

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

**Promene strukture DNK izazvane
proteinom HsOrc4**

«doktorska teza»

Aleksandra Divac

BEOGRAD, 2008.



PA 19700

Ug 337/1983

BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU



**Promene strukture DNK izazvane
proteinom HsOrc4**

- doktorska teza -

Aleksandra Divac

Beograd, 2008

УНИВЕРЗИТЕТ "СВЕТОСЛАВ" СКОПЈЕ
И. Бр. 150240



SKRAĆENICE

ORC	– origin recognition complex
HsOrc4	– humani protein Orc4
ARS	– autonomno replikujuće sekvence, eng. Autonomously Replicating Sequences
ACS	– ARS – konsenzusne sekvence, eng. ARS-Consensus Sequence
HPRT	– hipoksantin guanin fosforibozil transferaza, eng. Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase
DHFR	– dihidrofolat reduktaza, eng. Dihydrofolate Reductase
ACE3	– Amplification Controlling Element 3
AER	– Amplification Enhancing Element
LCR	– Locus Control Region
HBO1	– histon acetiltransferaza koja se vezuje za Orc1, eng. Histone acetyltransferase Binding to Orc1
LMNB2	– lamin B2 replikator
TIMM13	– Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 13
preRC	– prereplikacioni kompleks
preIC	– preinicijatorni kompleks
Cdc6	– protein ćelijskog ciklusa 6, eng. Cell Division Cycle 6 protein
Cdt1	– faktor replikacije 1, eng. DNA Replication Factor 1
CDK	– ciklin zavisna kinaza
DDK	– Dfb-zavisna kinaza
Cdc45p	– protein ćelijskog ciklusa 45, eng. Cell Division Cycle 45 protein
RPA	– replikativni protein A, eng. Replication Protein A
EBNA1	– nuklearni antigen Epštajn-Barovog virusa 1, eng. Epstein-Barr nuclear antigen-1
MCM	– MiniChromosome Maintenance complex
NLS	– signal za lokalizaciju u jedru, eng. Nuclear Localization Signal
ATP _γ S	– adenzin-tio-tri-fosfat, eng. Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate

EMSA	– esej promene elektroforetske pokretljivosti, eng. Electrophoretic Mobility Shift Assay
AAA+ ATPases	– ATPaze povezane sa različitim funkcijama u ćeliji, eng. ATPases Associated with a variety of cellular Activities
IPTG	– izopropil- β -D-tiogalaktozid
PAGE	– elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, eng. PolyAcrilamide Gel Electrophoresis

APSTRAKT

U ćelijama svih živih organizama replikacija DNK odvija se u nekoliko složenih i međusobno veoma sličnih faza, a započinje tek kada inicijacioni proteinski kompleks prepozna specifične sekvence u genomu (*ori*). I pored velikog biološkog značaja procesa replikacije malo se zna o mehanizmima koji regulišu inicijaciju sinteze DNK višćelijskih eukariota. *Ori* sekvence ovih organizama ne sadrže konsenzusne sekvence, ali su bogate AT baznim parovima koji su grupisani u kratke, naizmenične ili homogene nizove. Ovakvi elementi mogu da formiraju alternativne strukture, a alternativne strukture mogu biti značajne za interakciju *ori* sekvenci i inicijacionog kompleksa, ili mogu nastati tokom interakcije inicijacionog kompleksa i DNK i biti značajne za naredne faze inicijacije.

U ovom radu ispitivane su interakcije rekombinantnog proteina HsOrc4 sa fragmentom Ibo I izolovanim iz humanog replikatora LMNB2 i različitim i sintetskim DNK koje sadrže A i T elemente. Protein HsOrc4 je izabran za analizu jer čini deo kompleksa ORC (eng. Origin Recognition Complex), pokazuje samostalnu DNK-vezivnu aktivnost i pripada AAA+ superfamilije makromolekulskih šaperona. U radu je potvrđeno da se HsOrc4 preferencijalno vezuje za DNK bogatu AT baznim parovima ili TAT elementima, i pokazano da stimuliše nekanonsku renaturaciju komplementarnih lanaca fragmenta Ibo I u specifičnu trolančanu strukturu. Takođe je pokazano da ovaj protein stimuliše i formiranje TAT tripleksa od odgovarajućih oligonukleotida. U radu je opisana i sasvim neočekivana sposobnost proteina HsOrc4 da katalizuje asocijaciju homoadeninskih oligonukleotida u ranije nepoznate dvolančane i, verovatno, četvorolančane strukture. Homoadeninske strukture bile su zavisne od magnezijumovih jona, termostabilne i povezane Hugstinovim vezama. Sudeći prema delovanju mutiranih formi proteina HsOrc4 neaktivnih u vezivanju ili hidrolizi ATP-a, za katalitičku aktivnost HsOrc4 bilo je neophodno vezivanje, ali ne i hidroliza ATP-a.

Budući da je osnovna uloga inicijacionog kompleksa da remodeluje *ori* sekvencu i pripremi je za naredne faze inicijacije, ovakvo delovanje proteina HsOrc4 moglo bi da doprinese formiranju kompleksne arhitekture *ori* replikacije i da, u skladu s tim, ima značajnu ulogu u inicijaciji replikacije.

ABSTRACT

In multicellular eukaryotes DNA replication initiates at fixed chromosomal sites called origins of replication. Origins of replication host initiation start sites and binding sites for universal eukaryotic initiator called origin recognition complex (ORC), but do not share conserved consensus sequences. However, all origins are AT rich and contain homopurine/homopyrimidine stretches that could form alternative DNA structures. This could indicate that peculiar DNA structure plays important role in origin function.

In order to understand alternative structures of origins and the manner in which specific proteins influence DNA structure, we have investigated interactions of recombinant protein HsOrc4 with various origin or synthetic DNAs. HsOrc4 was chosen as DNA-binding component of ORC and a member of the AAA+ superfamily of macromolecular chaperons. It was confirmed that recombinant protein HsOrc4 preferentially recognized double-stranded and triple-stranded AT rich DNA. It was demonstrated that HsOrc4 stimulated renaturation of the origin fragment lbo I into specific triple stranded structure, or renaturation of complementary oligonucleotides into intermolecular TAT triplex. An unexpected feature of HsOrc4 shown in our study was its ability to catalyze selfassociation of adenines and thus create homoadenine duplexes and possibly quadruplexes. The action of HsOrc4 in all of these reactions was dependent on the presence of magnesium ions and ATP. ATP had a role as a cofactor, because HsOrc4 did not require its hydrolysis for activity in these reactions. The mutated form HsOrc4 WA, which could not bind ATP, was inactive in restructuring reactions, whereas mutated form HsOrc4 WB, unable to hydrolyze ATP, showed similar activity to the wild type HsOrc4. Ability to form Hoogsteen bonds was essential for substrates in restructuring reactions, as these bonds held newly formed structures together. Substrates containing 7-Deaza-ATP, dATP analog unable to form Hoogsteen bonds, were inactive in these assays.

The features of HsOrc4 shown in this study are potentially biologically important, because HsOrc4 acting in this way could expand structural repertoire of genomes by producing energetically unfavorable DNA structures. These structures may be involved in determination of origin specificity.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Modeli inicijacije replikacije	2
1.2	<i>Ori</i> sekvence eukariota	3
1.2.1	<i>Ori</i> sekvence jednoćelijskih eukariota	3
1.2.2	<i>Ori</i> sekvence višecelijskih organizama (metazoa).....	6
1.3	Kompleks ORC	14
1.3.1	Kompleks ORC <i>S. cerevisiae</i> (ScORC)	22
1.3.2	Kompleks ORC <i>S. pombe</i> (SpORC)	24
1.3.3	Kompleks ORC <i>Drosophila melanogaster</i> (DmORC).....	26
1.3.4	Kompleks ORC <i>Xenopus laevis</i> (XIORC).....	28
1.3.5	Kompleks ORC biljaka	30
1.3.6	Kompleks ORC čoveka (HsORC)	33
2	CILJ RADA	41
3	MATERIJAL I METODE.....	43
3.1	Puferi korišćeni u radu	43
3.2	Bakterijski sojevi korišćeni u radu	46
3.3	Konstrukcija ekspresionih plazmida	47
3.4	Izolovanje proteina divljeg tipa i mutiranih proteina	49
3.4.1	Ekspresija proteina divljeg tipa i mutiranih proteina	49
3.4.2	Prečišćavanje rekombinantnog proteina HsOrc4	50
3.4.3	Glicerolski gradijenti	51
3.5	Analiza proteina divljeg tipa i mutiranih proteina.....	51
3.5.1	SDS PAGE.....	51

3.5.2	Bojenje proteinskih uzoraka komasi plavim.....	52
3.5.3	Bojenje proteinskih uzoraka srebrom	52
3.5.4	Elektroforetska analiza proteina na proteinskom čipu Protein 230 za Agilent Bioanalyzer 2100	53
3.6	Ispitivanje interakcije proteina i DNK	53
3.6.1	EMSA esej	54
3.6.2	Afinitetna hromatografija na sintetskim kopolimerima vezanim za magnetne kuglice	54
3.7	Izolovanje genomske DNK	56
3.8	Izolovanje plazmidne DNK.....	56
3.9	Kloniranje i mutageneza fragmenta Ibo I	57
3.9.1	Izolovanje fragmenta DNK iz agaroznog gela	59
3.10	Sinteza fragmenta Ibo I u kojem je dATP zamenjen 7-deaza-dATP-om...	59
3.11	Elektroforeza DNK u nativnom poliakrilamidnom gelu.....	60
3.12	Izolovanje fragmenata DNK iz nativnog poliakrilamidnog gela	60
3.13	Elektroforeza DNK u denaturišećem poliakrilamidnom gelu.....	61
3.14	Izolovanje fragmenata DNK iz denaturišućeg poliakrilamidnog gela	61
3.15	Obeležavanje DNK radioaktivnim izotopom ³² P	61
3.16	Reakcije sa hemijskim agensima specifičnim za neortodoksne strukture DNK	62
3.16.1	Modifikacija DNK osmijumtetraoksidom (OsO ₄).....	62
3.16.2	Modifikacija DNK hlороacetaldehidom (CAA).....	63
3.16.3	Modifikacija DNK dietilpirokarbonatom (DEPC)	63
3.16.4	Sekvenciranje DNK metodom Maksama i Gliberta	64
3.16.5	Tretman DNK piperidinom.....	64

3.17	Hidroliza DNK Dezoksiribonukleazom I (DNaza I).....	65
3.18	Reakcije restrukturiranja DNK.....	65
4	REZULTATI.....	68
4.1	Rekombinadni humani Orc4 (HsOrc4) protein i njegove mutirane forme.....	68
4.1.1	Konstrukcija ekspresionih plazmida.....	68
4.1.2	Ekspresija i izolacija proteina divljeg tipa i mutiranih proteina.....	69
4.2	Interakcije proteina HsOrc4 i DNK.....	72
4.3	Struktura fragmenata lbo I, njegovog C6 mutanta i 7-deaza lbo I.....	77
4.4	Restrukturiranje DNK izazvano proteinom HsOrc4.....	82
4.4.1	Restrukturiranje fragmenta lbo I stimulirano proteinom HsOrc4.....	82
4.4.2	Struktura produkta renaturacije.....	87
4.4.3	Uticaj proteina HsOrc4 na formiranje oligonukleotidnih višelančanih struktura.....	90
4.4.4	Interakcije proteina HsOrc4 i oligoadenina.....	96
5	DISKUSIJA.....	104
6	ZAKLJUČCI.....	111
7	LITERATURA.....	112

1 UVOD

Nakon određivanja kompletnih genomskih sekvenci velikog broja organizama, razumevanje funkcionalne organizacije genoma postaje jedan od najvećih izazova moderne biologije. Mnogi aspekti funkcionisanja genoma nisu dovoljno proučeni, pa čak i procesi neophodni za propagaciju života, poput replikacije DNK, još uvek kriju mnoge tajne.

Replikacija DNK predstavlja visoko uređeni proces u kome učestvuje veliki broj molekula čija koordinisana aktivnost omogućava prenošenje genetičke informacije iz generacije u generaciju. I pored ogromnih razlika u organizaciji genoma živih organizama, postoje bitne, zajedničke karakteristike ovog procesa. Udvajanje DNK je semikonzevativno, što znači da svaki novonastali molekul sadrži jedan parentalni i jedan novosintetisani lanac. Replikacija otpočinje sa specifičnih mesta u genomu – ishodišta replikacije ili *ori* sekvenci (eng. Origin of Replication) i odvija se bidirekciono. DNK polimeraza, enzim koji ugrađuje nukleotide, funkcioniše u 5' → 3' smeru, tako da se jedan novonastali lanac sintetiše kontinuirano (vodeći lanac), a drugi diskontinuirano (zaostajući lanac).

Za razliku od prokariota, kod kojih je cela genetička informacija organizovana u jednom cirkularnom hromozomu, genom eukariota je razdeljen na veći broj linearnih hromozoma. Da bi se složeni genomi eukariota replikovali sa apsolutnom tačnošću, u pravom trenutku i samo jednom u toku ćelijskog ciklusa, povećanje količine genetičkih informacija bilo je praćeno i usložnjavanjem regulacije procesa replikacije u toku evolucije (1).



1.1 Modeli inicijacije replikacije

U pokušaju da se objasni proces inicijacije replikacije postavljen je model replikona (2). Po ovom modelu, replikon je definisan kao jedinica DNK sposobna za samostalnu replikaciju, koja nosi dva specifična genetička elementa: gen koji kodira inicijatorni protein i DNK element za koji se inicijatorni protein vezuje. Inicijatorni protein se obično naziva inicijatorom, a mesto za koje se vezuje replikatorom. Sinteza DNK otpočinje sa *ori* sekvenci koje predstavljaju fizički mapirane regione hromozoma koji sadrže mesto inicijacije. Replikacija je pozitivno regulisana interakcijom između inicijatora i replikatora.

Geni koji kodiraju inicijatorne proteine, kao i replikatorne sekvence identifikovani su kod bakterija, ali i kod virusa, eukariota i Archea.

U skorije vreme model replikona je prilagođen da bolje objasni inicijaciju replikacije eukariota, pa je predložen tzv. model relaksiranog replikona (3). U njemu se replikator, kao specifična sekvenca DNK, zamenjuje genetičkim elementom zavisnim od konteksta u kome se nalazi. Inicijator prepoznaje više svojstava replikatora kao što su sekvenca DNK, hromatinska struktura i lokalna hromozomska arhitektura (4). I definicija inicijatora je donekle promenjena, pa su kao inicijatori definisani proteini sa tri osnovne funkcije: prepoznavanje *ori* sekvenci, odmotavanje molekula DNK i regrutovanje, putem protein-protein interakcija, enzima i pomoćnih proteina koji učestvuju u replikaciji (5).

Termin *ori* ili ishodište replikacije označava mesto gde replikacija započinje, kao i okolne sekvence koje stimulišu inicijaciju replikacije. U okviru *ori* nalazi se i mesto vezivanja inicijatornog proteinskog kompleksa koji zatim regrutuje replizom, enzimski kompleks zadužen za sintezu DNK. Kod eukariota inicijatorni kompleks

predstavlja šestočlani proteinski kompleks nazvan ORC od eng. Origin Recognition Complex. Zbog toga što se vezuje direktno za DNK i dovodi DNK polimerazu na mesta inicijacije, ORC se smatra univerzalnim eukariotskim inicijatorom (6).

1.2 Ori sekvence eukariota

Za razliku od bakterijskih i virusnih genoma kod kojih replikacija počinje sa jednog precizno definisanog *ori*, replikacija genoma metazoa počinje sa više stotina, pa čak i hiljada mesta inicijacije replikacije. Većina *ori* sekvenci metazoa ne sadrži očigledne, konzervisane motive, pa ih je često teško identifikovati i okarakterisati. Svaki linearni eukariotski hromozom sastavljen je od mnoštva replikacionih jedinica koje su duž hromozoma raspoređene u nepravilnim razmacima (10 – 330 kb) (7). Kompleksnosti inicijacije replikacije kod metazoa doprinosi i činjenica da je replikacija asinhrona, da ne počinje u isto vreme sa svih *ori* sekvenci, ali se ipak odvija jednom i samo jednom u toku ćelijskog ciklusa. Pored toga uočava se i izvesna fleksibilnost u aktivnosti *ori* u različitim uslovima rasta i različitim razvojnim stadijumima. Na regulaciju aktivnosti eukariotskih *ori* utiču i epigenetski faktori, različita svojstva strukture i funkcije hromatina. Sve ove modulacije čine replikacionu mašineriju elastičnom, što je neophodno za koordinisanu aktivnost velikog broja mesta inicijacije.

1.2.1 Ori sekvence jednoćelijskih eukariota

Pekarski kvasac, *Saccharomyces cerevisiae*, predstavlja eukariotski organizam kod koga su *ori* sekvence najbolje proučene i jedini kod koga su o okviru

njih identifikovani konzervisani motivi. Mesta inicijacije replikacije se kod ovog kvasca označavaju kao ARS (eng. Autonomously Replicating Sequences), zbog toga što su prvi put identifikovana u sekvencama koje obezbeđuju autonomnu replikaciju epizoma koji ih nosi. Daljim istraživanjima pokazano je da replikacija DNK započinje unutar ovih sekvenci, bez obzira da li su prisutne u plazmidu ili u svom prirodnom hromozomskom okruženju (8, 9). Mutaciona analiza potvrdila je pretpostavku da ARS elementi predstavljaju replikatore kvasca (10).

Kao i kod prokariota i animalnih DNK virusa, *ori* pekarskog kvasca se sastoje od nekoliko kratkih, dobro definisanih blokova sekvenci. *Ori* sekvence su bogate AT nizovima i duge 100 bp do 200 bp. Sadrže kratak, visoko konzervisan i neophodan element A i nešto manje konzervisane elemente B (11). Element A sadrži niz od 11 bp – (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T), označen kao ACS (eng. ARS-Consensus Sequence) i još nekoliko susednih nukleotida. On igra glavnu ulogu u vezivanju kompleksa ORC, dok elementi B služe da povećaju efikasnost inicijacije sa date *ori* sekvence.

U genomu *S. cerevisiae* pronađeno više od deset hiljada ACS sekvenci, ali samo mali broj ovih elemenata vezuje kompleks ORC (12). Novija istraživanja ukazuju na mogućnost da sekvence ACS koje se nalaze zajedno u okviru jednog ARS ne funkcionišu odvojeno, već formiraju jedno bipartitno mesto za kompleks ORC (13). Osim toga, pokazano je i da *ori* mora da zauzme određenu konformaciju koja omogućava vezivanje ORC. Na ovaj način moglo bi se objasniti zbog čega samo ograničen broj identifikovanih sekvenci ACS ispunjava uslove da bude mesto vezivanja za ORC.

Uspešna identifikacija *ori* sekvenci pekarskog kvasca stimulisala je potragu za sekvencama iste funkcije kod ostalih eukariota. Međutim, već kod pivskog kvasca,

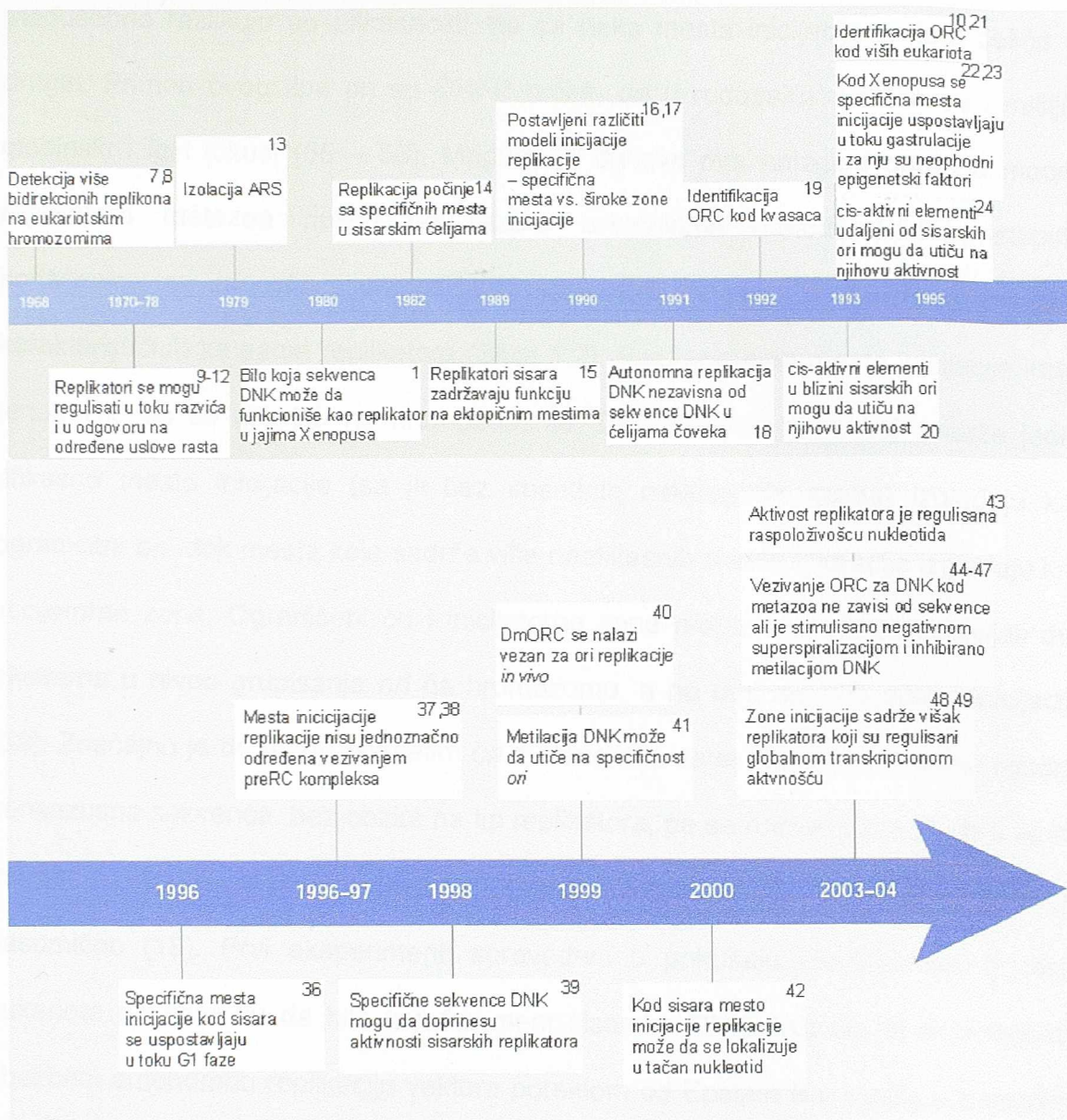
Schizosaccharomyces pombe, bilo je jasno da *ori* sekvence *S. cerevisiae* odstupaju od opšteg eukariotskog modela.

