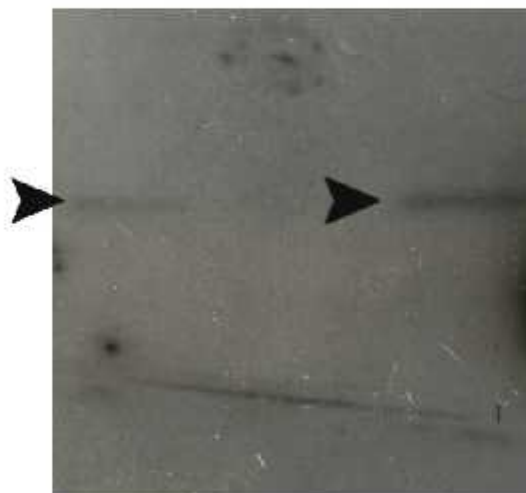
Vrpca koja se nalazi malo iznad 25 kD, u uzorku šest, odgovara pretpostavljenoj veli ini Rad51D. Koncentracija proteina je oko 50 ng što je premalo za bilo kakva daljnja istraživanja aktivnosti i funkcije.



Slika 34. Elektroforetska analiza u poliakrilamidnom gelu proteinskih ekstrakata nakon ekspresije gena *rad51D*, te nakon pro iš avanja na koloni. U liniji M je proteinski biljeg širokog raspona, u liniji 1 je proteinski ekstrakt prije pro iš avanja na koloni, u liniji 2 je proteinski ekstrakt koji se nije vezao na kolonu, u liniji 3 je sadržaj nespecifi no vezanih proteina u puferu nakon ispiranja kolone, u liniji 4 je sadržaj proteina nakon drugog ispiranja, u linijama 5 i 6 je sadržaj specifi no vezanih proteina.

4.6. Western analiza proteina

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



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

5. RASPRAVA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Homologija ortologa iz ova dva organizma, ako promotrimo samo oboje, uočavamo sličnost aminokiselinskih ostataka u domenama važnim za funkciju, nešto je veća, a razlika je manja kod proteina Rad51D. Ako promotrimo cjelokupnu sekvencu proteina Rad51 iz *S. domuncula* i *H. sapiens*, uočavamo kako imaju 90% sličnih aminokiselina, dok proteini Rad51D pokazuju 53% sličnosti. Udio sličnih aminokiselina u domenama važnim za funkciju iznosi 92%, odnosno 67%. Najveća varijabilnost nalazi se u domenama koje služe za povezivanje. Ako njih zanemarimo, udio sličnih aminokiselina između spužve i ovjeka za Rad51 iznosi 100%, a za Rad51D 81%.

Gen *rad51* ima 1017 pb i dulji je od gena *rad51D* za 57 pb. Iako nešto dulji, gen za protein Rad51 ima tri introna manje od gena za protein Rad51D, odnosno ima pet introna, dok ih gen *rad51D* ima osam. Prirodna selekcija preferira kraće introne dok mutacije pridonose njihovom produživanju. Ravnoteža između ova dva procesa određuje njihovu konačnu

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

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

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

Prou avaju i položaj introna i fazu u kojoj se introni nalaze kod gena *rad51D*, uo ava se, kao i kod broja ident i nih i sli nih aminokiselina, ve a sli nost s kralježnjacima nego beskralježnjacima. Dva introna od njih osam jedinstvena su samo za spužve, a to su introni broj dva i tri. Premda i kod kralježnjaka nalazimo intron koji po fazi odgovara intronu broj tri i pomaknut je samo za jednu aminokiselinu (migracija introna) u odnosu na taj intron kod spužvi. Migracija introna vrlo je rijedak doga aj, pravi evolucijski fenomen, a predstavlja pomicanje granice intron-egzon za nekoliko baza (1-15 nukleotida). etiri introna: intron broj jedan, etiri, šest i osam, zajedni ki su za spužve i kralježnjake. Intron

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

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

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

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

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

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

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

Osim utvrđivanja mogućeg postojanja i drugih paraloga proteina Rad51, u daljnjim istraživanjima trebalo bi optimizirati metodu dobivanja većih koncentracija ovih proteina, što bi omogućilo istraživanje i njihove funkcije. Zanimljivo bi bilo vidjeti da li ovi proteini, prisutni u spužvama koje su najjednostavniji mnogostanični organizmi, vrše iste zadatke kao i kod složenih organizama poput čovjeka.