Ori sekvence *S. pombe* ne sadrže konzervisane motive i znatno su duže od *ori* *S. cerevisiae* – njihova minimalna dužina iznosi 500 bp do 1000 bp. Identifikovani *ori* sadrže funkcionalno značajne elemente koji se ponavljaju i imaju sličnu strukturu. Ovi elementi su dugački 20 bp – 50 bp i bogati A i T nukleotidima asimetrično raspoređenim u dva lanca DNK (14). Tačna funkcija ovih elemenata još uvek nije razjašnjena, ali je pokazano da pojedinačno mogu da budu deletirani, bez velikih posledica na funkciju *ori* (eng. redundancy) (15). Poslednja istraživanja pokazuju da su osobine koje su prvo pripisivane *ori* u stvari karakteristike intergenskih regiona i uopšte nisu svojstvena samo *ori*. Naime, jedina osobina koja odvajava ARS pekarskog kvasca od intergenskih regiona kod *S. pombe* jeste njihova dužina i prosečni AT sastav. Nasumično izabrani intergeni konstantne dužine imaju funkciju *ori* kada njihov AT sastav prelazi određeni prag, kao što je imaju i intergeni konstantnog AT sastava kada njihova dužina prelazi određeni prag. Pokazano je da je neophodna dužina između 0,5 kb i 1 kb, a AT sastav veći od 72% (16). Budući da *ori* sekvence nisu konzervisane, pretpostavljeno je da kod *S. pombe* značajnu ulogu u regulaciji aktivnosti imaju epigenetski faktori. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je aktivacija *ori* *S. pombe* nezavisna od ćelijskog ciklusa do ciklusa i da ne postoje epigenetički mehanizmi koji bi uticali da se *ori* korišćeni u jednom ciklusu koriste i u sledećem (17). Jedinstvena karakteristika replikacione mašinerije *S. pombe* jeste i prisustvo DNK-vezivnog domena „AT-kukica“ (eng. AT-hooks) u jednoj od subjedinica ORC – SpOrc4. Izgleda da *S. pombe* koristi ovaj relativno nediskriminišući DNK-vezivni domen da usmeri vezivanje ORC za sekvence visokog sadržaja adenina i timina i visoko zastupljene u genomu (16). Interakcije *ori* i ORC

znatno se razlikuju od klasičnog modela replikona koji pretpostavlja vezivanje inicijatora za ograničen broj mesta sa visokom specifičnošću. Razlike se ogledaju u tome što kod *S. pombe* nema visko specifične sekvence replikatora, a u okviru genoma postoji više potencijalnih mesta za vezivanje ORC-a nego što ima vezanih molekula ORC-a. Distribucija kompleksa je naizgled slučajna i umnogome zavisi od lokalne gustine traktova bogatih AT parovima, kao i od organizacije hromatina. Pored toga, u svakom ćelijskom ciklusu se koriste različiti setovi *ori* (16).

1.2.2 Ori sekvence višćelijskih organizama (metazoa)

U ćelijama metazoa replikacija DNK započinje u diskretnim, ograničenim regionima genoma prema strogom, često razvojno i tkivno specifičnom, vremenski uređenom programu. Univerzalni inicijator, ORC, očuvan je i kod metazoa, ali su, u skladu sa veličinom genoma i složenijom replikativnom mašinerijom, *ori* sekvence metazoa znatno složenije od odgovarajućih sekvenci jednoćelijskih eukariota, a među njima do sada nije identifikovana nijedna konsezusna sekvenca (18) (Slika 1.1).



Slika 1.1 Istorija potrage za replikatorom metazoa.

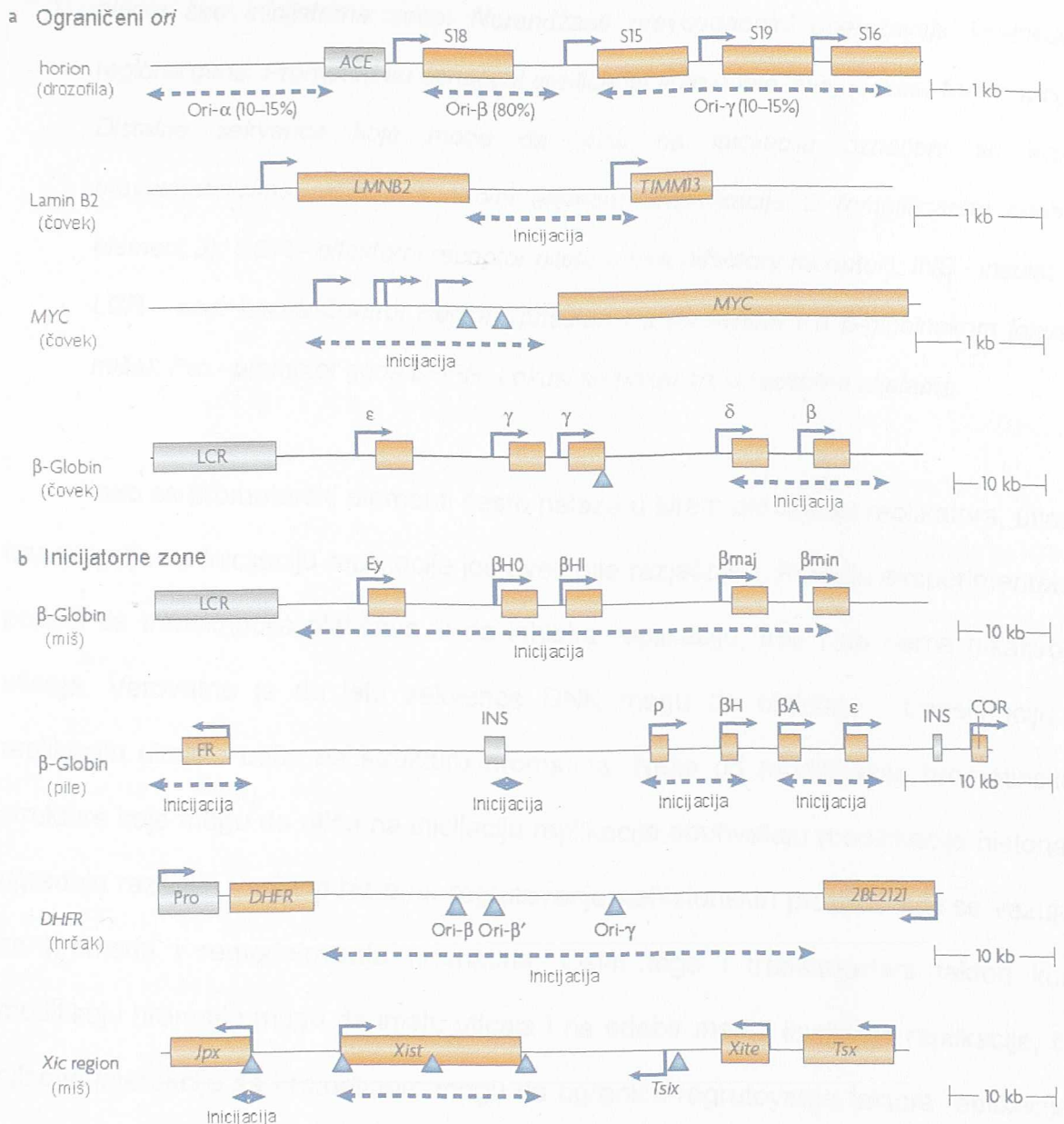
U nekim slučajevima replikacija otpočinje u ograničenim, definisanim regionima, koji, slično kao i kod kvasaca, sadrže jedno efikasno mesto inicijacije. U ovakve, tzv. ograničene replikatore (eng. confined sites), spadaju *ori* horionskih gena *D. melanogaster*, humani β -globinski *ori* i lamin B2 *ori*, MYC i moguće HPRT *ori* (39, 50 – 53). Međutim, inicijacija se u mnogim slučajevima odvija u tzv. inicijatomim zonama koje mogu biti duge i nekoliko kb. Ove zone sadrže višestruka, neefikasna mesta inicijacije koja se koriste u različitim ćelijskim ciklusima (54). Višestruki *ori* se



međusobno razlikuju po efikasnosti, pa se neka mesta inicijacije koriste češće od drugih. Primeri ovog tipa *ori* su DHFR hrčka, *ori* u rodopsinskom lokusu i mišiji – globinski i IgH lokusi (55 – 58). Moguće je da ova dva naizgled oprečna modela replikatora metazoa potiču od razlika svojstvenih metodološkim pristupima korišćenim za identifikaciju različitih replikatora, a ne od strukturnih razlika karakterističnih za same replikatore (Slika 1.2). Poznato je da mesta inicijacije imaju tendenciju da se grupišu na hromozomima. Delovi hromozoma koji sadrže jedno efikasno mesto inicijacije (sa ili bez susednih neefikasnih mesta) izgledaju kao ograničeni *ori*, dok mesta koja sadrže više neefikasnih mesta inicijacije izgledaju kao inicijatorne zone. Ograničeni *ori* i inicijatorne zone mogu u stvari predstavljati dva ekstrema u nivou grupisanja *ori* na hromozomu, a ne dva različita oblika inicijacije (59). Značajno je da među poznatim *ori* metazoa do sada nije identifikovana nijedna konsezusna sekvenca, bez obzira na tip replikatora, pa se nameće pitanje da li su *ori* metazoa uopšte determinisani elementima sekvence ili inicijacija otpočinje nasumično (18). Prvi eksperimenti sprovedeni u pokušaju identifikacije *ori* viših eukariota pokazali su da bilo koji fragment sisarske DNK duži od 10 kb može da obezbedi autonomnu replikaciju vektora poreklom od Epstein Bar virusa u sisarskim ćelijama (60). Nasuprot tome, pokazano je da replikatorne sekvence iz ograničenih *ori* ili inicijatornih zona zadržavaju sposobnost inicijacije replikacije i kada se prebace na ektopična mesta, što znači da njihova funkcionalnost bar delimično zavisi od sekvence (39, 51, 52, 61). Izgleda da inicijacija replikacije zahteva kooperaciju više elemenata DNK – AT bogatih sekvenci, mesta vezivanja DNK za nuklearni matriks, mesta vezivanja transkripcionih faktora, CpG ostrvaca, dinukleotidnih ponovaka i asimetričnih sekvenci bogatih purinima i pirimidinima (52, 61 – 67). Osim sekvensnih elemenata smeštenih u replikatorima, na inicijaciju replikacije mogu uticati i udaljene

sekvence. Postoje dve vrste ovakvih sekvenci: susedni *ori* i sekvence koje ne funkcionišu kao replikator, ali utiču na procese kao što je transkripcija ili remodelovanje strukture hromatina. Kada su u pitanju susedne *ori* sekvence postoje podaci da se u većini ćelijskih ciklusa neefikasni replikator replikuje pasivno posredstvom replikacionih viljušaka poreklom sa susednih *ori* (68). Kao primer sekvenci koje utiču na inicijaciju replikacije, a same ne funkcionišu kao replikator može se navesti ACE3 (eng. Amplification Controlling Element 3) *D. melanogaster*. Ovaj element povezan je sa jednim od najbolje proučenih eukariotskih *ori* Ori- β , smeštenim u horionskom lokusu drozofile. Za inicijaciju replikacije u ovom lokusu, dugom oko 7,7 kb, neophodni su višestruki genetički elementi (69). Jedan od neophodnih elemenata je ACE3 dug 320 bp (70). Iako u ACE3 ne otpočinje replikacija, za njega se vezuje ORC, a neophodan je i za regrutovanje ORC na Ori- β . U regulaciji replikacije učestvuju i drugi kontrolni elementi označeni kao AER (eng. Amplification Enhancing Element).

Sekvence koje utiču na inicijaciju replikacije često su uključene i u regulaciju transkripcije. Za inicijaciju replikacije sa DHFR lokusa hrčka potreban je transkripcioni promotor smešten 17,5 kb nizvodno od inicijatorne zone, dok je za inicijaciju sa humanog β -globinskog lokusa potreban uzvodni region dug 40 kb, označen kao LCR (eng. Locus Control Region) (35, 71). Zbog toga što navedeni replikator na ektopičnim mestima funkcionišu i bez ovih sekvenci, postavljena je hipoteza prema kojoj distalne sekvence olakšavaju formiranje ili stabilizuju hromatinsko okruženje pogodno za inicijaciju replikacije. Kada se pogodna sredina jednom uspostavi, replikacija može otpočeti sa bilo kog mesta u regionu replikatora.



Slika 1.2 Ograničeni ori i inicijatorne zone.

Replikacija metazoa može da otpočne sa ograničenih mesta (panel a) u kojima se inicijacija odvija često ili iz proširenih inicijatornih zona koje sadrže više ređe korišćenih mesta inicijacije (panel b). Isprekidane strelice obeležavaju dužinu detektovanih inicijatornih regiona (brojevi u zagradama obeležavaju učestalost korišćenja određenog ori tamo gde su takve informacije poznate). Sivi trouglovi obeležavaju mapirana mesta inicijacije ili lokaciju češće aktivnih mesta inicijacije u

okviru šire inicijatorne zone. Narandžasti pravougaonici obeležavaju kodirajuće regione gena. Promotori su označeni strelicama koje obeležavaju i smer transkripcije. Distalne sekvence koje mogu da utiču na inicijaciju označeni su krom pravougaonicima. ACE - kontrolni element amplifikacije 3 (amplification control element 3); COR - olfaktorni receptor pileta (chick olfactory receptor); INS - insulator; LCR - eng. Locus Control Region (prisutan i u humanom i u β -globinskom lokusu miša); Pro - promotor gena DHFR. Lokusi su prikazani u različitim skalama.

Iako se promotorski elementi često nalaze u širem okruženju replikatora, uticaj transkripcije na inicijaciju replikacije još uvek nije razjašnjen. Postoje eksperimentalni podaci da transkripcija olakšava ili da inhibira replikaciju, kao i da nema nikakvog uticaja. Verovatno je da iste sekvence DNK mogu da olakšaju i transkripciju i replikaciju ukoliko utiču na strukturu hromatina. Neke od modifikacija hromatinske strukture koje mogu da utiču na inicijaciju replikacije obuhvataju modifikacije histona, ugradnju različitih varijanti histona, regrutovanje nehistskih proteina koji se vezuju za hromatin i remodelovanje hromatina. Osim toga i transkripcioni faktori koji modifikuju hromatin mogu da imaju uticaja i na odabir mesta inicijacije replikacije, tj. njihove interakcije sa hromatinom mogu da ograniče regrutovanje faktora replikacije na određena mesta u genomu. Enzimi koji modifikuju hromatin, npr. acetiluju histone, mogu da utiču na pozicioniranje mesta otpočinjanja replikacije (Hbo1, Sir2) (72 – 74). Još uvek nije razjašnjeno da li sama replikacija stimuliše acetilaciju hromatina ili replikator sadrže informacije koje olakšavaju i modifikacije hromatina i inicijaciju replikacije DNK. Osim statusa transkripcije ili strukture hromatina na obrazac replikacije mogu da utiču i promene u metaboličkim signalima u ćeliji, kao što su količina raspoloživih prekursora nukleotida ili prisusvo potencijalno genotoksičnih supstanci (43). Budući da u genomima metazoa u svakom ćelijskom ciklusu ima više

potencijalnih nego aktivnih *ori* sekvenci, izgleda da su odabir mesta i vremenska organizacija replikacije dinamični procesi regulisani tkivno specifičnim i razvojnim elementima osetljivim na epigenetske modifikacije. Promene u odabiru mesta inicijacije mogu se uočiti tokom procesa razvića i diferencijacije. U ekstraktu embriona žabe ili vinske mušice odvija se uspešna replikacija bilo koje ubačene DNK (75, 76). Replikacija ubačene DNK započinje nasumično i odvija se u S fazi ciklusa (1, 77 – 79). Poznato je da u ranim fazama razvića embriona drozofile i ksenopusa do inicijacije replikacije dolazi na otprilike svakih 8 do 12 kb iz čega se može zaključiti da postoji ograničena specifičnost za sekvencu u selekciji *ori* u ovom stupnju razvića (21, 77, 80). Ovako blizak raspored *ori* omogućava brzu proliferaciju zigotnih nukleusa i kratku S fazu ćelijskog ciklusa. Kako razviće napreduje tako se produžava trajanje S faze. Ovo korelira sa započinjanjem transkripcije u ćelijama zigota, kao i promenama u strukturi hromatina. Kod drozofile postoji korelacija između trajanja S faze i povećanja rastojanja između *ori* (38, 81, 82).

Budući da je u eksperimentalnom delu ovog rada korišćen replikator čoveka lamin B2 (LMNB2), njegova struktura biće posebno obrađena u sledećem poglavlju.

1.2.2.1 Lamin B 2 *ori* čoveka

Analizom biblioteke nascentne DNK sintetisane u ranoj S fazi identifikovana je *ori* sekvenca nizvodno od humanog gena za lamin B2 koji se nalazi na kraćem kraku hromozoma 19 (83). Finim mapiranjem *ori* je lokalizovan u okviru fragmenta od oko 500 bp, koji obuhvata 3' nekodirajući deo gena za lamin B2 i intergensku sekvencu koja razdvaja ovaj gen od gena TIMM13 (84). Ova *ori* sekvenca aktivna je kod svih do sada ispitivnih ćelijskih linija (85). Kada je ispitivana rezistencija ovog regiona na

digestiju DNazom I ili metilaciju DMS-om *in vivo*, uočena je značajna zaštita u okviru mapiranog regiona *ori*, koja nije detektovana kod ćelija koje se ne dele (86). Interakcije između proteina i *ori* sekvence prolaze kroz značajne promene tokom ćelijskog ciklusa. Zaštićeni region se uspostavlja u G1 fazi i povećava se do granice G1 i S faze. Aktivacijom *ori* sekvence u S fazi smanjuje se zaštićeni region da bi u potpunosti nestao tokom mitoze. U narednoj G1 fazi, ponovo se uspostavlja karakteristična zaštita ovog regiona proteinima (87). Primećene promene u genomskom futrintu tokom ćelijskog ciklusa su vrlo slične onima koje odgovaraju formiranju pre i postreplikativnih kompleksa opisanih kod kvaščevih i žabljih ćelija (88). U okviru regiona LMNB2 koji interaguje sa velikim proteinskim kompleksom, osetljivom tehnikom mapiranja koja omogućava rezoluciju na nivou pojedinačnih nukleotida, identifikovano je mesto inicijacije replikacije. Istraživani region je bio dug oko 1 kb i u njegovom okviru detektovano je samo jedno mesto inicijacije, sa razmakom od tri nukleotida između početka jednog i drugog vodećeg lanca (42). Ovo mesto nalazi se u regionu bogatom nizovima AT. Pokazano je da fragment dužine 1,2 kb iz regiona *ori* sekvence lamin B2 zadržava *ori* aktivnost kada promeni položaj na hromozomu (51). Ovaj fragment obuhvata mesto inicijacije sinteze DNK, region zaštićen proteinima i deo obližnjeg CpG ostrvca. Mutacionom analizom ustanovljeno je da je za *ori* aktivnost neophodan segment od 290 bp koji sadrži start sinteze DNK i proteinima zaštićen region, dok CpG ostrvce utiče na stepen *ori* aktivnosti. Analiza futrinta *in vivo* mutirane i izvorne *ori* sekvence lamin B2 ukazala je na povezanost između *ori* aktivnosti i formiranja proteinskog kompleksa na *ori* sekvenci. Nedavno je pokazano da AT bogati fragment, koji obuhvata start sinteze DNK, može da zameni funkciju AT elementa u *ori* sekvence DHFR iz hrčka (62).

Humana *ori* sekvenca lamin B2 zauzima neortodoksnu strukturu *in vitro* u uslovima neutralnog pH, niske ili umerene jonske jačine i 6 mM jona magnezijuma. Ova neortodokсна структура po svemu sudeći predstavlja intramolekulski tripleks koji nastaje interakcijom centralnih timina strukture okca u regionu 3900-3912 i jednog od kraćih nizova (dA) \cdot (dT) (89).

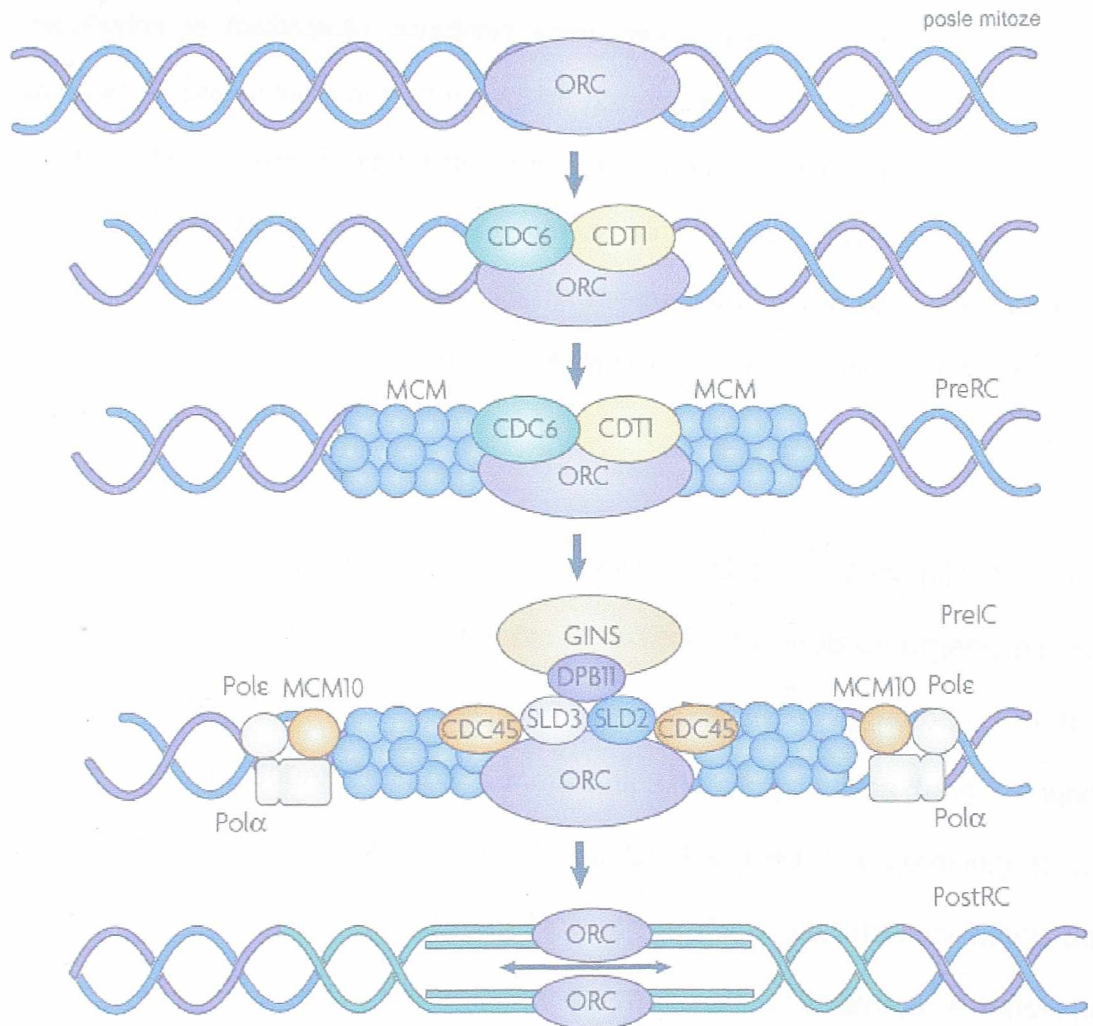
Promene topologije oko *ori* sekvence ima značajnu ulogu u funkcionisanju replikatora lamin B2. Pokazano je da topoizomeraze I i II specifično interaguju sa LMNB2 *in vitro* i *in vivo*, i da promene u tim interakcijama prate ćelijski ciklus. Ova dva enzima nikada nisu u isto vreme prisutna na *ori*, a uz to kompetiraju sa Orc2 subjedinicom kompleksa ORC za ista mesta u okviru *ori*. Ovi enzimi igraju značajnu ulogu u regulaciji aktivacije-deaktivacije *ori*. Topoizomeraza II, u okviru multiproteinskog kompleksa vezanog za DNK, najverovatnije doprinosi uspostavljanju i/ili održavanju topološkog statusa u kome je moguće formiranje preRC, dok topoizomeraza I dovodi do topoloških promena koje su neophodne za inicijaciju sinteze DNK (90, 91).

1.3 Kompleks ORC

Pravilna replikacija DNK u eukariotskim ćelijama u potpunosti zavisi od pravovremenog i preciznog formiranja serije multiproteinskih kompleksa vezanih za hromatin. Prvi korak ovog procesa jeste odabir potencijalnih mesta inicijacije replikacije. Ova odgovorna uloga kod eukariota je poverena kompleksu ORC. Kompleks ORC prvobitno je identifikovanom kod pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*) zahvaljujući specifičnom vezivanju za elemente ARS (30, 92). Kompleksi ovog tipa su

zatim identifikovani i okarakterisani kod *S. pombe*, *D. melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, čoveka i mnogih drugih organizama (93).

ORC je mutiproteinski kompleks koji funkcioniše kao univerzalni inicijator i apsolutno je neophodan za inicijaciju replikacije DNK u ćelijama eukariota. Kompleks je sastavljen od 6 subjedinica označenih brojevima od 1 do 6, pri čemu 1 označava subjedinicu najveće, a 6 najmanje molekulske mase. Vezivanje inicijacionog kompleksa za *ori* sekvencu zahteva ATP (30, 94) i predstavlja prvi korak u formiranju prereplikativnog kompleksa (preRC). Prilikom formiranja preRC ORC regrutuje dodatne faktore replikacije, u procesu koji je regulisan i odvija se po određenom redosledu. Po ovom redosledu prvo se regrutuje Cdc6, za kojim sledi Cdt1, a zatim i helikazni kompleks Mcm2-7. Pokazano je da samo neki od navedenih proteina (Cdc6, Cdt1) direktno interaguju sa kompleksom (95). PreRC se formira na prelasku iz M u G1 fazu ćelijskog ciklusa i tada formirani preRC se održava u toku G1 faze. Na prelasku iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa za preRC se vezuju i ostali replikacioni faktori kao što su ciklin-zavisne kinaze (CDK), Dbf4-zavisne kinaze (DDK), Cdc45p, dve DNK polimeraze i replikacioni protein A (RPA) (96). Uloga ORC-a u formiranju prereplikacionog i replikacionog kompleksa nije u potpunosti razjašnjena. Prema najjednostavnijem modelu ORC je predstavljen kao pista (eng. landing pad) na koju se smeštaju ostali neophodni proteini, a moguće je da ima i aktivniju ulogu (Slika 1.3).



Slika 1.3 Formiranje prereplikacionog i preinicijacionog kompleksa.

Šestočlani kompleks ORC služi kao platforma za formiranje kompleksa preRC. Kod kvasaca ORC je vezan za replikator u toku celog ćelijskog ciklusa, dok je kod metazoa vezivanje subjedinice *Orc1* regulisano u toku ćelijskog ciklusa. Na prelasku iz M u G1 fazu ćelijskog ciklusa ORC vezan za hromatin regrutuje proteine *Cdc6* i *Cdt1*, koji omogućavaju vezivanje kompleksa helikaza (*Mcm2-7*). Za replikatore za koji je vezan ovakav kompleks, prereplikacioni kompleks (preRC), kaže se da su licencirani za otpočinjanje replikacije. Regrutovanjem dodatnih faktora (*CDC45*, *SLD2-3*, *DPB11*, kompleks *GINS* (*SLD1* i *PSF1-3*) i *MCM10*) formira se preinicijacioni kompleks (preIC). Za inicijaciju replikacije DNK u toku S faze

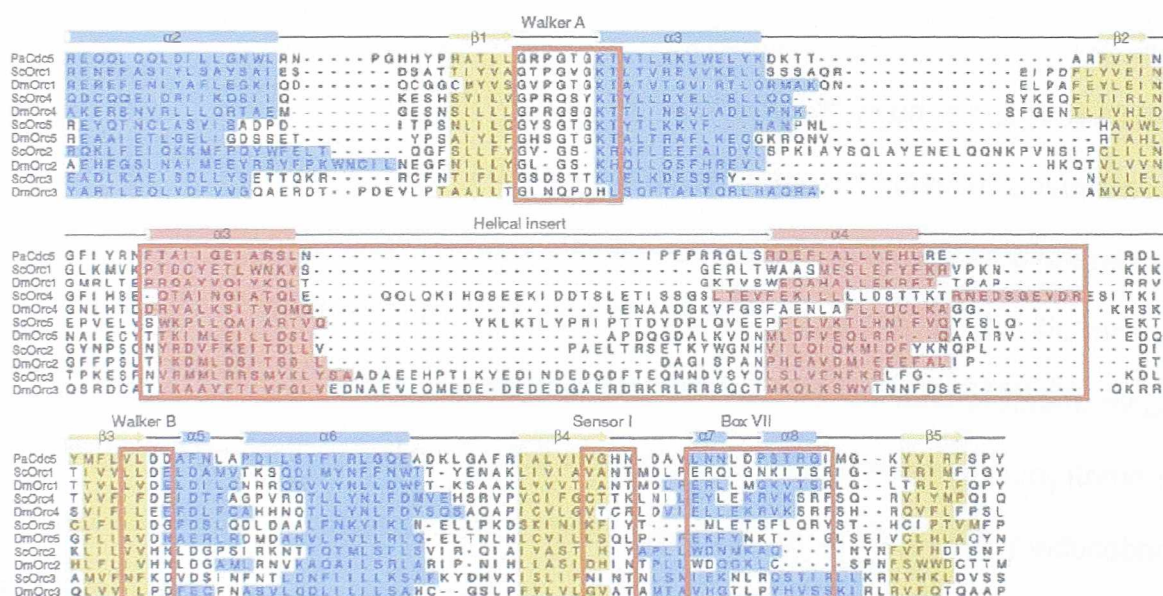
neophodna je fosforilacija određenih komponenti preRC ciklin-zavisnim i DBF4-zavisnim kinazama kao i regrutovanje DNK polimeraze (Pol) da bi se formirao preIC. Posle replikacije sve komponente preIC sem nekih subjedinica ORC napuštaju hromatin. Posle replikacije, DNK ne može da se rereplikuje dok nove komponente preRC ne budu regrutovane. U somatskim ćelijama regrutovanja nema pre završetka mitoze, što obezbeđuje da se genom replikuje jednom i samo jednom u toku ćelijskog ciklusa.

Uprkos intenzivnom proučavanju, vezivanje ORC-a za DNK nije dovoljno okarakterisano. Subjedinice ORC-a poreklom iz različitih eukariotskih organizma, ne sadrže poznate DNK-vezivne domene iako njihovi evolutivni prethodnici, ORC proteini Archea, imaju dobro definisane motive tipa krilatog heliksa (eng. winged helix). Kod eukariota jedini izuzetak predstavlja Orc4 subjedinica poreklom iz *S. pombe* koja sadži 9 domena „AT-kukica“. Poznato je da ovakvi domeni mogu da prepoznaju AT bogate regione DNK, kao i da mogu da prepoznaju ili indukuju strukturne promene u DNK (97). Pokazano je da domen „AT-kukica“ subjedinice SpOrc4 definiše celokupna DNK-vezivna svojstva kompleksa SpORC, ali kod drugih eukariota strukturni elementi inicijacionog kompleksa uključeni u interakciju sa DNK nisu poznati. Nemogućnost da se definišu relevantni strukturni elementi inicijatora i replikatora uveliko otežava karakterizaciju protein-DNK interakcija kojima započinje formiranje prereplikacionog kompleksa. Ipak, postoje pretpostavke o načinima na koje bi se mogla postići specifičnost kompleksa ORC za *ori* sekvence *in vivo*, uprkos nespecifičnosti odgovarajuće interakcije *in vitro*. Prema jednoj mogućnosti, ORC stiče specifičnost zahvaljujući interakciji sa drugim faktorima replikacije. Kandidat za obezbeđivanje ovog vida povećanja specifičnosti kompleksa ORC za DNK jeste protein Cdc6. Interakcija kompleksa ORC i Cdc6 olakšana je prisustvom *ori* DNK, a

posledica interakcije je promena konformacije jedne ili više subjedinica kompleksa ORC. Pored toga, interakcije sa proteinima koji specifično interaguju sa DNK, a onda regrutuju ORC, mogu da obezbede njegovo specifično vezivanje. Tako se, na primer, ovakva interakcije ORC-a može ostvariti sa nekim transkripcionim faktorima *D. melanogaster* ili sa EBNA1 proteinom Epstein-Bar virusa. Važan element je i struktura hromatina koja može da sakrije ili potencira određena DNK mesta pogodna za interakciju sa ORC-om. Poznato je da se *ori* sekvence i mesta vezivanja ORC-a najčešće nalaze u intergenskim regionima. Na strukturu hromatina utiču i modifikacije DNK i/ili histona što može imati efekta i na vezivanje ORC. Osim toga HsOrc1 interaguje sa histon acetil-transferazom, Hbol, tako da sam ORC može da ima uticaja na strukturu hromatina. Kod ispitivanih organizama, najverovatnije je da kombinacija specifičnosti kompleksa ORC za određenu sekvencu i navedenih modifikacija u stvari reguliše vezivanje ORC za DNK (93).

Veliki broj proteina neophodnih za replikaciju i kod prokariota i kod eukariota, spada u superfamiliju AAA+ ATPaza (eng. ATPases Associated with a variety of cellular Activities). Ova superfamilija obuhvata proteine povezane sa mnogim funkcijama u ćeliji za koje je karakteristično da mogu da vežu i hidrolizuju ATP, što dovodi do konformacione promene u njima ili njihovim partnerima. Svi članovi familije sadrže više ili manje očuvane motive odgovorne za vezivanje i hidrolizu ATP-a, motiv Voker A, odnosno Voker B (Slika 1.4). U većini članova ove familije prisutan je kanonski oblik motiva Voker A GX₂GXGK[ST]. Motiv Voker B najčešće ima formu hhhhDE (h – hidrofilni aminokiselinski ostaci), a konzervisana asparaginska kiselina (D) je odgovorna za pripremu molekula vode (oduzimanjem protona) za nukleofilni napad na gama-fosfatnu grupu ATP-a. Homologija među proteinima ove superfamilije se javlja i drugim delovima sekvence (senzor I i senzor II). Za

bakterijske, arhealne i eukariotske inicijatore zajednički motiv predstavlja i specifični helikalni insert („inicijatorni heliks“) u okviru jezgra kompleksa. Ovaj heliks sa susednim formira strukturu u obliku klina koja se pruža od jezgra kompleksa i obezbeđuje formiranje trodimenzionalne strukture koja nije planarna tj. direktno sprečava formiranje ravnog prstena, karakterističnog za neke druge članove superfamilije (98, 99). Kod svih eukariota u superfamiliju AAA+ spadaju tri subjedinice kompleksa ORC, proteini Orc1, Orc4 i Orc5 (93). Od proteina koji formiraju preRC u ovu superfamiliju spadaju i Cdc6 i Mcm2-6.



Slika 1.4 Predikcija sekundarne strukture Orc1 – Orc5 pokazuje prisustvo helikalnog inserta.

Saccharomyces cerevisiae (Sc) i *Drosophila melanogaster* (Dm) subjedinice ORC koje pripadaju superfamiliji AAA+ su poređene međusobno i sa *Pyrobaculum aerophilum* (Pa) Cdc6/Orc1 korišćenjem programa PSIPRED48, 3D-PSSM49 and PHYRE (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) i ručno podešeni korišćenjem JALVIEW50. Strukturni elementi sekundarne strukture PaCdc6/Orc1 su prikazani iznad poređenja sekvenci. Plavim je obeležen α-heliks, žutim β-lanci, crvenim helikalni insert.

Vezivanje ORC za *ori* sekvencu stimulirano je ATP-om. Kod svih ispitivanih organizama subjedinice Orc1, Orc4 i Orc5 imaju potencijalna mesta za vezivanje ATP-a, (očuvan motiv Voker A). Za Orc1 je pokazano da su ova mesta neophodna za vezivanje kompleksa za DNK (100). Osim toga što vezuje, ORC i hidrolizuje ATP. Pokazano je da je subjedinica Orc1 odgovorna za ovu funkciju. Pretpostavljeni model vezivanja ORC za DNK predviđa da vezivanje ATP-a za ORC stabilizuje vezu između proteinskog kompleksa i DNK, dok je hidroliza povezana sa nekim nizvodnim korakom inicijacije (30, 40, 101 – 103).

ATP ima višestruki značaj u funkciji ORC-a. Pokazano je da je hidroliza ATP-a potrebna da bi se kompleks MCM pridružio komponentama preRC-a već prisutnim na *ori*, ali nije poznato koji proteini vrše tu hidrolizu (104). Moguće da je za ovu reakciju odgovoran ORC. Vezivanje jednolančane DNK stimuliše hidrolizu ATP-a što možda dovodi do konformacione promene samog ORC. Ova konformaciona promena može da ima uticaja na restrukturiranje preRC ili da predstavljaju promenu iz inicijatorne u elongacionu formu kompleksa ORC. Ove dve funkcije ATP-a nisu međusobno isključive, i moguće je da stimulacija hidrolize ATP-a jednolančanom DNK doprinosi vezivanju kompleksa MCM i završetku formiranja preRC-a.

Osim u inicijaciju replikacije DNK, ORC je uključen i u druge, značajne procese u ćeliji. Ovaj proteinski kompleks učestvuje u utišavanju gena (eng. gene silencing) i uspostavljanju transkripciono reprimiranih regiona hromatina kod svih proučavanih organizama (12, 93). Kod *S. cerevisiae* ORC učestvuje u pozicioniranju nukleozoma na *ARS1 ori* (105). U M fazi ORC učestvuje u regulaciji kohezije hromatida i formiranju hromatina (106, 107). Kod mutanata za ORC drozofile javljaju

se defekti u kondenzaciji hromatina, povećava se broj prekida hromozoma kao i broj ćelija zaustavljenih u metafazi (108).

ORC najčešće ostaje vezan za hromatin u toku celog ćelijskog ciklusa što je u skladu sa njegovim prethodno navedenim funkcijama (93). Takođe je moguće da se na ovaj način obeležavaju *ori* sekvence koje će se koristiti u sledećem ćelijskom ciklusu. Kod *X. laevis* ORC se može ukloniti sa *ori* posle formiranja preRC (u G1 fazi), pri čemu MCM ostaje sposoban da samostalno inicira replikaciju (109).

Sinteza ORC nije strogo regulisana ni na transkripcionom ni na translacionom nivou, bar kod *S. cerevisiae*. Transkripcija *Orc1* sisara i drozofile regulisana je u toku ćelijskog ciklusa i nalazi se pod kontrolom E2F1 transkripcionog faktora (110). Osim toga, kod sisara se *Orc1* uklanja sa hromatina na kraju S faze i on se ponovo uključuje u ORC tek kada ćelije ponovo uđu u G1 fazu. Na ovaj način se možda sprečava reinicijacija replikacije u toku jedne S faze (111).

Pored regulacije transkripcije i translacije na aktivnost ORC može da utiče i fosforilacija. Pojedine subjedinice (*Orc1*, *Orc2* i *Orc6*) imaju mesta za fosforilaciju, a *Orc2* i *Orc6* su fosforilisani tokom S, G2 i M faze ćelijskog ciklusa. Njihova fosforilacija zavisi od ciklin-zavisnih kinaza, ali nije neophodna za inicijaciju replikacije. Moguće je da fosforilacija ORC negativno reguliše reinicijaciju replikacije, tj. sprečava formiranje novih preRC-a posle ulaska u S fazu ćelijskog ciklusa (112). Do sada nije pokazan ni jedan efekat fosforilacije na biohemijske osobine ORC, tako da ni mehanizam sprečavanja reinicijacije replikacije nije objašnjen. Osim fosforilacijom, ORC može biti modifikovan i ubikvitinacijom. U ćelijama hrčka ORC je stabilno vezan za *ori* u toku celog ćelijskog ciklusa, ali je različito modifikovan ubikvitinacijom što sugeruje da je dužina njegovog života u ćeliji regulisana proteolizom (113).

1.3.1 Komplex ORC *S. cerevisiae* (ScORC)

Šestočlani kompleks ORC prvi put je opisan kod pekarskog kvasca *S. cerevisiae* kao multimer koji specifično prepoznaje odgovarajuće *ori* sekvence (67). Komplex je identifikovan i prečišćen na osnovu sposobnosti da se specifično i na ATP zavisani način veže za *ori* DNK. Pre ScORC, u drugim vrstama takođe su identifikovani proteini koji vezuju ATP i uključeni su specifično prepoznavanje *ori* sekvenci. U ovu grupu spadaju DnaA, SV40 i papiloma T antigen, E1 protein virusa goveđeg papiloma i UI9 protein virusa herpes simpleks. Osim toga, pronađeni su i mutiproteinski kompleksi za prepoznavanje *ori* kod papiloma virusa – proteini E1 i E2, koji se kooperativno vezuju za *ori* (114).

ScOrc1 i ScOrc5 pripadaju AAA+ familiji proteina i imaju motive Voker A koji predstavljaju potencijalna nukleotid-vezivna mesta, a ScOrc1 sadrži i kompletnu konsenzusnu sekvencu motiva Voker B koja je neophodna za hidrolizu ATP-a. ORC se vezuje za DNK samo kada ima vezan ATP, što može predstavljati vid regulacije funkcije ORC. Pretpostavlja se da ORC spada u klasu tzv. molekularnih prekidača (eng. molecular switches) kod kojih hidroliza ATP-a dovodi do konformacione promene neophodne za funkcionisanje proteina.

Konformacija ScORC zavisi od molekula DNK za koji je vezan. Na elektronskoj mikroskopiji ORC izgleda kao da se sastoji iz 2 velika globularna domena, slično ljusci kikirikija. Ovakvu konformaciju zauzima kada je u slobodnoj formi i kada je vezan za dvolančanu DNK. Kada je vezan za jednolančanu DNK on zauzima tzv. savijenu (eng. bend, cashew) konformaciju. Na elektronskim mikrografijama može se sa pouzdanošću utvrditi da se definitivno samo jedan ORC vezuje za jedan *ori*. Osim toga, nedvosmisleno je pokazano i da se svaki kompleks

ORC sastoji iz 6 molekula proteina, tj. po jednog molekula svake od 6 subjedinica (115).

U toku formiranja preRC prisustvo ATP-a je neophodno u bar dva koraka, pri čemu je njegova hidroliza neophodna u bar jednom od njih. Za specifično prepoznavanje *ori* neophodno je da Orc1 ima vezan ATP. Sposobnost Orc1 da veže ATP je neophodna da bi ćelija preživela. Uloga ATP-a može biti različita: on može biti uključen u formiranje preRC, aktivaciju *ori* ili u sprečavanje reinicijacije replikacije pre otpočinjanja sledećeg ćelijskog ciklusa.

Da bi kompleks ORC hidrolizovao ATP, neophodna je kooperacija između Orc1 i Orc4 subjedinice. Orc4 sadrži jedan argininski ostatak koji je potreban da bi kompleks hidrolizovao ATP, ali on nije neophodan da bi kompleks vezao ATP ili da bi interagovao sa DNK. Za proteinske komplekse koji sadrže više AAA+ subjedinica još ranije je pokazano da jedna subjedinica hidrolizuje ATP stimulisana esencijalnim argininskim ostatkom nazvanim argininski prstić (eng. arginine finger), koji se nalazi u susednoj subjedinici. U ScOrc4 Arg267 funkcioniše kao argininski prstić. Ukoliko je ovaj arginin zamenjen nekom drugom amino kiselinom ORC ne može da hidrolizuje ATP, sa ili bez DNK. Osim toga, pokazano je da Orc1 i Orc4 interaguju sa istim molekulom ATP-a (međusobno povezivanje Orc4 sa ATP-om je zavisno od *ori* DNK i vezivanja ATP-a za Orc1). Ukoliko je Arg267 mutiran nema interakcije Orc4 sa ATP-om. Kompleks koji sadrži mutirani Orc4 neaktivan je u hidrolizi ATP-a, a ne i u vezivanju za ATP ili DNK.

Prisustvo mutiranog Orc4 u kompleksu ne utiče na regrutovanje proteina Cdc6, ali smanjuje regrutovanje kompleksa MCM. Iz ovoga se može zaključiti da je hidroliza ATP-a neophodna za efikasno asocijaciju kompleksa MCM.

Pored toga što se vezuje za *ori* DNK koja je dvolančana, ORC ima relativno visok afinitet i za jednolančanu DNK, K_d oko 10^{-8} . Afinitet ORC za jednolančanu DNK zavisi od njene dužine, ali ne i od sekvence ili prisustva ATP-a. ORC se velikim afinitetom vezuje za jednolančanu DNK dužine preko 80 nukleotida. Pošto se u procesu replikacije odmotavanjem DNK formiraju jednolančani delovi ova osobina ORC možda i nije tako neobična i iznenađujuća. Vezivanje ORC za jednolančanu DNK, u prisustvu ATP-a, stimuliše hidrolizu vezanog ATP-a i stabilizuje izmenjenu strukturu ORC (116).

1.3.2 Kompleks ORC *S. pombe* (SpORC)

Na evolutivnoj lestvici *S. pombe* je bliži višim eukariotima, nego *S. cerevisiae*. Njegovi *ori* replikacije i kompleks ORC sličniji su *ori* metazoa i njihovim ORC kompleksima, nego pekarskom kvascu. U svakom slučaju, subjedinice 1, 2 i 5 su veoma mnogo, a subjedinice 3 i 6 veoma malo očuvane u toku evolucije (117). Kao što je spomenuto ranije, jedna od subjedinica SpORC, SpOrc4 poseduje poznati DNK-vezivni domen. SpOrc4 na svom N terminalnom kraju sadrži 9 motiva „AT-kukica“, odgovornih za njegovu interakciju sa DNK. Kompletni kompleks ORC interaguje sa DNK preko ovog domena SpOrc4, pa se DNK-vezivna svojstva celog kompleksa ne razlikuju se od svojstava pojedinačnog SpOrc4.

SpORC može da se vezuje za više mesta u okviru jedne *ori* sekvence sa sličnim afinitetom, a visok afinitet kompleksa za *ori* najverovatnije potiče od kumulativnog efekta mnogo potencijalnih AT-bogatih vezivnih mesta. Zbog toga što SpOrc4 ima 9 „AT-kukica“, logično je očekivati da one mogu da interaguju sa AT bogatom sekvencom na veliki broj načina tj. da različit broj „kukica“ bude uključen u

interakcije sa DNK sa različitim afinitetom. Afinitet svakog pojedinačnog modusa vezivanja zavisio bi od broja uključenih „AT-kukica“, a broj uključenih kukica od razmaka između AT blokova u okviru *ori* sekvence. Stoga bi ukupni afinitet SpOrc4 za *ori* predstavljao kompleksnu funkciju broja načina vezivanja i njihovog afiniteta, a za očekivati je da se oni povećavaju sa dužinom i povećanjem broja AT u okviru *ori*. SpORC se vezuje za DNK nezavisno od prisustva ATP-a. Istovremeno vezivanje više „AT-kukica“ povećava snagu interakcije između proteina i DNK, a utiče i na konformaciju DNK (118). Za regulaciju funkcije SpOrc značajna može biti i fosforilacija subjedinica ciklin-zavisnim protein kinazama. Poznato je da izolovani SpOrc2 ima dve forme za koje se pretpostavlja da predstavljaju fosforilovanu i nefosforilovanu formu (119).

Slično kao i kod pekarskog kvasca svih šest subjedinica SpORC-a ostaje vezano za hromatin u toku celog ćelijskog ciklusa, a jedina promena jeste pojavljivanje nove forme Orc2 proteina u toku G1 faze (15).