6. ZAKLJUČCI

1. Nasumičnim sekvenciranjem cDNA biblioteke iz morske spužve *Suberites domuncula* pronađene su dvije cDNA koje kodiraju a regija pokazuje najveću homologiju s obitelji Rad51 proteina (Rad51 i Rad51D).
2. Izoliranoj cDNA veličine 669 pb određena je primarna struktura za koju je određeno da pokazuje najveću homologiju s dijelom gena za Rad51 protein. Ukupna DNA za gen *rad51* je duljine 1017 pb i određena je uz pomoć genomske biblioteke. Translacijom gena nastaje protein dug 338 aa koji pokazuje najveću sličnost (90%) s proteinom Rad51 iz ovjeka.
3. Ođređena je primarna struktura cDNA veličine 960 pb te je nađena kodirajuća a regija veličine 885 pb, koja nosi informaciju za sintezu proteina duljine 291 aa. Protein pokazuje najveću sličnost s proteinom Rad51D. Najveća sličnost (53%) pokazuje s ortolozima iz vrsta: *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Gallus gallus* i *Danio rerio*.
4. Metodom lančane reakcije polimerazom na izoliranoj ukupnoj genomskoj DNA iz morske spužve *S. domuncula* pomoću specifično osmišljenih primera izolirani su fragmenti DNA koji sadrže kodirajuću i nekodirajuću regiju gena *rad51* i *rad51D*. Utvrđeno je kako gen za protein Rad51 sadrži pet introna prosječne duljine 158 pb. Najkraći intron ima 63, a najdulji 316 pb. Gen *Rad51D* dug je 1602 pb, a sadrži osam introna prosječne duljine 84 pb. Najkraći intron ima 50, a najdulji 191 pb.
5. Promatrajući položaj i fazu introna u genima *rad51* i *rad51D* iz morske spužve *Suberites domuncula* utvrđeno je da su slični položaju i fazi introna u ortološkim genima kod kralježnjaka nego kod *D. melanogaster* i *C. elegans*.

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

7. LITERATURA

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

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

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

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

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

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

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

- Castillo-Davis C. I., Mekhedov S. L., Hartl D. L., Koonin E. V., Kondrashov F. A. (2002): Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat. Genet.* 31: 415-418.
- Coghlan A., Wolfe K.H. (2004): Origins of recently gained introns in *Caenorhabditis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11362-11367.
- Coleman M.A., Miller K.A., Beernink P.T., Yoshikawa D.M., Albala J.S. (2003): Identification of chromatin-related protein interactions using protein microarrays. *Proteomics* 3: 2101-2107.
- Cox M.M., Lehman I.R. (1982): RecA protein-promoted DNA strand exchange. Stable complexes of recA protein and single-stranded DNA formed in the presence of ATP and single stranded DNA binding protein. *J.Biol.Chem.* 257: 8523-8532.
- de Semir D., Aran J.M. (2006): Targeted gene repair: the ups and downs of a promising gene therapy approach. *Curr. Gene Ther.* 6: 481-504.
- DiRuggiero J., Brown J.R., Bogert A.P., Robb F.T. (1999): DNA repair systems in archaemementos from the last universal common ancestor? *J. Mol. Evol.* 49: 474-484.
- Dosanjh M.K., Collins D.W., Fan W., Lennon G.G., Albala J.S., Shen Z., Schild D. (1998): Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acid Res.* 26: 1179-1184.
- Drew D., Newstead S., Sonoda Y., Kim H., von Heijne G. Iwata S. (2008): GFP-optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Protocols* 3: 784-798.
- Fahey B., Larroux C., Woodcroft B. J., Degnan B. M. (2008): Does the High Gene Density in the Sponge NK Homeobox Gene Cluster Reflect Limited Regulatory Capacity? *Biol. Bull.* 214: 205-217.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D.G.

(2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

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

Liu N., Lamerdin J.E., Tebbs R.S., Schild D., Tucker J.D., Shen M.R., Brookman K.W., Siciliano M.J., Walter C.A., Fan W. I sur. (1998): XRCC2 and XRCC3, new human Rad-51 family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol.Cell* 1: 783-793.

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

- Liu Y., Tarsounas M., O'Regan P., West S.C. (2007): Role of Rad51 and Xrcc3 in Genetic Recombination and DNA Repair. *J. Biol. Chem.* 282: 1973-1979.
- Matoni I., Habdija I., Primc-Habdija B. (1998): *Beskralješnjaci: biologija nižih avertebrata*. Školska knjiga, Zagreb.
- Menetski J.P., Kowalczykowski S.C. (1985): Interaction of recA protein with single-stranded DNA. Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors. *J. Biol. Chem.* 181: 281-295.
- Miller S. A., Harley J. P. (1999): *Zoology*. The McGraw-Hill Companies, Boston.
- Müller W. E. G. (2003): *Sponges (Porifera)*. Springer, Berlin.
- Nicholas K. B., Nicholas H. B. Jr., Deerfield D. W. (1997): GeneDoc: analysis and visualisation of genetic variation. *Embnew. News* 4:14.
- Ohnishi T., Taki T., Hiraga T., Arita N., Morita T. (1998): In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 319-324.
- Pittman D.L., Weinberg L.R., Schimenti J.C. (1998): Identification, characterization and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics* 49: 103-111.
- Qiu W.G., Schisler N., Stolfus A. (2004): The evolutionary gain of spliceosomal introns: Sequence and phase preferences. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1252-1263.
- Renodon-Cornière A., Takizawa Y., Conilleau S., Tran V., Iwai S., Kurumizaka H., Takahashi M. (2008): Structural Analysis of the Human Rad51 Protein-DNA Complex

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<http://depts.washington.edu/>

<http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/>

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

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

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

<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>.

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

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

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

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