1.3.2.1 Protein SpOrc4

C terminalni deo SpOrc4 pokazuje sličnost u sekvenci sa HsOrc4, XlOrc4 i ScOrc4. N terminalni domen sadrži 9 ponovaka takozvanog motiva „AT-kukica“ koji uključuje jezgro (RGRP) oivičeno pozitivno naelektrisanim aminokiselinskim ostacima. Ovaj deo proteina dug je oko 500 amino kiselina. Zna se da se jedan motiv „AT-kukica“ vezuje za mali žljeb AT traktova dugih 4 do 8 nukleotida (idealna sekvenca AA(T/A)T). Pored SpOrc4, SpOrc1 i ScOrc2 imaju po jedan motiv „AT-kukica“. Konzervisani RGRP motiv AT kukica usvaja produženu konformaciju i leži duboko u malom žljebu AT bogatih traktova koji su dugi bar 4 nukleotida. Okolni

bazni aminokiselinski ostaci posreduju u elektrostatičkim interakcijama sa kičmom DNK. DNK vezana za proteine koji sadrže „AT-kukice“ u osnovi se nalazi u B formi, sa samo malo proširenim malim žljebom. Prisustvo 9 motiva „AT-kukica“ najverovatnije obezbeđuje specifičnost i povećava jačinu interakcije sa DNK. S druge strane, činjenica da svaki pojedinačni modul ima relativno nizak afinitet za DNK omogućava lakše izmeštanje proteina sa DNK, kada je ono potrebno. Moguće je da specifičnost vezivanja ORC određuje prostorni aranžman susednih AT traktova, a ne kratka konsenzusna sekvenca za kojom se bezuspešno traga. Moguće je i da relativni afinitet Orc4 za različite *ori* predstavlja faktor koji određuje kojom se efikasnošću koji *ori* koristi (97).

1.3.3 Kompleks ORC *Drosophilae melanogaster* (DmORC)

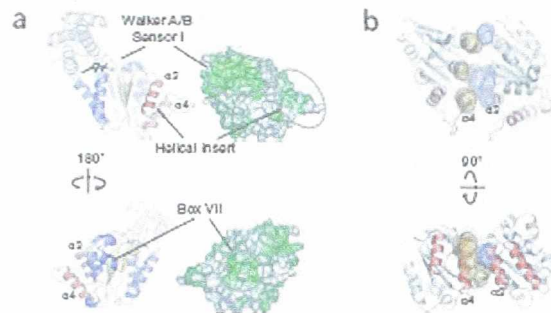
Šestočlani kompleks ORC opisan je i kod drozofile, a biohemijskim i genetičkim testovima pokazano je da DmORC funkcioniše kao inicijator replikacije (120). U ekstraktu oplođenih jaja vinske mušice hromatin se može replikovati samo u prisustvu endogenog ili rekombinantnog kompleksa DmORC, a homozigotni mutanti za Orc2, 3 i 5 umiru u larvalnom stadijumu, kada se potroše sve zalihe maternalnog kompleksa.

DmORC se vezuje za DNK samo ako je u kompleksu prisutno svih 6 subjedinica. Kao i kod *S. cerevisiae*, rekombinantni ORC drozofile mora da ima očuvanu subjedinicu Orc1 da bi se vezao za DNK na ATP-zavisan način. Vezivanje za DNK smanjuje hidrolizu vezanog ATP-a katalizovanu ORC-om. Subjedinice Orc4 i Orc5 koje takođe imaju očuvane domene uključene u vezivanje i hidrolizu ATP-a, ali njihova uloga još nije u potpunosti razjašnjena. Tokom izučavanja inicijacionog

kompleksa vinske mušice posebna pažnja posvećena je proteinu DmOrc6 koji je, osim u replikaciju, uključen i u druge ćelijske procese, a karakterističan je i po svojoj lokalizaciji u ćeliji u toku ćelijskog ciklusa. DmORC kompleks u kome nije prisutan Orc6 ne može da se veže za DNK, ali može da hidrolizuje ATP (101). Pored Orc6 vezanog u kompleksu postoji i znatna količina ovog proteina slobodnog u citoplazmi. Ovaj deo Orc6 se nalazi u blizini citoplazmatskih membrana. Pokazano je da on interaguje sa proteinom Pnut drozofile. Protein Pnut je član familije septina koji su značajni za ćelijsku deobu. Uklanjanje Orc6 RNK interferencijom izaziva brzo formiranja dvojedarnih ćelija, a kasnije i prestanak replikacije. Ovo ukazuje na to da je Orc6 uključen u procese citokineze, pri čemu su oni mnogo osetljiviji na njegov nedostatak nego replikacija (121).

Nedavno su opisani strukturni detalji kompleksa ORC drozofile (122). Pokazano je da ORC ima izduženu strukturu, sličnu slovu S. Kompleks ima središnji domen, jezgro, koje sadrži spiralni deo koji okružuje kanal. Periferno u odnosu na kanal, u osnovi kompleksa, nalazi se otvor koji okružuje „kragna“ (eng. collar). Kada se ATP veže za ORC, konformacija proteina se menja tako što se spiralni deo zateže i sužava, dok se krana otvara. Postavljena je hipoteza po kojoj subjedinice Orc1-5 međusobno interaguju preko AAA+ domena i formiraju jezgarni kompleks u obliku desnogirog spiralnog oligomera preko interakcija između AAA+ domena. Ovakva struktura je predložena na osnovu preklapanja između pentamera bakterijskog inicijatora DnaA i drozofilinog ORC-a (122) (Slika 1.5). Nije pokazano koji bi deo ovako formiranog kompleksa interagovao sa DNK, ali se pretpostavlja da bi rearanžman, koji je posledica interakcije sa ATP-om izložio određene AAA+ domene na površini kompleksa. U toku inicijacije izloženi domeni bi mogli da interaguju sa

AAA+ domenima drugih molekula (npr. Cdc6), što bi moglo da izazove promene afiniteta kompleksa za DNK u zavisnosti od ATP-a.



Slika 1.5 Konzervisana struktura zajednička za DnaA i Orc1-Orc5 ukazuje na mogućnost postojanja konzervisane površine za oligomerizaciju.

- Izgled sekundarne strukture molekula arhealnog Cdc6/Orc1 AAA+ domena pokazuje delove visoke konzervisanosti (zeleno), helikalni insert (a3-a4 crveno) je prisutan u 5 subjedinica kompleksa ORC
- Superpozicija dva Cdc6/Orc1 monomera na ATP-DnaAS dimer. Komplementarni delovi su obeleženi plavom i zlatnom.

1.3.4 Kompleks ORC *Xenopus laevis* (XIORC)

Jajne ćelije afričke žabe (*X. laevis*) predstavljaju jedan od najčešće korišćenih modela za proučavanje replikacije DNK. Za izučavanje replikacije koriste se ekstrakti jajnih ćelija oslobođeni ćelijske membrane koji, u pogledu regulacije i progresije kroz ćelijski ciklus, zadržavaju osobine jajne ćelije. U ovakvim ekstraktima egzogena DNK replikuje se na isti način kao i kada se injecira u jajnu ćeliju. Oko egzogene DNK formiraju se pseudonukleusi u kojima se zatim inicira i precizno kompletira replikacija

DNK. Kada se jedan ciklus replikacije DNK završi, ekstrakt je neaktivan sve dok ne prođe kroz mitozu, što omogućava da citoplazmatični faktori, neophodni za novu rundu replikacije, uđu u jedro. Ako se prilikom prolaska kroz mitozu blokira dezintegracija nuklearne membrane, rereplikacija se ne dešava (123). Ove i slične osobine ekstrakta jaja *X. laevis* veoma su doprinele izučavanju procesa inicijacije replikacije i uloge koju XIORC ima u njemu.

ORC *X. laevis* je takođe šestočlani proteinski kompleks čija je interakcija sa DNK neophodna za replikaciju. Izgleda da tokom ranog embrionalnog razvića ksenopusa sekvenca DNK nije značajna za selekciju mesta inicijacije replikacije. U toku kasnijeg embrionalnog razvića, kada počne transkripcija, *ori* sekvence su specifične, kao i kod ostalih eukariota. Moguće je da se relaksirana specifičnost inicijacije u jajnim ćelijama može objasniti velikom količinom maternalnog ORC-a koji, budući u velikom višku, prepoznaje i mesta za koja nema veliki afinitet. U jajnoj ćeliji ima bar 10 puta više molekula ORC nego u somatskim ćelijama, pa su u somatskim ćelijama favorizovana samo vezivna mesta za koja ORC ima najveći afinitet. Ovo je jedno od mogućih objašnjenja zašto naizgled nasumična inicijacija replikacije u ranim embrionima kasnije prelazi u uređen proces. Pokazano je da se XIORC preferencijalno vezuje za AT bogate regione DNK, i to za regione u kojima su adenini i timini raspoređeni asimetrično. Interesantno je da SpOrc4 i XIORC kompetiraju za ista mesta na DNK, iako žablji inicijator nema DNK vezivni domen odgovoran za vezivanje kvaščevog proteina (124, 125).

Jedna od karakteristika replikacije ksenopusa jeste da kompleks između ORC-a i hromatina može da postoji u bar dve različite forme. U ranoj interfazi, pre nego što su *ori* sekvence licencirane, interakcije ORC i hromatina su veoma jake i mogu se raskinuti samo u prisustvu visoke koncentracije soli ili ciklin zavisnih kinaza. Posle

licenciranja interakcija je znatno slabija, a XIOrc1 se može ukloniti sa hromatina. Moguće je da se uklanjanjem XIOrc1 sprečava reinicijacija na licenciranim *ori* sekvencama. Mehanizam bi podrazumevao da ciklin-zavisne kinaze mogu da uklone Orc1 sa hromatina samo jednom i to kada je *ori* licenciran za otpočinjanje replikacije (109).

1.3.5 Kompleks ORC biljaka

Znanje o kompleksu ORC kod biljaka je veoma ograničeno. ORC je identifikovan kod nekoliko biljnih vrsta, među kojima su *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* i *Oryza sativa*. ORC subjedinice biljaka pokazuju nisku homologiju sa ORC životinja, dok je njihova sličnost sa kvaščevim subjedinicama još manja. Među odgovarajućim subjedinicama biljaka, međutim, postoji relativno visoka homologija. Protein Orc1 pokazuje najveću konzerviranost među vrstama. Kod nekih biljaka nisu identifikovane sve subjedinice koje se nalaze u kompleksu ORC drugih eukariota (kod pirinča nije nađen Orc6).

Ekspresioni profili subjedinica ORC kod biljaka primetno se razlikuju od ekspresionih profila kod ostalih proučavanih organizama. Kod *Z. mays* i *A. thaliana* ekspresija ORC subjedinica je u skladu sa njegovom potencijalnom ulogom u replikaciji tj. proliferaciji ćelija (126, 127). Pored toga što je visoka ekspresija ORC subjedinica detektovana u proliferišućim tkivima arabidopsisa, ona je primećena i u zrelih tkivima koja ne proliferišu. Ovakav nivo ekspresije može biti u vezi sa endoreduplikacijom, a moguće je i da ORC ili pojedinačne subjedinice ostvaruju u ovim tkivima funkcije koje nisu povezane sa replikacijom (126). Kod pirinča je pokazano da je ekspresija različitih subjedinica zavisna od tkiva koje se posmatra, pri

čemu se ekspresija ni jedne od subjedinica ne može se detektovati u zreom listu. Pored toga, ekspresija ORC kod pirinča je u korelaciji sa proliferacijom ćelija (128).

Za Orc2 arabidopsisa pokazano je da je esencijalan za biljku, kako za razvoj embriona, tako i za razvoj endosperma. Kod mutanata za AtOrc2 javlja se letalni mutantni fenotip već u stupnju zigota. Semena sa mutiranim Orc2 rano prestaju sa razvojem, najčešće se formiraju embrioni veličine do 8 ćelija. Osim toga dolazi do zaustavljanja deobe jedara u endospermu (129). Subjedinicama Orc2 biljaka nedostaje ceo N terminalni domen koji je prisutan kod ostalih organizama, a u okviru koga se nalaze mesta za fosforilaciju ove subjedinice. Pošto se pretpostavlja da se fosforilacijom Orc2 sprečava reinicijaciju replikacije, zanimljivo bi bilo videti kako je ovaj proces regulisan kod biljaka. U stvari nijedan do sada opisani domen kod Orc2 subjedinice ostalih organizama nije prisutan u Orc2 biljaka. Isti je slučaj i sa Orc6 subjedinicom.

Za Orc3 biljaka je pokazano da sadrži domen homolog domenu 1 kulina, proteinske familije koja pripada ubikvitinskim ligazama i uključena je u degradaciju velikog broja proteina. Ovaj domen nije prisutan kod Orc3 subjedinica van biljnog sveta, a njegov značaj tek treba pokazati.

Kod biljaka su očuvani motivi Voker A i B kod Orc1 i Orc4 subjedinica, dok Orc5 nosi samo Voker B motiv. Orc1 subjedinica nosi i BAH domen (eng. Bromo-Adjacent Homology), koji se nalazi i u ovoj subjedinici drugih organizama. BAH domeni drugih proteina su uključeni u povezivanje metilacije i replikacije DNK i regulacije transkripcije. Jedna od specifičnosti biljne Orc1 subjedinice je prisustvo tzv. PHD prstića (eng. PHD finger, Plant HomeoDomain) koji nije prisutan kod ostalih eukariota. Njegova tačna uloga u okviru Orc1 se još uvek ne zna, ali se zna da ovaj motiv nose jedarni proteini koji su uključeni u regulaciju transkripcije posredstvom

hromatina. Još jedna interesantna karakteristika biljnog Orc1 je i to što postoje dva gena za ovaj protein. Oni su vrlo slični – 79% identične sekvence, 83% sličnosti u sekvenci. Iako je za biljne genome karakteristična duplikacija nekih delova, u regionu u kome se nalaze ova dva gena ne postoji ništa što bi ukazivalo na to da je i ovde došlo do duplikacije (u skorije vreme). Mogući odgovori na pitanje zbog čega arabidopsis ima dva gena za Orc1 su da su proteini koje kodiraju ovi geni u toku evolucije stekli različite uloge i/ili obavljaju svoju funkciju (funkcije) u različitim stupnjevima razvića. Za Orc4 je pokazano da postoje dve iRNK koje nastaju alternativnim obradom, a pri čemu se ove dve forme eksprimiraju u različito vreme. Podaci o njihovom profilu ekspresije ukazuju na mogućnost da ove dve forme Orc4 imaju različite funkcije i/ili da su različito regulisane u toku razvića.

Interakcije uključene u formiranje ORC-a su proučavane kod *Z. mays* i arabidopsisa i pokazano je da Orc2 i Orc3 direktno interaguju, kao i da Orc2 i Orc4 pokazuju znatan afinitet jedan prema drugom. Slično formiranju humanog ORC, Orc1 interaguje tek sa formiranim jezgarnim kompleksom subjedinica Orc2-5. Za razliku od humanog, ZmOrc1 interaguje jedino sa ZmOrc5 (127). Kod arabidopsisa model formiranja se gotovo u potpunosti poklapa sa onim kod čoveka (126).

Pored uloge u replikaciji za određen broj subjedinica kompleksa ORC, kao i za ceo kompleks različitih biljnih vrsta pokazano je da imaju i uloge u drugim procesima. AtORC je značajan u ranom razvoju semena i cveta. ZmOrc3 najverovatnije vrši i neke funkcije koje ne zahtevaju prisustvo ostalih subjedinica, jer je njegova ekspresija detektovana u zelenom listu, dok ni jedna druga ORC subjedinica ovde nije prisutna (127).

1.3.6 Kompleks ORC čoveka (HsORC)

Humani kompleks ORC sastoji od 6 subjedinica (HsOrc1 – HsOrc6). Na osnovu veličina pojedinačnih subjedinica molekulska masa kompleksa bi trebalo da iznosi oko 346 kDa. Međutim, na osnovu sedimentacionog koeficijenta i Stoksovog prečnika kompleksa, a korišćenjem jednačine Sigel-Montija, utvrđeno je da je molekulska masa humanog holokompleksa manja od one izračunate na osnovu aminokiselinskog sastava, i da iznosi oko 270 kDa (130). Na osnovu denzitometrijske analize SDS-PAGE profila kompleksa HsOrc1-5, subjedinice koje grade kompleks zastupljene su u odnosu 1:1:1,31:2,03 (HsOrc1:HsOrc2:HsOrc3:HsOrc4+HsOrc5, jer je Vestern blottingom detektovano da se trake HsOrc4 i HsOrc5 preklapaju). Sličan odnos nađen je i kod kompleksa HsOrc1-6. Iz ovoga se može zaključiti da kompleks čine monomeri subjedinica. Na osnovu frikcionog koeficijenta koji iznosi 1,5 pokazano je i da ceo kompleks ima izdužen oblik (130).

Subjedinice 1, 2, 4 i 5 pokazuju znatnu homologiju sa odgovarajućim subjedinicama ostalih analiziranih organizama. Subjedinice Orc3 i Orc6 su izgleda najbrže evoluirale, tako da su i razlike među njima kod različitih vrsta veće. HsOrc3 je sličan odgovarajućoj subjedinici *S. pombe* i metazoa, dok gotovo nikakva homologija ne postoji sa trećom subjedinicom *S. cerevisiae*. Orc6 je najmanje evolutivno očuvana subjedinica kompleksa ORC, a HsOrc6 pokazuje izvesnu homologiju sa odgovarajućom subjedinicom *D. melanogaster*.

U ćelijama kompleks postoji u najmanje dva oblika, sa vezanim HsOrc1 ili bez njega. Ceo kompleks je vrlo čvrsto vezan za hromatin i da bi se eluirao potrebna je visoka koncentracija soli (500 mM NaCl). Humani endogeni ORC ne sadrži Orc6, a delu eluiranih frakcija nedostaje i Orc1. Osim u frakciji ekstrahovanoj 500 mM NaCl-om HsOrc1 nalazi se i u frakciji ekstrahovanoj 100 mM NaCl-om. Ovakav

ekstrakcioni profil ukazuje da HsOrc1 nije stabilno vezan za ostatak kompleksa što može biti posledica regulisane asocijacije Orc1 u toku ćelijskog ciklusa. Pored toga, Orc1 je jedina subjedinica ORC-a čija je ekspresija pod kontrolom transkripcionog faktora E2F koji je regulisan u toku ćelijskog ciklusa. Posttranslacione modifikacije takođe mogu imati uticaja na asocijaciju Orc1, a poznato je da je ovaj protein hiperfosforilisan u toku M faze ćelijskog ciklusa (131). Iako nije integralni deo ekstrahovanog endogenog kompleksa, HsOrc6 ulazi u sastav rekombinantnog kompleksa ORC, a detektovane su i međusobne interakcije između HsOrc6 i HsOrc2, odnosno HsOrc3. Izgleda da je subjedinica HsOrc6 slabo vezana za endogeni kompleks, pa disosuje u toku ekstrakcije kompleksa sa hromatina. Postoji mogućnost da je disocijacija uzrokovana posttranslacionim modifikacijama HsOrc6 ili specifičnim interakcijama sa drugim proteinima humanog porekla. Sa ili bez HsOrc6, HsORC se vezuje za DNK, hidrolizuje ATP, započinje formiranje preRC i inicira replikaciju. Pokazano je, da osim u replikaciji, HsOrc6 ima važnu ulogu i u segregaciji hromozoma i citokinezi (132).

Formiranje kompleksa ORC je stupnjevito i po uređenom redosledu. Arhitektura kompleksa čoveka je najverovatnije slična arhitekturi kompleksa ostalih metazoa i kvasaca. Postoje dva moguća mehanizma regulacije redosleda odvijanja događaja u toku formiranja ORC. Jedna mogućnost je da postoji aditivni efekat, tj. da se slabost pojedinačnih veza nadoknađuje višestrukim interakcijama, a druga, da prethodne interakcije otkrivaju vezivna mesta za subjedinice koje slede u procesu formiranja kompleksa (131).

Pokazano je da subjedinice 2, 3, 4 i 5 formiraju jezgro kompleksa. Direktno međusobne interakcije pokazane su samo za HsOrc2 i HsOrc3, tako da se pretpostavlja da je njihovo vezivanje prvi korak u formiranju jezgra. U interakciji ove

dve subjedinice učestvuje 252 amino kiselina (ak) C terminalnog dela HsOrc2 i 200 amino kiselina N terminalnog dela HsOrc3. Funkcionalni domen HsOrc2, odgovoran za protein-protein i protein-DNK interakcije, sadrži domen dug 162 ak uključen u stabilnu interakciju sa ostalim subjedinicama (eng. ORC assembly domain) i dva signala za lokalizaciju u jedru (NLS-A i NLS-B) (133). Da bi rekombinantni HsOrc2 mogao da zameni endogeni on mora da sadrži ovaj funkcionalni domen, dug 252 ak. Prisustvo HsOrc5 u kompleksu je neophodno da bi on ostvario interakciju sa HsOrc4. Postoji mogućnost da se HsOrc5 i HsOrc4 vezuju istovremeno, ali i da je HsOrc5 neophodan da stabilizuje vezivanje HsOrc4. Za interakciju HsOrc2,3 kompleksa sa subjedinicama 4 i 5 neophodan je očuvan C terminus proteina HsOrc3 (134). Interakcija HsOrc1 sa subkompleksom koji čine HsOrc2 i 3 u potpunosti je zavisna od prisustva HsOrc4 i HsOrc5. U stvari, HsOrc1 svoju interakciju sa HsOrc2,3 ostvaruje indirektno, preko subkompleksa HsOrc4,5, pri čemu sa izdvojenim kompleksom HsOrc4,5 interaguje slabije nego sa celim jezgarnim kompleksom (135). Poznato je da su vezivna mesta za ATP kod AAA+ oligomera često smeštena na mestu dodira subjedinica i to tako da obe subjedinice ostvaruju kontakt sa ATP-om, pa je ovakva organizacija moguća i u slučaju interakcija ORC subjedinica Orc1, 4 i 5 koje pripadaju AAA+ familiji proteina. Samo je HsOrc1-5, a ne i HsOrc2-5 subkompleks, detektovan na hromatinu, tako da je moguće da je za stabilno vezivanje kompleksa za DNK neophodan HsOrc1 (134).

Kompleks ORC u eukariotskim ćelijama vrši odabir mesta u genomu sa kojih će otpočeti replikacija tj. gde će se formirati preRC. Za održavanje stabilnosti genoma od izuzetne je važnosti da se svaki region replicira jednom i samo jednom u toku jednog ćelijskog ciklusa. Većina eukariota ima regulatorne mehanizme zavisne od ćelijskog ciklusa (tzv. „ORC cycle“) koji menjaju afinitet jedne ili više subjedinica

ORC-a za hromatin, a time i aktivnost kompleksa. Ovi regulatorni mehanizmi imaju zadatak da spreče reinicijaciju u toku jedne S faze, što se obično postiže modifikacijom subjedinica na prelasku iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa. Kod sisara, afinitet subjedinice Orc1 za hromatin se smanjuje u toku S faze, a ponovo povećava u toku rane G1 faze, što je kombinovano i sa ubikvitinacijom i degradacijom nevezanog Orc1. Regulacija aktivnosti kompleksa ORC predstavlja prvi korak u određivanju vremena i mesta otpočinjanja replikacije.

Asocijacija i disocijacija kompleksa ORC *in vivo* praćena je i proučavanjem obrasca vezivanja subjedinica HsOrc1 i HsOrc2 za LMNB2 *ori*, tokom ćelijskog ciklusa. U G1. fazi dolazi do formiranja preRC. On pokriva oko 110 bp oba lanca LMNB2. Po ulasku ćelije u S fazu kompleks se rearanžira i pokriva oko 70 nukleotida donjeg lanca i 30 nukleotida gornjeg lanca LMNB2. Ova promena je korelisana sa disocijacijom HsOrc1 i izmeštanjem HsOrc2 za 17 bp u pravcu mesta inicijacije. U toku mitoze ni jedan od proteina kompleksa ORC nije detektovan na DNK (64).

ORC se za LMNB2 vezuje nanomolarnim afinitetom, koji je 2 do 5 puta veći u prisustvu ATP-a. U odnosu na ostale NTP-ove ORC preferira ATP nekoliko stotina puta. Jedini koji u nanomolskim koncentracijama takođe stimuliše vezivanje ORC za *ori* je ATP γ S, nehidrolizabilni analog ATP-a. Ovo ukazuje da vezivanje ATP-a za ORC, a ne njegova hidroliza, stimuliše vezivanje kompleksa za DNK. Za DNK se podjednako dobro vezuju kompleksi HsOrc1-6 i HsOrc1-5. U oba slučaja vezivanje je stimulirano, a kompleks sa DNK stabilizovan prisustvom ATP-a (130).

Kao i kod drugih metazoa, primarna struktura *ori* ne određuje specifičnost interakcije sa kompleksom ORC koji, u ekstraktima jaja ksenopusa može da inicira replikaciju bilo koje DNK, prokariotskog ili eukariotskog porekla (44). Za vezivanje kompleksa ORC za DNK važnost ima struktura malog žljeba DNK. Na ovo ukazuju

podaci da sintetički polinukleotidi koji imaju međusobno slične strukture malog žljeba vrlo efikasno kompetiraju LMNB2 *ori* u reakciji vezivanja za ORC (44).

Svi do danas opisani kompleksi ORC imaju ATPaznu aktivnost. Subjedinice HsORC 1, 4 i 5 pripadaju AAA+ superfamiliji ATPaza (102). Ova superfamilija obuhvata najčešće multimerne proteine za koje je karakteristično je da posle vezivanja ATP-a prolaze kroz konformacionu promenu ili je indukuju u svojim partnerima. Sve subjedinice ORC koje pripadaju ovoj familiji proteina imaju visoko očuvan motiv Voker A u formi GKT, sem kod *S. cerevisiae* gde je motiv YKT. Osim motiva Voker A, Orc1 i Orc4 imaju dobro, a Orc5 delimično očuvan i motiv Voker B, Motiv Voker A je mesto kontakta sa nukleotidima, dok je motiv Voker B mesto vezivanja jona Mg^{2+} koji je važan za hidrolizu ATP-a (136). ATPazna aktivnost celog kompleksa zavisi od očuvanosti motiva Voker A subjedinice Orc1, dok je za biološku aktivnost u inicijaciji replikacije neophodna očuvanost nukleotid-vezivnih domena sve tri subjedinice. ATPazna aktivnost kosedimentira sa kompleksom HsOrc1-5, a nije detektovana u kompleksu HsOrc2-5, ili u izolovanom HsOrc1. Ova aktivnost dva puta je stimulisana jednolančanom DNK, a tri do pet puta inhibirana dvolančanom DNK. Da bi funkcionisao kao ATPaza, HsORC mora da sadrži HsOrc1 sa očuvanim motivom Voker A. Kada su u ORC uključene HsOrc1, 4 ili 5 kojima je motiv Voker A mutiran, efekat ATP-a na stimulaciju vezivanja ORC za DNK neznatno opada, dok je sposobnost kompleksa da veže DNK znatno smanjena. Međutim, ako je u kompleksu prisutna bilo koja od navedenih mutiranih subjedinica, inicijacija replikacije u ćelijskim ekstraktima je inhibirana. Iz ovoga se može zaključiti da je vezivanje ATP-a za HsOrc4 i HsOrc5 neophodno za interakciju kompleksa sa hromatinom praćenu formiranjem preRC-a i inicijacijom replikacije. Promene u funkcionisanju kompleksa

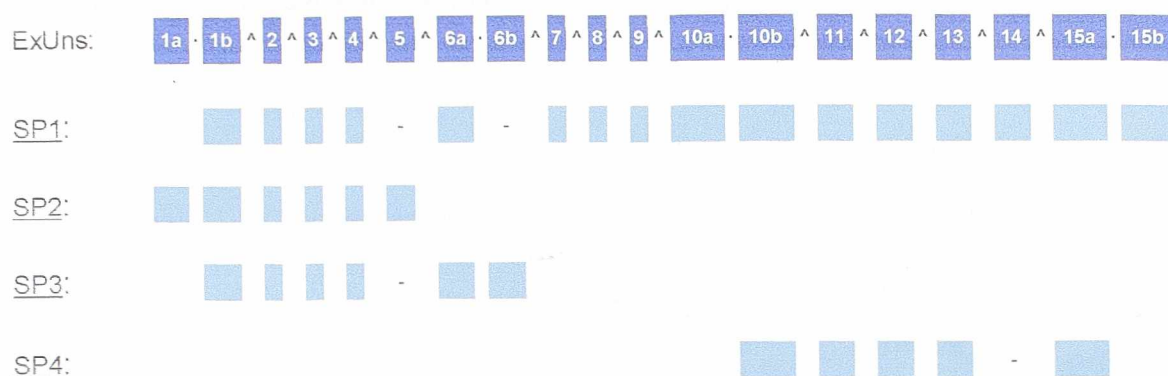
izazvane vezivanjem ATP-a najverovatnije potiču od konformacionih promena u jednoj ili više subjedinica (130).

ATP je ključni kofaktor uključen u formiranje ORC, a njegovo kontinuirano prisustvo potrebno je za održavanje integriteta kompleksa. Kontinuirano prisustvo ATP-a je neophodno da bi kompleks HsORC bio stabilan, pa zamena ATP-a ADP-om u toku purifikacije kompleksa ne povećava njegovu stabilnost, dok je zamena ATP γ S-om stabilizuje kompleks. Osim toga, i formiranje subkompleksa HsOrc2,3,5 sa HsOrc4 i HsOrc4,5 sa HsOrc1 u potpunosti zavisi od ATP-a, koji, i u ovom slučaju, može biti zamenjen ATP γ S. Ukoliko HsOrc4 ima mutirani motiv Voker A on ne može da interaguje ni sa HsOrc2,3,5, niti sa samim HsOrc5, tako da nema ni formiranja kompleksa sa HsOrc1. Izgleda da subjedinica HsOrc4 služi kao detektor prisustva ATP-a neophodnog za stabilizaciju kompleksa (135).

Budući da su neke osobine proteina HsOrc4 predmet eksperimentalnog dela ovog rada, poznati podaci o njegovoj strukturi i funkciji biće opisani u narednom poglavlju.

1.3.6.1 Protein HsOrc4

Humani Orc4 je identifikovan i kloniran kao humani homolog odgovarajuće subjedinice *S. cerevisiae* 1997. godine (137). Gen koji kodira ovaj protein se nalazi na hromozomu 2 u traci q22-23 (138). Gen se sastoji iz 14 egzona, koji se prepisuju u iRNK dugu 2,2 kb i kodira protein dug 436 amino kiselina. Protein ima molekulsku masu 50377 Da i pripada familiji AAA+ ATPaza. Identifikovane su 4 forme HsOrc4 koje su produkti alternativne obrade primarnog transkripta (139 – 141) (Slika 1.6). Procenjeno je da u ćeliji ima oko $5 \cdot 10^5$ molekula HsOrc4.



Slika 1.6 Forme HsOrc4 kao produkti alternativne obrade primarnog transkripta.

Simbol '^' označava intron, a simbol '-' mesto spajanja dve egzonske jedinice.

Homologija HsOrc4 sa kvaščevim Orc4 iznosi oko 29%, dok je njegova homologija najveća sa Orc4 šimpanze (99,85%). Ekspresija iRNK i nivo proteina praćeni su u HeLa ćelijama i pokazano je da su konstantni u toku ćelijskog ciklusa (137). Pokazano je da HsOrc4 pripada AAA+ familiji proteina jer sadrži očuvane motive Voker A i Voker B. HsOrc4 pokazuje homologiju sa proteinima Orc1, Orc5 i Cdc6. Pri tome postoji homologija između celog Orc4, i gotovo kompletnog Orc5 proteina sa C terminalnim krajevima Orc1 i Cdc6 koja je, osim kod čoveka, zapažena i kod ksenopusa i miša. Postoji pretpostavka da četiri proteina imaju sličnu tercijarnu strukturu i da vode poreklo od zajedničkog predačkog proteina. Ovi proteini imaju sličnost i sa jednom aminokiselinskom sekvencom arhea, pa se može pretpostaviti da su subjedinice ORC-a, i ceo kompleks, nastali od predačkog inicijatornog proteina koji je divergirao u toku evolucije (125). Iako je eksperimentalno pokazano da se HsOrc4 vezuje za DNK, on ne sadrži ni jedan do danas poznati DNK-vezivni domen.

U okviru gena identifikovane su 3 bazne zamene koje dovode do zamene amino kiselina u proteinu (Tabela 1.1). Učestalost ovih promena u populaciji je

različita što može ukazivati na njihovu potencijalnu ulogu u funkcionisanju proteina, iako funkcionalna analiza nijedne od navedenih promena nije urađena.

Tabela 1.1 Opisane aminokiselinske zamene u proteinu HsOrc4

region	Pozicija u iRNK	Učestalost	Bazna zamena	Aminokiselinska zamena	Pozicija u proteinu
egzon 6	498	Nije determinisana	A	Gly	113
		Nije determinisana	G	Glu	113
egzon 5	393	0,542	G	Ser	78
		0,458	A	Asn	78
egzon 4	326	0,975	G	Val	56
		0,025	C	Leu	56

2 CILJ RADA

Kao što je opisano u Uvodu, inicijacija replikacije jednoćelijskih ili višećelijskih eukariota započinje vezivanjem konzervisanog proteinskog kompleksa ORC za *ori* sekvence, a završava se regrutovanjem kompletnog replizoma. Kod višećelijskih eukariota priroda interakcije između *ori* sekvenci i ORC-a ostaje nepotpuno razjašnjena uprkos ogromnom biološkom značaju procesa koji ovom interakcijom započinje. Iako u *ori* sekvencama nisu pronađene konsenzusne sekvence odgovorne za vezivanje kompleksa ORC, neke zajedničke karakteristike postoje i mogle bi biti relevantne i za vezivanje inicijacionog proteina. Ove zajedničke karakteristike obuhvataju visok sadržaj AT baznih parova i izvesnu pravilnost u rasporedu homopurinskih-homopirimidinskih regiona koja možda reflektuje činjenicu da slična sekundarna struktura *ori* sekvenci igra ulogu u određivanju njihove specifičnosti. *Ori* sekvence višećelijskih eukariota sadrže mnoge elemente koji, pod specifičnim uslovima, mogu da sagrađe alternativne strukture. Prethodna istraživanja naše grupe bila su usredsređena na LMNB2 *ori* čoveka, njegovu strukturu i protein-DNK interakcije u koje je uključen. Pokazali smo da fragment izolovan iz LMNB2 i označen kao lbo I, zauzima specifičnu, neortodoksnu strukturu koja može biti značajna za njegovu funkciju (89). U izučavanju protein-DNK interakcija izdvojili smo protein HsOrc4, za koji smo ranije pokazali da poseduje samostalnu DNK vezivnu aktivnost, veoma sličnu vezivnoj aktivnosti kompletnog kompleksa ORC (144). Za protein HsOrc4 takođe je značajno da pripada superfamiliji makromolekulskih šaperona sposobnih da, na račun energije ATP-a, menjaju konformaciju različitih bioloških

supstrata. U skladu sa biohemijskom prirodom proteina HsOrc4 i njegovim ranije utvrđenim afinitetom za Ibo I, osnovni cilj ovoga rada bilo je ispitivanje efekta proteina HsOrc4 na strukturu odabranih DNK supstrata i karakterizacija eventualnih strukturnih promena izazvanih delovanjem proteina.

Reagensi

- 10 g laktuloze
- 5 g kazein
- 5 g želatina
- 5 g škrob
- 5 g glikol
- 5 g glicerol
- 5 g glikol
- 5 g glicerol
- 5 g glikol
- 5 g glicerol

Reagensi za SDS-PAGE

- 100 mM Tris-HCl pH 7.5
- 2.5 mM EDTA
- 0.1 mM DTT
- 0.1 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

Reagensi za EMSA

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 100 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM DTT
- 10 mM PMSF

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Puferi korišćeni u radu

Lauri Broth (LB)

10 g tripton

5 g ekstrakt kvasca

5 g NaCl

dH₂O do 1 L

za dobijanje čvrste podloge u 1 L medijuma je dodavano 17 g agara

Pufer za ekvibraciju i pranje (Equilibration/Wash pufer) (EW)

50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,0

300 mM NaCl

Pufer za eluciju (EB)

50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,0

300 mM NaCl

150 mM imidazola

Pufer za glicerolske gradijente

20 mM HEPES pH 7,9

30 mM NaCl

2 mM ZnCl₂

6 mM MgCl₂

0,1 mM ATP

0,1 mM EDTA

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

Pufer za SDS PAGE

25 mM Tris baza

192 mM glicin

0,1% SDS

Pufer za nanošenje uzoraka za SDS PAGE

50 mM Tris-HCl pH 6,8

4% SDS

20% glicerol

715 mM β-merkaptioetanol

0,02% boja bromfenol plavo

Pufer za vezivanje

20 mM HEPES pH 7,9

30 mM NaCl

6 mM MgCl₂

0,2 mM ZnCl₂

0,1 mM ATP

10% glicerol

1 mM DTT

TBM pufer

89 mM Tris baza

89 mM borna kiselina

2 mM MgCl₂

Pufer za nanošenje uzoraka za TBM PAGE

50% glicerol u 1xTBM puferu

0,25% boje ksilen cijanol

0,25% boje bromfenol plavo

Pufer A1

20 mM HEPES pH 7,9

30 mM NaCl

2 mM ZnCl₂

20 mM MgCl₂

0,1 mM ATP

0,1 mM EDTA

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

Pufer A2

20 mM HEPES pH 7,9

30 mM NaCl

2 mM ZnCl₂

24 mM MgCl₂

0,1 mM ATP

0,1 mM EDTA

1 mM DTT

0,1 mM PMSF

TAE pufer

40 mM Tris acetat

2 mM EDTA pH 8

Pufer za nanošenje uzoraka za agaroznu elektrforezu

50% glicerol u 1xTAE puferu

0,5% boja oranž G

Pufer za vezivanje za afinitetnu hromatografiju

20 mM HEPES pH 7,9
30 mM NaCl
6 mM MgCl₂
0,2 mM ZnCl₂
0,1 mM ATP
10% glicerol

Pufer za terminalnu dinukleotidil transferazu (TdT)

200 mM kalijum kakodilat
25 mM Tris baza pH 7,2
1 mM CoCl₂
0,1 mM DTT
0,01% Triton X-100

TEN₁₀₀ pufer

10 mM Tris pH 7,5
1 mM EDTA
100 mM NaCl

TEN₁₀₀₀ pufer

10 mM Tris pH 7,5
1 mM EDTA
1 M NaCl

Pufer za dijalizu

25 mM Tris-HCl pH 6,8
10% glicerol
1 mM PMSF

PCR pufer

10 mM Tris-HCl pH 9,0
50 mM KCl
0,1% Triton X-100

TBE pufer

89 mM Tris baza
89 mM borna kiselina
2 mM EDTA pH 8,0

Pufer za nanošenje uzoraka za TBE PAGE

50% glicerol u 1xTBE puferu
0,25% boje ksilen cijanol
0,25% boje bromfenol plavo

Pufer za nanošenje uzoraka na denaturišići gel

95% dejonizovan formamid
0,37% Na₂EDTA pH 7,0
0,3% boja ksilen cijanol
0,3% boja bromfenol plavo

Dilucioni pufer za DNazu I

10 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂
10% glicerol

Stop pufer za DNazu I

200 µg/mL proteinaze K
10 mM EGTA
10 mM Tris-HCl pH 7,8
5 mM EDTA
0,5% SDS

Ligacioni pufer

50 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM MgCl₂
10 mM DTT
1 mM ATP
25 µg/mL BSA

Pufer R

10 mM Tris-HCl pH 8,5
10 mM MgCl₂
100 mM KCl
0,1 mg/mL BSA

3.2 Bakterijski sojevi korišćeni u radu

- Soj M15 (pREP4) (Nal^s, Str^s, Rif^s, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺), derivat soja K-12, koji sadrži plazmid pREP4 sa genom za represor LacI koji sprečava ekspresiju rekombinantnog proteina pre indukcije izopropil-β-D-tiogalaktozid (IPTG), korišćen je za ekspresiju rekombinantnih proteina fuzionisanih sa His markerom.
- Soj XL1-Blue (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA46*, *thi*, *relA1*, *lac*⁻, F['] [*proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZΔM15* Tn10 (*tet*^r)], u kojem je moguća plavo-bela selekcija X-galom, korišćen je za propagaciju konstrukata i izolovanje plazmidne DNK

- Soj XL-10 Gold (Tet^r $\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB, lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r*], korišćen je za propagaciju odgovarajućih konstrukata i izolovanje plazmidne DNK

3.3 Konstrukcija ekspresionih plazmida

Protein HsOrc4 i njegove mutirane forme HsOrc4 WA i HsOrc4 WB, ekspimirani su u bakterijama kao rekombinantni proteini fuzionisani sa His6 epitopom. Plazmidi sa kojih su ekspimirane mutirane forme proteina, WA i WB, sintetisani u reakciji dirigovane mutageneze. Kao matrica u reakciji je korišćen ranije konstruisan plazmid pQE-30 (Qiagen, USA) u koji je subkloniran fragment dužine 1311 bp koji kodira HsOrc4. Sekvence oligonukleotida koji su korišćeni u reakcijama dirigovane mutageneze dati su u tabeli, kao i aminokiselinske promene do kojih dovode (Tabela 3.1). Za mutagenezu je korišćen komercijalni kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) i reakcije su izvođene po uputstvu proizvođača.

Tabela 3.1 Graničnici korišćeni za mutagenezu proteina HsOrc4

protein	graničnik	aminokiselinska zamena
HsOrc4 WA	5'-CCCCGAGGATCAGGAGCAACTATGTTAATAAG-3'	K73A
HsOrc4 WB	5'-GCCCAGTGATCTTCATATTAGCTGCATTTGATCTTTTGCTCATC-3'	DE159-160AA

Procedura mutagenze obuhvata tri koraka. U prvom koraku se reakcijom lančanog umnožavanja dobija veliki broj molekula mutiranog lanca plazmida.

Graničnici koji se koriste za mutagenezu se prvo vezuju za denaturisanu matricu, a zatim *Pfu* polimeraza iz enimskog miksa sintetiše DNK i to bez izmeštanja prajmera. Na ovaj način sintetiše se dvolančani molekul DNK u kome jedan lanac sadrži mutacije i prekide. Prekide zatvara jedna od komponenti enzimskog miksa. U drugom koraku produkti reakcije umnožavanja se tretiraju enzimom *DpnI*. Ovaj enzim specifično seče metilovanu i hemimetilovanu DNK, sekvence 5'-Gm⁶ATC-3'. Na ovaj način se eliminišu parentalni molekuli, jer je DNK izolovana iz većine sojeva *E. coli* nametilovana. U poslednjem koraku, reakcionom smešom čiji najveći deo čine jednolančani molekuli koji nose mutacije, transformišu se kompetentne ćelije u kojima se jednolančana prevodi u dvolančanu DNK.

Reakcione smeše zapremine 25 μ L sadržale su 2,5 μ L 10X QuikChange Multi reakcionog pufera, 50 ng plazmidne DNK, 100 ng odgovarajućeg fosforilisanog prajmera, 1 μ L miksa dNTP-ova i 1 μ L enzimskog miksa QuikChange. Program umnožavanja je bio: 1 min inicijalne denaturacije i 30 ciklusa denaturacije na 95°C u trajanju od 1 min, renaturacije na 55°C u trajanju od 1 min i sinteze DNK na 65°C u trajanju od 9 min. Reakciona smeša posle PCR reakcije je tretirana enzimom *DpnI* da bi se ukonili molekuli matrice. Delom digestionih smeša transformisane su M15(pREP4) kompetentne ćelije.

Sekvenca plazmida sintetisanih na ovaj način proverena je sekvenciranjem, a time i potvrđeno prisustvo odgovarajuće bazne zamene odgovorne za inaktivaciju domena.

3.4 Izolovanje proteina divljeg tipa i mutiranih proteina

Svi proteini korišćeni u ovom radu klonirani su u bakterijski ekspresioni vektor pQE-30 (Qiagen) i eksprimirani u soju *E. coli* M15(pREP4). Rekombinantni proteini su imali histidinski epitop dodat na N-terminalnom kraju.

3.4.1 Ekspresija proteina divljeg tipa i mutiranih proteina

Visok nivo ekspresije proteina sa vektora pQE-30 obezbeđen je transkripcionim sistemom pod kontrolom T5 promotora. U regulaciju transkripcije je uključen i lac operator. Dve sekvence lac operatora obezbeđuju efikasnu represiju inače veoma jakog promotora T5 ukoliko u ćeliji postoji lac represor. Bakterijski soj M15(pREP4) konstitutivno eksprimira lac represor sa pREP4 plazmida. Indukcija ekspresije rekombinantnog proteina vrši se dodavanjem IPTG-a koji se vezuje za lac represorni protein i inaktivira ga, što otključava T5 promotor i omogućava ekspresiju.

Bakterijski klon sa odgovarajućim plazmidom (pHsOrc4, pHsOrc4 WA, pHsOrc4 WB) zasejavan je sa sveže petri šolje ili iz glicerolskog stoka (u odnosu 1:1000) u 50 mL LB medijuma sa antibioticima (ampicilin 100 µg/mL, kanamicin 30 µg/mL). Bakterijska kultura je inkubirana preko noći na 25°C uz lagano mešanje (180 rpm). Prekonoćnom kulturom zapremine 40 mL sledećeg dana je inokulirano dva litra LB medijuma sa antibioticima. Bakterije su rasle na 25°C uz lagano mućkanje do OD₆₀₀ od 0,5 do 0,7. Potom je indukovana ekspresija proteina dodavanjem IPTG-a u finalnoj koncentraciji 0,2 mM i kultura inkubirana još 2 sata pod istim uslovima. Bakterijske ćelije su onda taložene centrifugiranjem u trajanju od 20 min na 3000 g na 4°C. Protein je prečišćavan iz svežih taloga ili iz taloga zamrznutih na -20°C.

3.4.2 Prečišćavanje rekombinantnog proteina HsOrc4

Za prečišćavanje proteina pod nativnim uslovima korišćena je afinitetna hromatografija na komercijalnom medijumu TALON (TALON Metal Affinity Resin Clontech Laboratories Inc, Palo Alto, CA). Prečišćavanje je vršeno po uputstvu proizvođača, uz manje modifikacije. Ova procedura se zasniva na reverzibilnoj interakciji imobilizovanih metalnih jona kobalta sa polihistidinskim repićem rekombinantnog proteina. Rekombinantni protein eluira se imidazolom koji kompetira polihistidinskom repiću vezanom za smolu.

Bakterijski talog iz 2 L kulture resuspendovan je u 150 mL pufera EW (eng. Extraction/Wash) (50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,0; 300 mM NaCl; kompletni proteazni inhibitori (Complete, EDTA free, Roche)), a zatim mu je dodato 0,75 mg/mL lizozima i 2 U/mL DNase I u odgovarajućem reakcionom puferu (40 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl₂). Prilikom utvrđivanja optimalnih uslova za prečišćavanje mutiranih u ovom koraku testirani su neki deterdženati (0,5% NP40 ili 0,5% CHAPS), visoka so (1 M NaCl) ili 10 mM ATP. Liziranje ćelija se odvijalo 1 sat na ledu. Bakterijska, genomska DNK fragmentisana je kratkom sonikacijom. Sonikacija je ponovljena 3 puta po 10 sekundi sa pauzama od po 30 sekundi, na ledu, uz 70% – 80% maksimalne jačine sonikatora (Sonic dismembrator model 300, Fisher). Uzorak je zatim centrifugiran 20 min na 7500 g, na 4°C da bi se uklonili ostaci razbijenih ćelija. Bistri supernatant je pomešan sa 6 mL hromatografskog medijuma i inkubiran 2 sata na 4°C uz konstantnu rotaciju (15 rpm). Pre upotrebe hromatografski medijum je dva puta opran EW puferom. Posle inkubacije, smola sa vezanim proteinom je staložena kratkim centrifugiranjem, 2 min na 700 g, na 4°C, i zatim oprana 3 puta, svaki put sa po 50 mL EW pufera i u trajanju od 15 min. Vezani proteini eluirani su puferom za eluciju, EB (50 mM Na-fosfatni pufer pH 7,0, 300 mM NaCl, 150 mM imidazol, kompletni proteazni inhibitori

(Complete, EDTA free, Roche, Switzerland)) u trajanju od 1 sata na 4°C, uz stalno mešanje. Eluati su zatim propušteni kroz Costar kolonice (Sigma Aldrich Chimie GmbH, Germany) da bi se oslobodili smole i odmah nanošeni na glicerolske gradijente.

3.4.3 Glicerolski gradijenti

Dodatno prečišćavanje preparata proteina kroz glicerolski gradijent vršeno je da bi se uklonili insolubilni agregati proteina.

Centrifugiranje je izvođeno u 10% do 30% glicerolskim gradijentima pripremljenim u odgovarajućem puferu (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 2 mM ZnCl₂; 6 mM MgCl₂; 0,1 mM ATP; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT i 0,1 mM PMSF). Gradijenti su centrifugirani u SW41 Beckman rotoru 20 sati, brzinom od 38000 rpm na 8°C. Frakcionisanje gradijenata je vršeno sa dna tube uz pomoć peristaltičke pumpe, u razmacima od 15 sec i pri brzini pumpe od 65 rpm.

Frakcije glicerolskog gradijenta su analizirane SDS elektroforezom u poliakrilamidnim gelovima (SDS PAGE). Frakcije koje su sadržale maksimalnu količinu proteina su sakupljane i razdvojene u alikvote koji su do upotrebe čuvani na -80°C.

3.5 Analiza proteina divljeg tipa i mutiranih proteina

3.5.1 SDS PAGE

Uzorci proteina su razdvajani elektroforezom u 12% SDS poliakrilamidnim gelovima u puferu sastava: 25 mM Tris baza, 192 mM glicin i 0,1% SDS. Uzorcima je dodavana ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (50 mM Tris-HCl

pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 715 mM β -merkaptoetanol; 0,02% boja bromfenol plavo), a pred nanošenje na gel proteini su denaturisani 5 min na 95°C.

3.5.2 Bojenje proteinskih uzoraka komasi plavim

Proteinski uzorci boje se komasi plavom bojom (Coomassie Brilliant blue G-250, Sigma Aldrich Chimie GmbH, Germany) zato što se boja fizički adsorbuje na površinu određenih amino kiselina (arginin, histidin i aromatične amino kiseline) u kiseloj sredini. Ovim metodom tipično se detektuju proteini u koncentraciji od 100 ng pa naviše.

Posle elektroforeze, SDS poliakrilamidni gelovi su bojeni rastvorom komasi plavog (0,4% komasi plavo; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) 1 sat ili preko noći. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru 10% sirćetne kiseline i 50% metanola, dva puta po 30 minuta, i nastavljeno u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola dok uzorci nisu bili jasno vidljivi na gelu.

3.5.3 Bojenje proteinskih uzoraka srebrom

Bojenje proteina srebrom je znatno osetljivije nego bojenje komasi plavim, pa se zbog toga i koristi kada je potrebno detektovati manje količine proteina. Donja granica osetljivosti ove metode je nekoliko nanograma proteina. Reakcija bojenja se zasniva na redukciji jona srebra u metalno srebro na površini proteina.

Prema proceduri za bojenje, uzorci su posle elektroforeze prefiksirani 30 min u rastvoru 50% metanola i 10% sirćetne kiseline, a zatim je fiksiranje nastavljeno u rastvoru 5% metanola i 7% sirćetne kiseline 2 sata, ili preko noći. Sve inkubacije su vršene na sobnoj temperaturi uz lagano mućkanje. Gel je zatim ispiran vodom 30 min,

pa fiksiran u 10% glutaraldehydu takođe 30 min. Posle ovog fiksiranja gel je ispiran vodom 4 sata ili preko noći. Gel je potom inkubiran 15 min u rastvoru srebra. Rastvor se pravi tako što se 20,4 mL vode sa 0,63 mL 3M NaOH i 0,8 g AgNO₃ titruje amonijum hidroksidom dok rastvor ne postane bezbojan, a zatim se doda voda do 100 mL. Posle bojenja gel je kratko ispiran velikom količinom vode, a boja je razvijana rastvorom 0,005% limunske kiseline i 0,02% formaldehida. Razvijanje je zatim zaustavljano vodom.

3.5.4 Elektroforetska analiza proteina na proteinskom čipu Protein 230 za Agilent Bioanalyzer 2100

Analiza proteina na proteinskom čipu Protein 230 za Agilent Bioanalyzer 2100 zasniva se na kapilarnoj elektroforezi kroz specifični matriks, pri čemu se proteini boje direktno u toku elektroforeze intekalatorskom fluorescentnom bojom.

Proteini su analizirani kitom Agilent Protein 230, po upustu proizvođača, uz obradu odgovarajućim softverskim paketom.

3.6 Ispitivanje interakcije proteina i DNK

Interakcije proteina i DNK ispitivane su metodom promene elektroforetske pokretljivosti (EMSA esej – Electrophoretic Mobility Shift Assay) i afinitetnom hromatografijom na sintetskim kopolimerima vezanim za magnetne kuglice. Nakon EMSA eseja uzorci DNK su analizirani elektroforezom, a gelovi su sušeni pod vakuumom i autoradiografisani. Posle afinitetne hromatografije uzorci proteina su analizirani SDS elektroforezom, a gelovi zatim bojeni srebrom.

3.6.1 EMSA esej

DNK-vezivna aktivnost proteina HsOrc4 testirana je u EMSA eseju. U tu svrhu korišćen je proteinski preparat prečišćen afinitetnom hromatografijom i centrifugiranjem u glicerolskom gradijentu, u kombinaciji sa fragmentom Ibo I, poreklom iz LMNB2 ori čoveka. Vezivanje za radioaktivno obeležen fragment Ibo I odvijalo se u puferu za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol; 1 mM DTT) sa ili bez 0,1 mM EDTA. Reakciona smeša, zapremine 10 – 15 µL, sadržala je 50 – 500 ng proteina HsOrc4, 5 fmol – 20 fmol probe i nespecifični kompetitor poli(dGdC)·(dGdC), prisutan u 100 puta težinskom višku u odnosu na probu. Nakon inkubacije od 15 – 30 minuta na 25°C dobijeni kompleksi su razdvajani elektroforezom na 5% nativnim poliakrilamidnim gelovima pripremljenim u TBM puferu (89 mM Tris baza, 89 mM borna kiselina i 2 mM MgCl₂).

3.6.2 Afinitetna hromatografija na sintetskim kopolimerima vezanim za magnetne kuglice

Za afinitetnu hromatografiju korišćeni su preparati proteina HsOrc4 prečišćenog glicerolskim gradijentima i dugi dvolančani ili trolančani sintetski kopolimeri. Od dvolančanih kopolimera korišćeni su naizmenični, poli(dAdT)·poli(dAdT) i poli(dGdC)·poli(dG-dC), i homogeni, poli(dA)□poli(dT). Da bi se formirali dugi trolančani molekuli, monotoni kopolimer poli(dA)·poli(dT) (GE Healthcare, UK) inkubiran je sa jednolančanim fragmentom poli(dT)_n (n = 34 ili 40). Reakciona smeša, zapremine 10-23 µL, sadržavala je pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), 2 ng polimera poli(dA)·poli(dT) i 300 fmol fragmenta poli(dT)_n. Hibridizacija se odvijala 30 min na 37°C. Radi provere integriteta

trolančanog molekula u smešu je povremeno dodavan radioaktivno obeleženi poli(dT). Formiranje tripleksa proveravano je elektroforezom na agaroznim TBM gelovima i autoradiografijom. Da bi se dvolančani ili trolančani kopolimeri vezali za magnetne kuglice obložene streptavidinom, u prvom koraku im je dodavan C repić koji je hibridizovan sa jednolančanim, biotiniловanim homoguaninom. U tu svrhu, sintetski kopolimeri poli(dA)·poli(dT), poli(dAdT)·poli(dAdT) i poli(dGdC)·poli(dGdC) (GE Healthcare, UK) su inkubirani sa terminalnom dezoksinukleotidil transferazom (TdT) i dCTP-om kao supstratom, čime su njihovi 3' krajevi produžavani jednolančanim nizom poli(dC). Reakciona smeša je sadržavala oko 4 pmol dvolančanih kopolimera, 50 – 100 U TdT, 12 mM dCTP u volumenu od 100 µL u puferu za TdT (200 mM kalijum kakodilat; 25 mM Tris baza pH 7,2; 1 mM CoCl₂; 0,1 mM DTT; 0,01% Triton X-100). Reakcione smeše su inkubirane 45 min na 37°C, a reakcije zatim zaustavljane inkubacijom na 70°C. Posle toga, reakcije su hlađene do sobne temperature u prisustvu 25 µM biotiniловanog (dG)₃₀ da bi došlo do hibridizacije komplementarnih jednolančanih regiona. Pošto su kao hromatografski medijum korišćene magnetne kuglice obložene streptavidinom (10 mg/mL, Roche, Switzerland), biotiniловani kopolimeri su direktno vezivani za 180 µL magnetnih kuglica. Efikasnost vezivanja je bila oko 1 pmol sintetskih kopolimera na 80 µL kuglica. Pre korišćenja magnetne kuglice su prane tri puta sa po 700 µL TEN₁₀₀ pufera (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl). Sakupljanje magnetnih kuglica posle pranja vršeno je na magnetnom stalku. Posle pranja na dobijenu količinu kuglica dodavan odgovarajući sintetski kopolimer koji je na 5' kraju imao ugrađen biotin. Reakcija vezivanja streptavidina za biotin odvijala se 45 min na 25°C. Nevezani materijal je ispiran iz smeše pranjem dva puta sa po 1 mL pufera TEN₁₀₀₀ (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 M NaCl). Zatim su ovako spremljeni supstrati ili odmah inkubirani sa HsOrc4, u slučaju dvolančanih supstrata, ili su prvo

inkubirani sa (dT)₄₀ da bi se formirali trolančani molekuli, a zatim inkubirani sa HsOrc4 (2 sata na 25°C, uz mućkanje). Protein-DNK kompleksi vezani za kuglice sakupljani su u magnetnom stalku. U slučaju reakcija sa dvolančanim supstratima kompleksi vezani za kuglice su dva puta prani puferom TEN₁₀₀, dok su kompleksi proteina i trolančanog supstrata ispirani puferom TEN₁₀₀ u koji je dodat 6 mM MgCl₂. Uklanjanje proteina sa magnetnih kuglica vršeno je tretmanom uzoraka DNazom I (100 U, 30 min na 25°C, uz konstantno mućkanje na 1400 rpm). Ovako sakupljeni uzorci su dijalizirani u puferu za dijalizu (25 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% glicerol, 1 mM PMSF) i zatim analizirani na SDS PAGE.

3.7 Izolovanje genomske DNK

Genomska DNK izolovana je iz humanih limfocita periferne krvi kitom za izolovanje DNK (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit, GE Healthcare, UK), a po uputstvu proizvođača.

3.8 Izolovanje plazmidne DNK

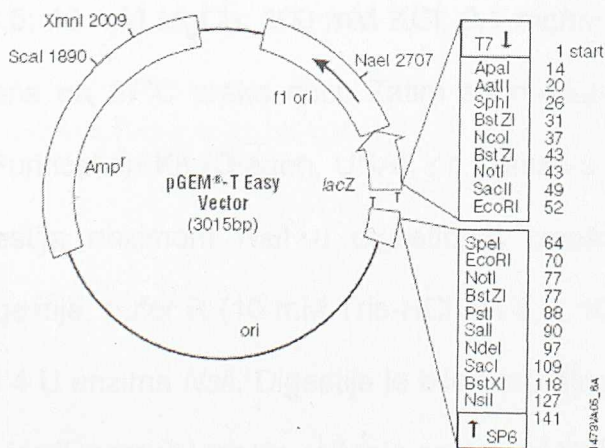
Plazmidna DNK je izolovana iz prekonoćnih bakterijskih kultura QIAprep Spin Miniprep kitom (Qiagen, USA) za izolovanje plazmida, a po uputstvu proizvođača.

3.9 Kloniranje i mutageneza fragmenta lbo I

Fragment lbo I poreklom iz humanog LMNB2 ori dobijen je reakcijom lančanog umnožavanja DNK. Kao matrica korišćena je genomska DNK izolovana iz humanih limfocita sa graničnicima: D: CAAAACGGAGCTGGGCTCAGCTG i E: GACATCCGCCGCTTCATTAGGGCAGAGGCC.

Reakciona smeša, zapremine 50 μ L, sadržavala je PCR pufer (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100), 1,5 mM $MgCl_2$, 800 μ M smešu dNTP-a, 0,5 μ M svakog graničnika, 2 U Taq polimeraze i odgovarajuću plazmidnu DNK kao matricu (1 – 10 ng). DNK je umnožavana u 35 – 45 identičnih ciklusa, uz početnu denaturaciju od 5 min na 94°C i završnu sintezu od 10 min na 72°C. Profil svakog ciklusa umnožavanja je bio sledeći: denaturacija 45 s na 94°C, renaturaciju 30 s na 65°C i sinteza DNK 1 min na 72°C.

Produkti reakcije lančanog umnožavanja su prečišćavani na nativnom poliakrilamidnom gelu i korišćeni u daljem radu. Za kloniranje fragmenta lbo I korišćen je bakterijski vektor pGEM T-Easy (Promega, USA), prikazan na Slici 3.1.



Slika 3.1 Mapa vektora pGEM-T Easy (Promega, USA)

Ligacija željenog fragmenta i vektora vršena je po uputstvu proizvođača. Delom ligacione smeše transformisane su kompetentne bakterijske ćelije soja XL-10 Gold. Posle analize restrikcionim enzimom (*NotI*) i reakcijom lančanog umnožavanja pronađeno je nekoliko pozitivnih klonova. Sekvenciranjem plazmida proverena je sekvenca ugrađenog fragmenta i odabran je jedan klon koji je korišćen u daljim eksperimentima.

Osim intaktnog fragmenta lbo I, konstruisan je mutirani fragment - mutC6, u kome je središnjih 6 T homotiminskog niza na poziciji 3903 – 3908 zamenjeno citidinima. Prvi korak u formiranju fragmenta mutC6 bila je sinteza fragmenta koji je sadržavao šest citidina umesto timina. U tu svrhu, u reakciji lančanog umnožavanja termostabilnom polimerazom korišćeni su graničnici E i C1: TTTTAAGAAGATGCATGCCTAGCGTGTTCTTCCCCCTTCCAATGATTTG.

Ovako dobijeni fragment (C1E) i plazmid sa kloniranim fragmentom lbo I su sećeni enzimima *NsiI* i *XhoI*, jer je trebalo zameniti fragment lbo I izbačen ovim enzimima iz plazmida fragmentom C1E čiji su krajevi obrađeni ovim enzimima. Prvo je vršena digestija enzimom *XhoI* u digestionoj smeši koja je sadržavala DNK (do 2 ng), pufer R (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/mL BSA) i 20 U enzima *XhoI*. Digestija je vršena na 37°C preko noći. Zatim su produkti digestije prečišćeni kitom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA), po uputstvu proizvođača. Potom je sledila parcijalna digestija enzimom *NsiI* u digestionoj smeši koja je sadržavala prečišćeni fragment digestije, pufer R (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/mL BSA) i 4 U enzima *NsiI*. Digestija je bila parcijalna zato što osim mesta u insertu koji je trebalo iseći, postoji i mesto sećenja enzimom *NsiI* u plazmidu. Da bi se povećala efikasnost ligacije i verovatnoća dobijanja željenog produkta ligacije, odgovarajuća traka dobijena posle dvostruke digestije plazmida izolovana je iz

agaroznog gela. Reakcija ligacije ovako prečišćenog fragmenta vektora i odgovarajućeg fragmenta inserta inkubirana je preko noći na 16°C u ligacionom puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/mL BSA) sa 400 U T4 ligaze (New England Biolabs, USA). Delom ligacione smeše transformisane su kompetentne bakterijske ćelije soja XL-1 Blue. Posle analize klonova restrikcionim enzimima pronađeno je nekoliko pozitivnih klonova. Prisustvo željene izmene u nukleotidnoj sekvenci potvrđeno je sekvenciranjem.

3.9.1 Izolovanje fragmenta DNK iz agaroznog gela

Fragmenti DNK su razdvajani elektroforezom u 1% agaroznom gelu pri konstantnoj voltaži od 5 V/cm. Za elektroforezu je korišćen pufer TAE (40 mM Tris acetat; 2 mM EDTA pH 8). Uzorak je nanošen u odgovarajućem puferu za uzorak (50% glicerol u 1xTAE puferu; 0,5% boja oranž G). Po završenoj elektroforezi traka od interesa isecana je iz gela i DNK iz nje izolovana kitom Wizard SV and Gel Kit (Promega, USA), po uputstvu proizvođača.

3.10 Sinteza fragmenta lbo I u kojem je dATP zamenjen 7-deaza-dATP-om

Supstrati koji sadrže 7-deaza-dATP sintetisani su u reakciji lančanog umnožavanja polimerazom, pri čemu je umesto dATP-a, kao nukleotid korišćen 7-deaza-dATP (Jena Bioscience, USA). Reakcione smeše zapremine 50 µL su sadržavale PCR pufer sa 1,5 mM MgCl₂ (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100), 10 mM smešu dNTP-a (dTTP, dCTP, dGTP, 7-deaza-dATP), 0,6 µM svakog graničnika, 2,5 U QIAGEN Taq polimeraze (Qiagen, USA) i odgovarajuću

plazmidnu DNK kao matricu (1 – 50 ng). Program korišćen za umnožavanje bio je isti kao i za fragment lbo I.

3.11 Elektroforeza DNK u nativnom poliakrilamidnom gelu

Elektroforetska analiza produkata reakcija restrukturiranja je vršena u Hoefer Ruby 600 (GE Healthcare, UK) sistemu za elektroforezu. Fragmenti DNK su razdvajani u 4% – 10% nativnim poliakrilamidnim gelovima pri konstantnoj voltaži od 10 – 15 V/cm gela. Za elektroforezu su korišćeni sledeći puferi: TBE (89 mM Tris baza; 89 mM borna kiselina; 2 mM EDTA pH 8,0) i TBM. Uzorci su nanošeni na gelove u odgovarajućim puferima za uzorke. Za TBE PAGE korišćen je pufer za uzorak sastava: 50% glicerol u 1xTBE puferu, 0,25% boje ksilen cijanol i 0,25% boje bromfenol plavo, dok je za TBM PAGE upotrebljavan pufer za uzorak sastava: 50% glicerol u 1xTBM puferu, 0,25% boje ksilen cijanol i 0,25% boje bromfenol plavo.

3.12 Izolovanje fragmenata DNK iz nativnog poliakrilamidnog gela

Produkti reakcije lančane polimerizacije oslobađani su od nespecifičnih traka i neugrađenih graničnika elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu u 1xTBE puferu. Po završenoj elektroforezi, traka od interesa isecana je iz gela i homogenizovana u 300 μ L – 450 μ L dH₂O. Dobijena smeša je inkubirana 1 h na 37°C u termomikseru na 1000 rpm. Propuštanjem kroz kolonicu iz suspenzije su uklanjani parčići akrilamida, a DNK je potom taložena u etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2) i glikogena u svojstvu nosača. Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u dH₂O.

3.13 Elektroforeza DNK u denaturišećem poliakrilamidnom gelu

Dužina fragmenata DNK proveravana je elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Fragmenti su razdvajani u 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu (urea 6M) u 1xTBE puferu. Elektroforeza je vršena pri konstantnoj voltaži od 40 – 50 V/cm. Po završenoj elektroforezi gelovi su autoradiografisani.

3.14 Izolovanje fragmenata DNK iz denaturišućeg poliakrilamidnog gela

Jednolančane DNK izolovane su iz denaturišućeg poliakrilamidnog gela pripremljenog i korišćenog u 1xTBE puferu. Po završenoj elektroforezi, traka od interesa isecana je iz gela i homogenizovana u 100 μ L – 150 μ L dH₂O. Dobijena smeša je inkubirana 2 min na 95°C, i zatim hlađena na sobnu temperaturu. Propuštanjem kroz kolonicu iz suspenzije su uklanjani parčići akrilamida, a dobijena DNK je potom korišćena u daljim eksperimentima.

3.15 Obeležavanje DNK radioaktivnim izotopom ³²P

DNK je obeležavana reakcijom fosforilacije u prisustvu [γ -³²P]ATP i T4 polinukleotid kinaze. Za obeležavanje graničnika (D i E) i monotoni jednolančanih oligonukleotida (poli(dA)_n, poli(dT)_n) reakciona smeša, zapremine 25 μ L, sadržavala je graničnik (12 pmol) ili monotoni oligonukleotid (10 pmol), 1xpufer za fosforilaciju (Fermentas), [γ -³²P]ATP (10 pmola) i 20 - 30 U T4 kinaze (Fermentas). Reakcija fosforilacije se odvijala 45 min na 37°C, a zaustavljanja je inkubacijom 10 min na 65°C. Neugrađeni radioaktivni nukleotidi uklanjani su iz reakcije metodom molekuskog sejanja kroz G-25 sefadeks kolonice (GE Healthcare, UK), po uputstvu proizvođača.

Količina radioaktivnog izotopa inkorporiranog u fragment DNK merena je u scintilacionom brojaču za tečne uzorke. Obeleženi graničnici korišćeni su za dobijanje radioaktivno obeleženih fragmenata lbo I reakcijom lančanog umnožavanja, a monotoni jednolančani oligonukleotidi za ekperimente restrukturiranja posredstvom proteina HsOrc4.

Obeležavanje DNK lestvice od 10 bp vršeno je u reakcionoj smeši (25 μ L) koja je sadržavala DNK lestvicu (100 ng), 1x pufer za fosforilaciju (Fermentas), [γ - 32 P]ATP (2 pmol) i 10 U T4 kinaze (Fermentas). Po inkubaciji na 37°C u trajanju od 45 min, reakciona smeša je propuššana kroz G-25 sefadeks kolonicu i precipitirana dodavanjem glikogena i Na-acetata (pH 5,2) u 95% etanolu. Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u sterilnoj dH₂O. Ovako obeležena lestvica je korišćena na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima kao standard dužine fragmenata DNK.

3.16 Reakcije sa hemijskim agensima specifičnim za neortodoksne strukture DNK

U svim hemijskim reakcijama korišćena je DNK sa jednim obeleženim 5' krajem, što je postignuto ubacivanjem odgovarajućeg obeleženog graničnika u PCR.

3.16.1 Modifikacija DNK osmijumtetraoksidom (OsO₄)

Reakcione smeše, tretirane OsO₄, sadržavale su radioaktivno obeležen fragment DNK (125 fmol), 10 μ g poli(dIdC)·poli(dIdC), 2 μ L piridina i pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol) u zapremini od 24 μ L. Po dodavanju 2% OsO₄ (30 μ L), uzorci su inkubirani 25

min na ledu uz povremeno vorteksovanje. Reakcija je zaustavljena precipitacijom DNK u apsolutnom etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran 70% etanolom, sušen pod vakuumom i tretiran piperidinom.

3.16.2 Modifikacija DNK hlороacetaldehidom (CAA)

Reakcione smeše, tretirane CAA, sadržavale su 1 μ L CAA (55%), radioaktivno obeležen fragment DNK (200 fmol - 500 fmol), 10 μ g poli(dIdC)·poli(dIdC) i pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol) u zapremini od 100 μ L. Uzorci su inkubirani 1 sat na 37°C. Reakcija je zatim hlađena na ledu i DNK precipitirana u apsolutnom etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran 70% etanolom, sušen pod vakuumom i tretiran piperidinom.

3.16.3 Modifikacija DNK dietilpirokarbonatom (DEPC)

Za modifikaciju DEPC-om reakciona smeša, zapremine 100 μ L, sadržavala je pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), radioaktivno obeležen fragment DNK (100 fmol) i 10 μ g poli(dIdC)·poli(dIdC). Po dodavanju 10 μ L DEPC-a, uzorci su inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi uz povremeno vorteksovanje. Reakcija je zaustavljena precipitacijom DNK u apsolutnom etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran 70% etanolom, sušen pod vakuumom i tretiran piperidinom.

3.16.4 Sekvenciranje DNK metodom Maksama i Gliberta

Purinske baze u fragmentima DNK detektovane su sekvenciranjem po Maksamovom i Gilbertovom principu. Reakciona smeša, zapremine 10 μL , sadržavala je radioaktivno obeležen DNK fragment (50 fmol – 250 fmol) i 1 μg poli(dIdC)·poli(dIdC). Dodavanjem 4% mravlje kiseline (1 μL) i inkubacijom 25 min na 37°C modifikovane su purinske baze, a zatim je modifikovana DNK depurinisana i isprekidana piperidinom.

3.16.5 Tretman DNK piperidinom

Uklanjanje modifikovanih baza i stvaranje jednolančanih prekida u molekulu DNK je vršeno dodavanjem 150 μL 1 M piperidina po jednom uzorku. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 90°C, a potom hlađena 5 min na ledu. Ovako fragmentisana DNK oslobađana je od piperidina uzastopnim ekstrakcijama *n*-butanolom. Prvo je dodavan 1 mL *n*-butanola, smeša je vorteksovana i centrifugirana, 10 min na 11400 g. Po uklanjanju supernatanta, u talog je dodavan *n*-butanol (1 mL) i 1% SDS (150 μL), a smeša je vorteksovana i centrifugirana 3 min na 11400 g, nakon čega je odstranjen supernatant. Uzorak je potom ispiran dva puta sa po 0,5 mL *n*-butanola, osušen pod vakuumom i precipitiran u apsolutnom etanolu pomoću glikogena i Na-acetatnog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u puferu za nanošenje uzoraka na denaturišići gel (95% dejonizovan formamid; 0,37% Na₂EDTA pH 7,0; 0,3% boja ksilen cijanol i 0,3% boja bromfenol plavo). Kod produkata reakcije sekvenciranja tretiranih piperidinom korak precipitacije je izostajao. Pre nanošenja na gel, uzorci su denaturisani 5 min na 95°C.

3.17 Hidroliza DNK Dezoksiribonukleazom I (DNaza I)

Pre enzimske reakcije, uzorci su inkubirani u puferu za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), 2h na 25°C. Parcijalna hidroliza vršena je u smeši zapremine 4 – 6 µL. 300 fmol – 400 fmol probe je tretirano sa 0,3 U DNaze I (GE Healthcare, UK) u prisustvu 1 µg nespecifične DNK (poli(dGdC)·poli(dGdC)), a enzim je razblaživan u dilucionom puferu (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂; 10% glicerol). Do dodavanja endonukleaze reakcione smeše su držane na ledu, a sama reakcija odvijala se na sobnoj temperaturi. Reakcije su zaustavljane dodavanjem iste zapremine stop pufera (200 µg/mL proteinaze K; 10 mM EGTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) i inkubiranjem 1 h na 55°C. Uzorci su pripremani za elektroforezu dodavanjem iste zapremine pufera za nanošenje uzoraka (95% dejonizovan formamid; 0,37% Na₂EDTA pH 7,0; 0,3% boja ksilen cijanol i 0,3% boja bromfenol plavo) i potonjim denaturisanjem 5 min na 95°C. Produkti sečenja DNazom I su razdvajani u 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

3.18 Reakcije restrukturiranja DNK

Uticao proteina na restrukturiranje DNK ispitivan je na različitim jednolančanim supstratima. U tu svrhu, radioaktivno obeleženi fragmenti lbo I rastvoren je u vodi, u koncentraciji 1 fmol/µL. Dvolančani fragment je zatim denaturisan inkubacijom na temperaturi od 95°C u trajanju od 10 min. Denaturisani uzorak DNK (3 – 4 µL) je brzo razblaživan u puferu A2 prethodno zagrejanom na 37°C (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 2 mM ZnCl₂; 24 mM MgCl₂; 0,1 mM ATP; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT i 0,1 mM PMSF). Osim u kontrolnim reakcijama, u ovaj pufer bio je dodat protein HsOrc4, u

količini 1 ng – 500 ng. Reakcione smeše su zatim inkubirane na 37°C, 15 min, ili kao što je opisano uz različite eksperimente. Uz kontrole bez proteina, rađene su i kontrolne reakcije sa denaturisanim proteinom HsOrc4 i proteinima BSA i SSB. Ove reakcije su postavljane kao što je prethodno opisano, dok su količine proteina HsOrc4, BSA i SSB bile 200 ng. U nekim eksperimentima varirana je koncentracija magnezijumovih jona u opsegu od 1 mM do 50 mM. Posle inkubacije na 37°C reakcione smeše su brzo hladene na ledu. U nekim slučajevima uzorcima je dodavan rastvor 1 M NaCl i 1% SDS, a zatim su deproteinisani mešavinom hloroforma i izoamilalkohola. U drugim slučajevima protein je uklanjao proteinazom K koja je dodavana u količini 1 µg - 5 µg i u rastvoru 0,1% – 0,5% SDS. Digestija proteinazom vršena je 15 min na 37°C. Produkti reakcija su analizirani elektroforezom u 5% ili 8% TBM poliakrilamidnim gelovima.

U reakcijama u kojima su kao supstrati korišćeni jednolančani oligonukleotidi, 1 fmol – 4 fmol obeleženog jednolančanog nukleotida (dA)₄₀ rastvorenog u puferu A1 (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 2 mM ZnCl₂; 20 mM MgCl₂; 0,1 mM ATP; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 mM PMSF) inkubirano je sa 1 ng do 500 ng proteina HsOrc4 ili bez njega. Inkubacija je vršena u termomikseru, na 37°C i uz konstantno mućkanje na 600 rpm. Tipična reakciona smeša imala je zapreminu 25 µL. U nekim eksperimentima, kao što je opisano u Rezultatima, reakcione smeše su sadržale i 20 mM EDTA ili su varirane koncentracije Mg²⁺ jona u opsegu 1 mM – 50 mM (1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM). Reakcije u kojima je ispitivana sposobnost mutiranih proteina HsOrc4 WA i HsOrc4 WB da formiraju višelančane oligoadeninske strukture sadržale su ove proteine u koncentracijama od 10 ng do 200 ng. Gde je naglašeno, jednolančani oligonukleotidi su inkubirani sa viškom odgovarajućeg komplementarnog lanca. Uzorci su posle inkubacije deproteinizovani delovanjem proteinaze K, a zatim analizirani na TBM PAGE i autoradiografisani.

Odabrani rezultati su kvantifikovani u OptiQuant softveru na Cyclone™ Storage Phosphor System (Perkin Elmer).

U nekim slučajevima, u reakcijama restrukturiranja korišćeni su parcijalno jednolančani supstrati sintetisani od dATP-a ili 7-deaza-ATP-a. Ovi supstrati pripremljeni su od fragmenta lbo I kome su terminalnom TdT-om, sa dATP ili 7-deaza-ATP kao supstratima, produžavani 3' krajevi. Reakciona smeša je sadržavala oko 1 pmol fragmenta DNK, 30 – 40 U TdT (Fermentas Life Sciences), 120 mM dATP ili 150 mM 7-deaza-dATP u volumenu od 20 μ L u puferu za TdT (200 mM kalijum kakodilat; 25 mM Tris baza, pH 7,2; 1 mM CoCl_2 ; 0,01% Triton X-100). Reakcione smeše su inkubirane 15 min na 37°C, a reakcije zatim zaustavljane dodavanjem 2 μ L 0,5 M EDTA. Ovako sintetisani supstrati korišćeni su posle etanolske precipitacije ili posle prečišćanja nativnom PAGE.

4 REZULTATI

Rezultati ovoga rada podeljeni su u četiri celine. U prvom delu opisana je konstrukcija i ekspresija proteina potrebnih za izučavanje potencijalnog uticaja proteina HsOrc4 na strukturu DNK. Ovaj deo se odnosi na konstrukciju mutiranih formi rekombinantnog proteina HsOrc4 koje imaju neaktivne domene za vezivanje (HsOrc4 WA) ili za hidrolizu vezanog ATP-a (HsOrc4 WB), kao i na standardizaciju ekspresije i izolacije mutiranih proteina. U drugom delu dodatno je testirana DNK vezivna aktivnost proteina HsOrc4 sa ciljem da se pokaže da razvijeni protokol za purifikaciju proteina daje samo jednu DNK vezivnu aktivnost, sadržanu u proteinu HsOrc4. Ovo je bilo neophodno kao dokaz da isključivo protein HsOrc4, a ne neka od mogućih kontaminacija, utiče na DNK na način opisan u radu. U trećem delu rezultata dodatno su ispitana neortodoksna strukturna svojstva fragmenta Ibo I poreklom iz humanog ori LMNB2, sa ciljem da se ovaj fragment upotrebi kao jedan od supstrata u reakcijama restrukturiranja izazvanog proteinom HsOrc4. Poslednji deo rezultata opisuje novootkrivenu sposobnost HsOrc4 da restrukturira različite DNK supstrate i da izazove formiranje složenih višelančanih struktura.

4.1 Rekombinatni humani Orc4 (HsOrc4) protein i njegove mutirane forme

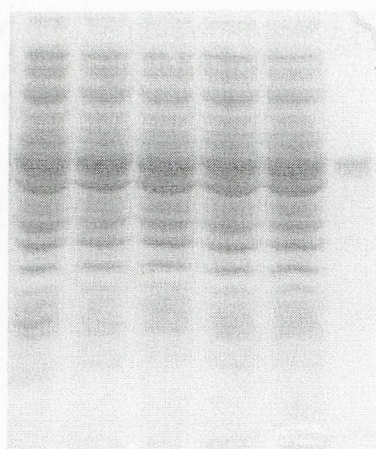
4.1.1 Konstrukcija ekspresionih plazmida

DNK-vezivni protein HsOrc4 predstavlja deo inicijatornog kompleksa ORC. HsOrc4 pripada superfamiliji AAA+ proteina za koje je karakteristično da posle

vezivanja ATP-a prolaze kroz konformacionu promenu ili je indukuju u svojim partnerima (142). Oba motiva karakteristična za ovu superfamiliju, Voker A i Voker B, očuvana su kod proteina HsOrc4. Voker A motiv je mesto kontakta sa nukleotidima, dok je Voker B motiv mesto vezivanja jona Mg^{2+} neophodnog za hidrolizu ATP-a (136). Da bi se bolje okarakterisala uloga ATP-a u interakcijama proteina HsOrc4 i DNK, konstruisani su i eksprimirani mutirani proteini HsOrc4 – HsOrc4 WA i HsOrc4 WB. Kod HsOrc4 WA mutanta izmenjen je domen za vezivanje ATP-a, a kod HsOrc4 WB mutanta domen odgovoran za hidrolizu ATP-a. Kod mutiranog proteina HsOrc4 WA lizin na mestu 73 iz očuvanog GKT motiva, zamenjen je alaninom (GKT u GAT). Mutiranom proteinu HsOrc4 WB, u aktivnom mestu u okviru domena Voker B, su zamenjeni asparinska kiselina na mestu 159 i glutaminska kiselina na mestu 160, alaninima (DE u AA).

4.1.2 Ekspresija i izolacija proteina divljeg tipa i mutiranih proteina

HsOrc4 divljeg tipa, kao i mutirani proteini, eksprimirani su u *E. coli* soju M15(pREP4). Optimalni uslovi ekspresije proteina divljeg tipa ranije su određeni poređenjem količina proteina izolovanih iz približno iste količine bakterijskih ćelija i ovi uslovi su primenjeni i za ekspresiju mutiranih proteina. Primećeno je da je nivo ekspresije mutiranih proteina, naročito HsOrc4 WB, niži u odnosu na nivo ekspresije proteina divljeg tipa. Nivo ekspresije mutiranih proteina proveren je elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima (Slika 4.1) ili na proteinskim čipovima za Agilent Bioanalyzer 2100.



1 2 3 4 5 6

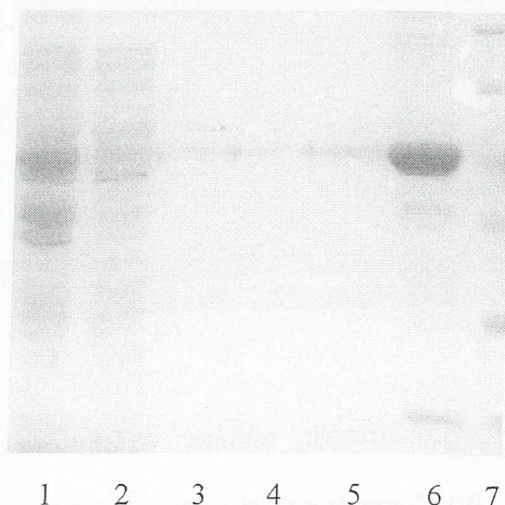
Slika 4.1. Ekspresija proteina HsOrc4 WA.

Bakterijski lizati različitih klonova koji ekspimiraju HsOrc4 WA (1 – 5) i prečišćeni HsOrc4 (6) analizirani elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu i bojeni komasi plavim

Analizom bakterijskih lizata elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu pronađeni su klonovi koji ekspimiraju mutirane proteine. Iako je nivo ekspresije mutiranih proteina bio niži u odnosu na nivo ekspresije proteina divljeg tipa on je ipak bio dovoljan da se nastavi sa procesom izolacije ovih proteina iz bakterijskih lizata.

Procedura za izolaciju proteina divljeg tipa opisana je u poglavlju Materijal i Metode. Na isti način su izolovani i mutirani proteini. Međutim, u slučaju mutiranih proteina ovim postupkom su dobijeni preparati zadovoljavajuće čistoće, ali ne i koncentracije, pa su uslovi izolacije optimizovani. U toku izolacije dodati su različiti deterdženti (NP40 ili CHAPS), NaCl ili ATP. Prinos prečišćenog HsOrc4 WA mutanta povećan je kada je izolacija vršena u puferu sa visokom koncentracijom NaCl (1 M). Izvesno povećanje prinosa HsOrc4 WB mutanta primećeno je u preparatima izolovanim u prisustvu ATP-a. I u ovom slučaju su prinos i čistoća preparata

proveravani ili elektroforezom u SDS gelovima (Slika 4.2) ili na proteinskim čipovima na Agilent Bioanalyzer 2100 aparatu.

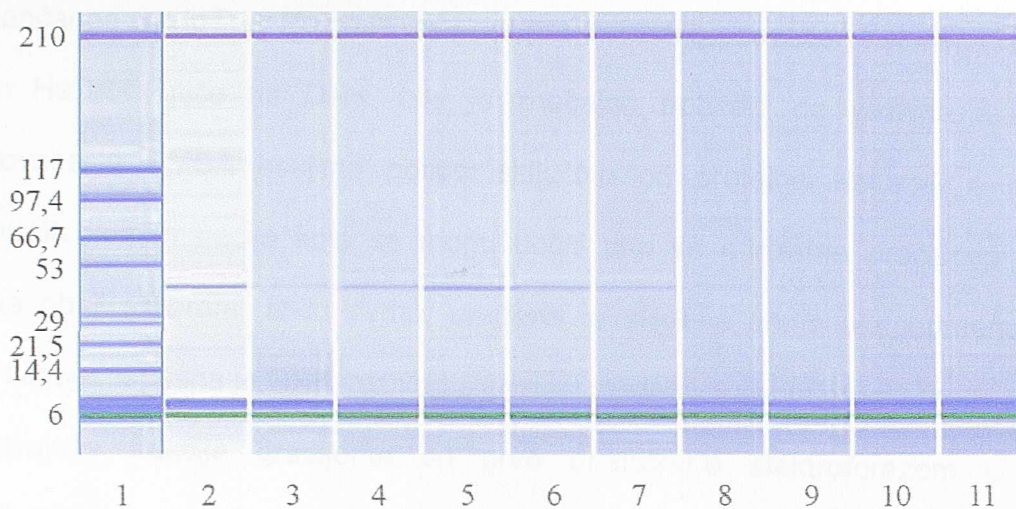


Slika 4.2. Prečišćavanje proteina HsOrc4 WA.

Elektroforetska analiza u SDS poliakrilamidnom gelu bakterijskog lizata lizata posle sonifikacije (1), preparata posle vezivanja za smolu (2), tri pranja (3 – 5) i prečišćenog preparata odabranog klona koji eksprimira HsOrc4 WA (6), marker molekulske mase (7). Uzorci su bojeni komasi plavim

Uslovi za izolaciju mutiranih proteina koji su optimizovani na ovaj način obezbedili su da se dobiju količine proteina dovoljne za dalji rad.

Da bi se proteinski preparati oslobodili insolubilnih agregata i da bi im se povećala čistoća, izvršeno je dodatno prečišćavanje centrifugiranjem u gradijenu glicerola, kao što je opisano u sekciji Materijal i Metode. Posle centrifugiranja gradijenti su frakcionisani i analizirani na proteinskom čipu (Slika 4.3).



Slika 4.3. Elektroforetska analiza frakcija glicerolskog gradijenta HsOrc4 WA na proteinskom čipu Protein 230 za Agilent Bioanalyzer 2100.

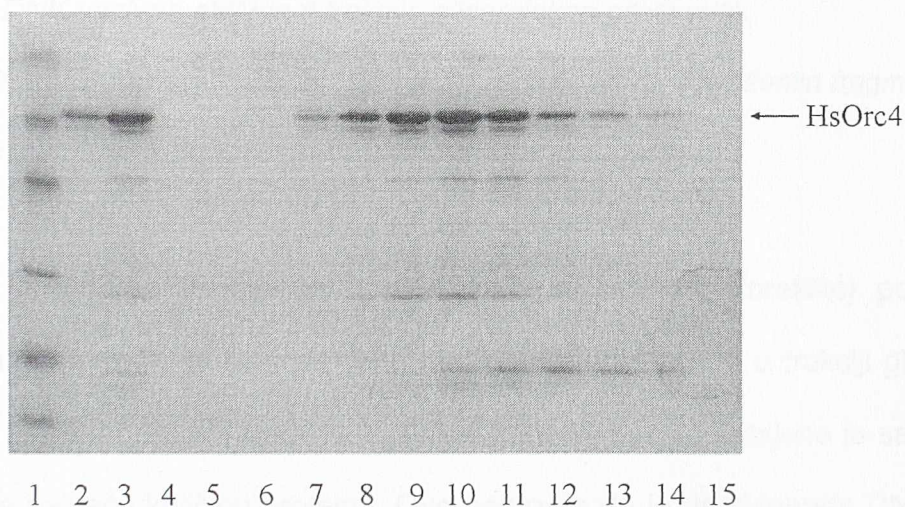
Marker molekulske mase (1), preparat nanet na glicerolski gradijent (2), frakcije glicerolskog gradijenta od 13 do 20 (3 – 10) u kojima je detektovan maksimalna količina proteina, dno gradijenta (11)

Frakcije glicerolskih gradijenata su analizirane elektroforezom u SDS poliakrilamidnim gelovima ili na proteinskim čipovima, i one u kojima je detektovan protein sakupljene su i zatim razdvojene u delove koji su do korišćenja čuvani na -80°C. Na ovaj način su obezbeđeni preparati dovoljne koncentracije i čistoće za korišćenje u daljim esejima.

4.2 Interakcije proteina HsOrc4 i DNK

Ranije je pokazano da se protein HsOrc4 kooperativno vezuje za različite, adeninom i timinom bogate fragmente ori sekvenci LMNB2 i DHFR, za duge sintetske kopolimere sastavljene iz naizmeničnih ili monotonih adenina i timina, kao i za kratki trolančani molekul $(dT)_{40} \cdot (dA)_{40} \cdot (dT)_{40}$, formiran od dupleksa $(dA)_{40} \cdot (dT)_{40}$ i

jednolančanog poli(dT)₄₀. Pošto je ovaj rad prevashodno posvećen načinima na koje protein HsOrc4 utiče na DNK, bilo je značajno potvrditi da vezivna aktivnost detektovana u EMSA esejima potiče isključivo od proteina HsOrc4, a ne od bakterijskih kontaminacija koje se mogu uočiti ako se afinitetno prečišćeni izolat proteina oboji srebrom. U tu svrhu, urađena je sledeća serija eksperimenata. U prvom koraku, ispitana je DNK vezivna aktivnost različitih frakcija gradijenta glicerola. Odgovarajuće frakcije gradijenta su prvo analizirane elektroforezom u SDS poliakrilamidnom gelu, koji je zatim bojen srebrom (Slika 4.4). Na Slici 4.4 se osim proteina HsOrc4 uočava još nekoliko proteina manje molekulske težine koji mogu biti proteolitički fragmenti rekombinantnog proteina ili bakterijske kontaminacije.

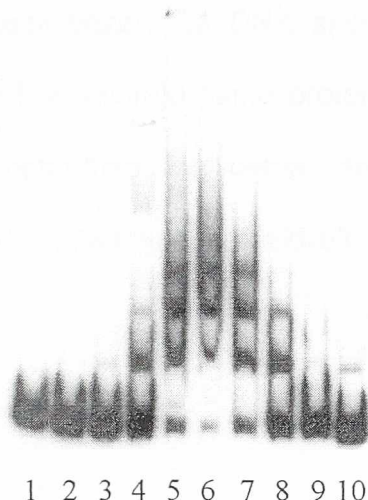


Slika 4.4. Analiza pojedinačnih frakcija glicerolskog gradijenta SDS PAG elektroforezom i bojenjem srebrom.

Marker molekulske mase (1), ranije prečišćeni HsOrc4 (2), start – preparat koji je nanet na glicerolski gradijent (3) i frakcije 10 do 21 glicerolskog gradijenta (5 – 14)

DNK vezivna aktivnost frakcija glicerolskog gradijenta ispitana je EMSA esejom sa obeleženim fragmentom lbo I, poreklom iz LMNB2 ori čoveka. Frakcije glicerolskog gradijenta su inkubirane 1 sat na 25°C zajedno sa obeleženim

fragmentom Ibo I, a onda su produkti reakcije analizirani elektroforezom u 5% TBM poliakrilamidnom gelu (Slika 4.5).



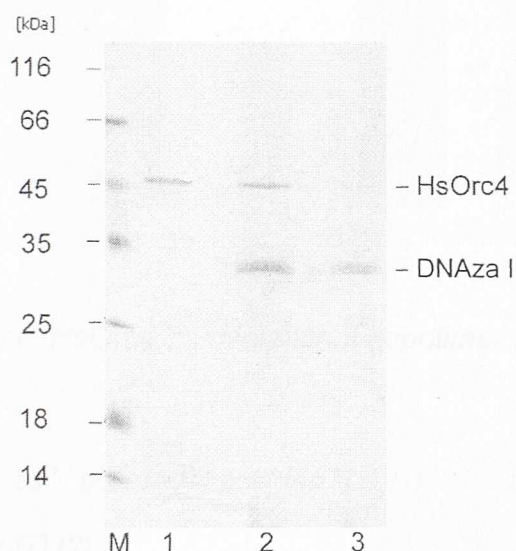
Slika 4.5. DNK vezivna aktivnost frakcija glicerolskog gradijenta.

EMSA esej frakcija 11 do 20 glicerolskog gradijenta sa obeleženim fragmentom Ibo I (2 – 10). Kontrolna reakcija bez proteina (1)

Do formiranja kompleksa, tj. do promene u elektroforetskoj pokretljivosti fragmenta Ibo I, došlo je samo u onim reakcijama u kojima je u frakciji glicerolskog gradijenta prisutan protein HsOrc4, a maksimalno vezivanje dobijeno je sa uzorcima koji sadrže najveću količinu proteina. Ovo pokazuje da je detektovana DNK-vezivna aktivnost u potpunosti korelisana sa proteinom HsOrc4. U reakcijama se takođe može primetiti da se formiraju višestruki kompleksi između proteina i DNK, što je u skladu sa ranije opaženim kooperativnim vezivanjem proteina HsOrc4 za LMNB2.

Frakcije koje sadrže najveću količinu proteina i pokazuju maksimalnu vezivnu aktivnost dodatno su ispitane je afinitetnom hromatografijom na sintetičkim polinukleotidima. Pošto su polisintetski nukleotidi biotinom vezani za magnetne kuglice obložene streptavidinom, ova metoda se naziva i streptavidinskim „pull down“-om. U esejima su korišćeni dugi dvolančani sintetski kopolimeri – naizmenični

poli(dAdT)·poli(dAdT) i poli(dGdC)·poli(dGdC) i homogeni, dvolančani i delimično trolančani, poli(dA)·poli(dT). Kopolimeri vezani za magnetni medijum inkubirani su sa preparatom HsOrc4, a proteini vezani za DNK skinuti su sa magnetnih kuglica enzimom DNaza I. DNazom I se eluiraju samo proteini vezani za DNK, a ne i oni nespecifično asocirani s magnetnim kuglicama, što obezbeđuje specifičnost i selektivnost eseja. Na Slici 4.6 prikazana je elektroforetska analiza produkata „pull down“ eseja.

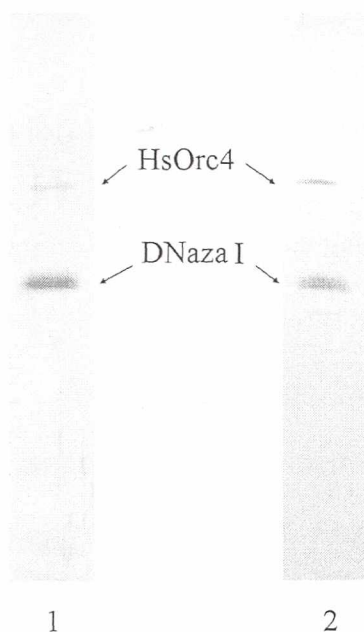


Slika 4.6. Vezivanje HsOrc4 za naizmenične duge poli(dAdT)·poli(dAdT) i poli(dGdC)·poli(dGdC) kopolimere.

HsOrc4 (1) vezan za dvolančani kopolimer poli(dAdT)·poli(dAdT) (2) i dvolančani kopolimer poli(dGdC)·poli(dGdC) (3)

U eksperimentima sa naizmeničnim dvolančanim kopolimerima pokazano je da se HsOrc4 vezuje sa velikim afinitetom za poli(dAdT)·poli(dAdT), dok je njegovo vezivanje za poli(dGdC)·poli(dGdC) gotovo zanemarljivo, što je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima.

Takođe je pokazano da se HsOrc4 vezuje i za dvolančani i za delimično trolančanu DNK sa približno jednakim afinitetom (Slika 4.7).



Slika 4.7. Vezivanje HsOrc4 za dvolančani kopolimer AT i delimično trolančani kopolimer TAT.

HsOrc4 vezan za $\text{poly(dAdT)} \cdot \text{poly(dAdT)}$ (1) i za delimično trolančani $(dT)_{40} \cdot \text{poly(dA)} \cdot \text{poly(dT)}$ (2)

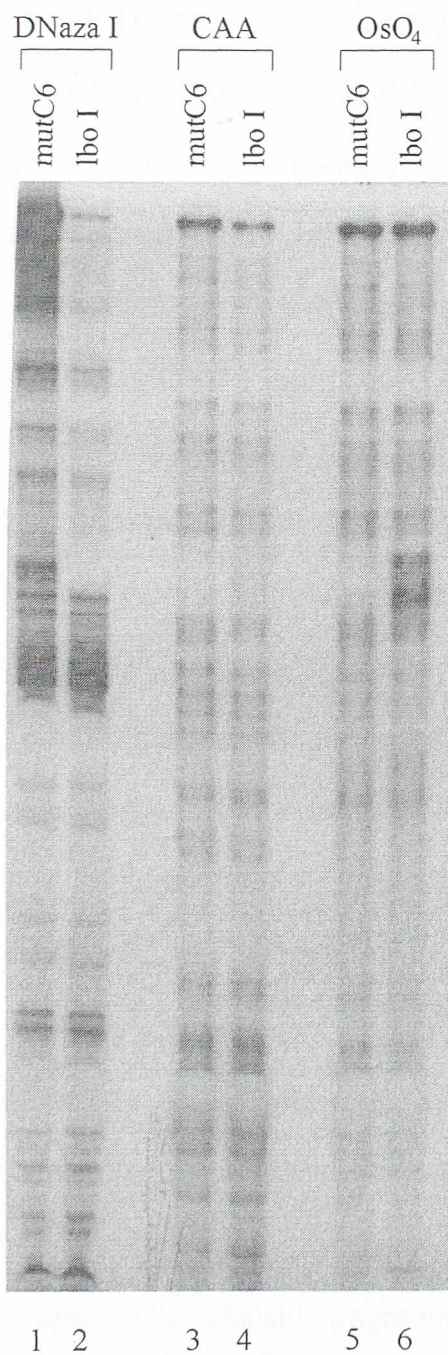
Ovom serijom eksperimenata potvrđeno je da u pripremljenom preparatu jedino HsOrc4 pokazuje afinitet za DNK. Takođe je potvrđeno da se HsOrc4 direktno vezuje za sintetske i prirodne molekule DNK bogate AT parovima. Pošto je velika zastupljenost A i T nukleotida jedna od karakteristika *ori* fragmenata, preferencija za AT bogatu DNK može da predstavlja značajnu osobinu proteina HsOrc4 koja mu omogućava prepoznavanje *ori* DNK i obezbeđuje relativnu selektivnost u interakcija sa ovim regionima. Sa preparatima pripremljenim na sličan način urađeni su i eksperimenti u kojima je je ispitano da li vezivanje i /ili hidroliza ATP-a utiču na DNK vezivna svojstva proteina HsOrc4. Pošto je utvrđeno da ATP ne utiče na efikasnost

vezivanja proteina HsOrc4 za DNK, mutantni proteini nisu bili testirani u reakcijama vezivanja.

4.3 Struktura fragmenata Ibo I, njegovog C6 mutanta i 7-deaza Ibo I

Kao što je pokazano ranije, fragment Ibo I zauzima neortodoksnu strukturu (89). Na osnovu delovanja različitih hemijskih agenasa specifičnih za jednolančane regione DNK, kao i na osnovu reakcije sa antitelom koje prevashodno interaguje sa trolančanom DNK, neortodokсна struktura je identifikovana kao intramolekulski tripleks tipa upletenog čvora (eng. braided knot). Rezultati su takođe sugerisali da ova trolančana struktura nastaje interakcijom centralnih timina strukture nalik okcu u regionu 3900-3912 i jednog od kraćih, nesusednih nizova (dA)·(dT). Da bi se bolje okarakterisala neortodokсна struktura koju zauzima fragment Ibo I, konstruisan je mutirani fragment - mutC6, u kome je središnjih 6 T homotiminskog niza (3903 – 3908) koji učestvuje u formiranju okca, zamenjeno citidinima. Struktura mutiranog, kao i originalnog fragmenta, ispitivana je hemijskim agensima specifičnim za jednolančanu DNK. Ovi agensi modifikuju pojedine baze u strukturama različitim od B-forme. Modifikovana DNK se zatim tretira piperidinom, što dovodi do isecanja modifikovane baze i stvaranja jednolančanog prekida u molekulu DNK. Specifičnost interakcije zavisi od tipa nukleotida i strukture DNK u kojoj se dati nukleotid nalazi. U ovom radu korišćena su dva hemijska agensa: osmijumtetraoksid (OsO_4), koji u prisustvu piridina efikasno modifikuje timin, i u manjem stepenu citozin, u jednolančanoj DNK, i hloroacetaldehid (CAA) koji modifikuje nesporene adenine i citozine i u manjoj meri guanine (143). Na Slici 4.8 je prikazana analiza produkata

hemijskih eseja (Slika 4.8). Osim hemijskih agenasa korišćena je i DNaza I koja dvolančanu DNK hidrolizuje mnogo efikasnije nego jednolančanu.



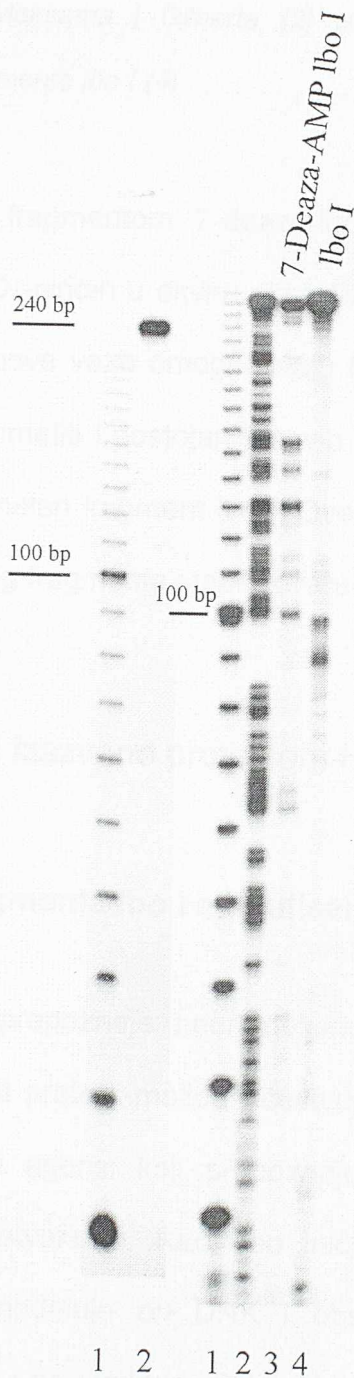
Slika 4.8. Osetljivost fragmenata *mutC6* i *lbo I* na različite hemijske agense.

Parcijalna hidroliza fragmenta *mutC6* (1) i *lbo I* (2) enzimom DNaza I, modifikacija *mutC6* (3) i fragmenta *lbo I* (4) agensom CAA, modifikacija *mutC6* (5) i fragmenta *lbo I* (6) agensom OsO_4

U skladu sa ranijim rezultatima, najveću reaktivnost na OsO_4 u fragmentu lbo I pokazao je niz od 10 timina koji formira okce i učestvuje u formiranju trolančanog regiona (Slika 4.8, linije 5 i 6). U fragmentu mutC6 nije uočena reaktivnost u ovom regionu, što se moglo objasniti ili strukturnom različitosti dva fragmenta ili manjom osetljivošću citozina na primenjeni hemijski agens. Radi utvrđivanja koja od ove dve mogućnosti odgovara istini, fragmenti lbo I i mut C6 bili su tretirani DNazom I koja najefikasnije hidrolizuje dvolančanu DNK, a mnogo manje efikasno jednolančane delove. U fragmentu lbo I region okca bio je mnogo manje osetljiv na DNazu I nego odgovarajući region fragmenta mutC6, što je pokazalo da u prvom fragmentu ovaj region ima otvorenu, a u drugom dvolančanu strukturu (Slika 4.8, linije 1 i 2). Osim toga, profili sečenja normalnog i mutiranog fragmenta piperidinom, posle modifikacije baza hloraacetaldehidom ne razlikuju se značajno. U ovom slučaju, fragment lbo I je rezistentan na CAA zato što u regionu okca ima timine, a fragment mutC6 zato što nema okce. Kombinovanim hemijskim agensima pokazano je da fragment koji umesto centralnih timina u regionu 3900 – 3912 sadrži 6 citozina ne formira neortodoksnu strukturu, što znači da su centralni AT parovi neophodni za formiranje neortodoksne strukture i ne mogu biti zamenjeni GC parovima.

U formiranju trolančane strukture DNK uvek kao centralni lanac učestvuje purinski lanac. Centralni lanac u tripleksu istovremeno formira dva tipa veza – veze Votson-Krikovog tipa drže dvolančanu strukturu zajedno, dok veze Hugstinovog tipa vezuju treći lanac za dupleks. U slučaju fragmenta lbo I Hugstinove veze omogućavaju da okce ostane otvoreno tj. da ne dođe do reasocijacije lanaca bogatog timinima sa lancem bogatim adeninima. Ukoliko bi lanac sadržao nukleotide koji ne mogu da formiraju Hugstinove veze, ne bi bilo moguće formiranje trolančane strukture i došlo bi do promene osetljivosti fragmenta na OsO_4 . Radi testiranja

značaja Hugstinovih veza za održavanje neortodoksne strukture fragmenta lbo I, sintetisan je fragment lbo I koji umesto dATP-a sadrži 7-deaza-dATP. 7-deaza-dATP ne može da formira Hugstinove veze jer nema azot koji bi učestvovao u njihovom formiranju i zbog toga neće moći da formira tripleks. Posle sinteze fragment 7-deaza-lbo I prečišćen je na nativnoj PAGE, a njegova veličina i celovitost su provereni elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu (Slika 4.9). Ovako pripremljen fragment zatim je podvrgnut tretmanu OsO_4 (Slika 4.9).



Slika 4.9. Modifikacija fragmenta 7-deaza-*Ibo I* OsO_4 .

Levi panel. Pokretljivost fragmenta 7-deaza-*Ibo I* (2) u denaturišućem poliakrilamidnom gelu poređena sa standardom dužine – lestvica 10 bp (1).

Desni panel. Marker dužine DNK (1), G+A sekvenca gornjeg lanca fragmenta lbo I određena po metodi Maksama i Gilberta (2) modifikacija OsO₄ 7-deaza-dATP fragmenta lbo I (3) i fragmenta lbo I (4)

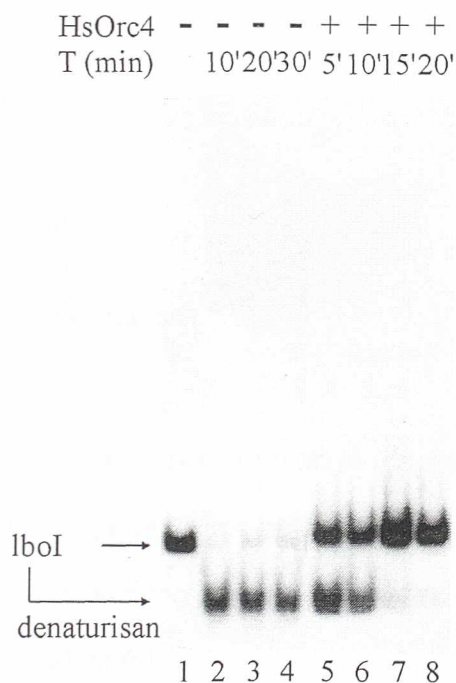
U eksperimentima sa fragmentom 7-deaza-lbo I primećuje se dramatično smanjenje osetljivosti na OsO₄-piridin u okviru okca (Slika 4.9, desni panel, linija 3), čime je pokazano da Hugstinove veze omogućavaju formiranje specifične strukture lbo I. Pored toga može se primetiti i postojanje novih signala u okviru fragmenta 7-deaza-lbo I u odnosu na normalan fragment lbo I. Ovo može da ukaže na to da su i neki drugi delovi strukture ovog fragmenta stabilizovani formiranjem tripleksa.

4.4 Restrukturiranje DNK izazvano proteinom HsOrc4

4.4.1 Restrukturiranje fragmenta lbo I stimulisano proteinom HsOrc4

Činjenica da HsOrc4 prepoznaje neortodoksnu strukturu fragmenta lbo I navodi na pretpostavku da isti protein možda učestvuje i u njenom formiranju, na sličan način na koji hemijski agensi koji prepoznaju i stabilizuju neortodoksne strukture stimulišu i njihovo stvaranje. Kao deo inicijacionog kompleksa čija je prevashodna funkcija da remodeluje *ori* DNK i obezbedi pristup replikacionoj mašiniriji, HsOrc4 može uticati i na strukturu DNK. U prilog ovakvoj funkciji govori i činjenica da HsOrc4 pripada superfamiliji AAA+ proteina klasifikovanih kao makromolekulski šaperoni, sposobni da na račun energije dobijene hidrolizom ATP-a promene strukturu različitih bioloških supstrata. Radi testiranja uticaja proteina HsOrc4 na strukturu DNK razvijen je sledeći esej. Radioaktivno obeleženi fragment lbo I je denaturisan desetominutnim inkubiranjem na 95°C, a zatim brzo prenesen u

pufer za vezivanje preinkubiran na 37°C, i dodatno inkubiran na istoj temperaturi, u prisustvu proteina HsOrc4 ili bez njega. U svim eksperimentima restrukturiranja Ibo I posredstvom HsOrc4 korišćen je pufer u kome je prethodno ispitivana struktura ori sekvence ili vezivanje proteina za ori sekvencu. Po završetku inkubacije, smeše su brzo ohlađene na ledu, deproteinisane i analizirane TBM-PAGE koja je izvođena na 4°C (Slika 4.10).

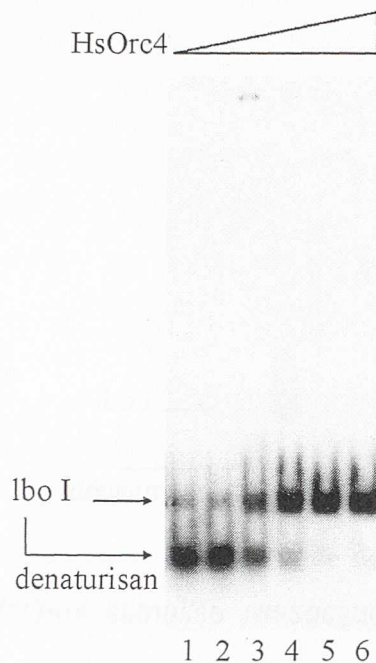


Slika 4.10. HsOrc4 stimuliše renaturaciju fragmenta Ibo I.

Obeleženi fragment Ibo I je denaturisan i onda inkubiran na 37°C bez HsOrc4 i sa njim (150 ng). Vremena inkubacije su prikazana na slici

Na Slici 4.10. vidi se da je bez proteina tek mali deo Ibo I bio renaturisan posle pola sata inkubacije na 37°C, dok je sa proteinom renaturacija bila gotovo kompletna već posle 15 minuta. Kako je povećavano vreme inkubacije sa HsOrc4, tako se povećavala i količina renaturisanog produkta.

Sličan ekperiment je izveden je sa različitim količinama proteina HsOrc4, pri čemu je vreme inkubacije bilo isto za sve uzorke. Na Slici 4.11. su prikazani produkti ovih reakcija.



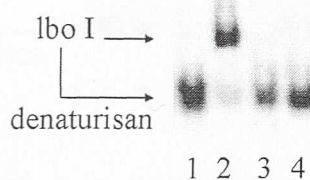
Slika 4.11. Efekat proteina HsOrc4 proporcionalan je njegovoj količini.

Denaturisani fragment Ibo I je inkubiran na 37°C sa različitim količinama HsOrc4 u trajanju od 15 min. Količine dodatog proteina su bile 25 ng (1), 50 ng (2), 100 ng (3), 150 ng (4), 250 ng (5) i 500 ng (6).

Može se primetiti da je sa povećanjem količine proteina povećava i količina renaturisanog produkta. Na ovaj način je pokazano da HsOrc4 stimuliše renaturaciju ispitivane *ori* DNK.

U sledećem eksperimentu ispitano je da li denaturacija proteina uništava i njegovu sposobnost da stimuliše renaturaciju *ori* DNK. Pored toga u eksperimentu su korišćeni i drugi proteini kao kontrole, BSA (Bovine Serum Albumin) i SSB (Single-Stranded DNA Binding Protein) (Slika 4.12). Ovi proteini su uključeni u reakcije da bi se utvrdilo da li je uticaj na strukturu DNK svojstven samo proteinu HsOrc4.

	denaturisan	+	-	-	-
HsOrc4	nativan	-	+	-	-
	BSA	-	-	+	-
	SSB	-	-	-	+



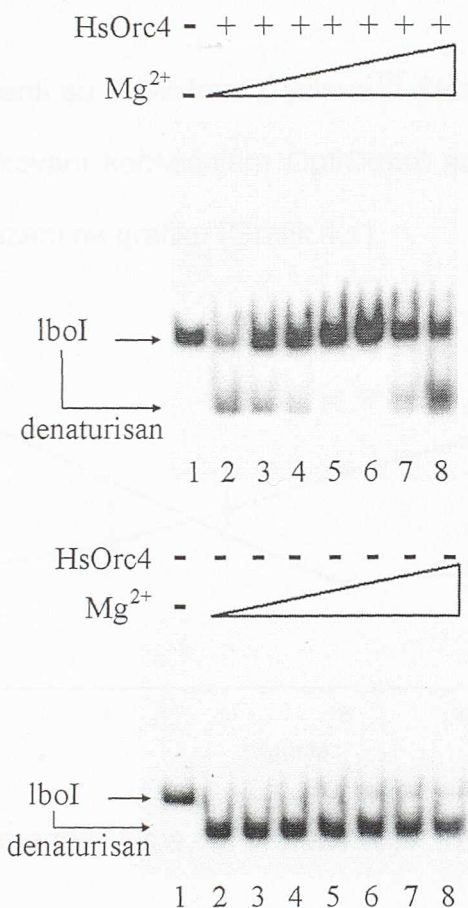
Slika 4.12. Samo intaktni HsOrc4 stimuliše reasocijaciju komplementarnih lanaca fragmenta lbo I.

Denaturisani fragment lbo I je inkubiran sa identičnim količinama (200ng) denaturisanog HsOrc4 (1), nativnog HsOrc4 (2), BSA (3) i SSB (4)

Rezultati eksperimenta ukazuju na to da je sposobnost da stimuliše renaturaciju specifično svojstvo nativnog HsOrc4 proteina. Ostali proteini korišćeni u eksperimentu, kao ni denaturisani HsOrc4 nemaju uticaja na renaturaciju fragmenta lbo I.

Protein HsOrc4 pripada porodici AAA+ ATPaza. Za funkcionisanje ove grupe proteina, tj. da bi ovi proteini hidrolizovali ATP, neophodno je prisustvo magnezijumovih jona, pa je u sledećim eksperimentima ispitan njihov uticaj na delovanje proteina HsOrc4 u renaturaciji fragmenta lbo I (Slika 4.13 i Grafik 4.1). Pošto je poznato i da Mg^{2+} joni mogu da povećavaju stabilnost različitih struktura

DNK, tako što smanjuju elektrostatičko odbijanje među naelektrisanim grupama, u kontrolnim reakcijama bez proteina ispitano je da li sam magnezijum može da ima efekta na renaturaciju fragmenta Ibo I.



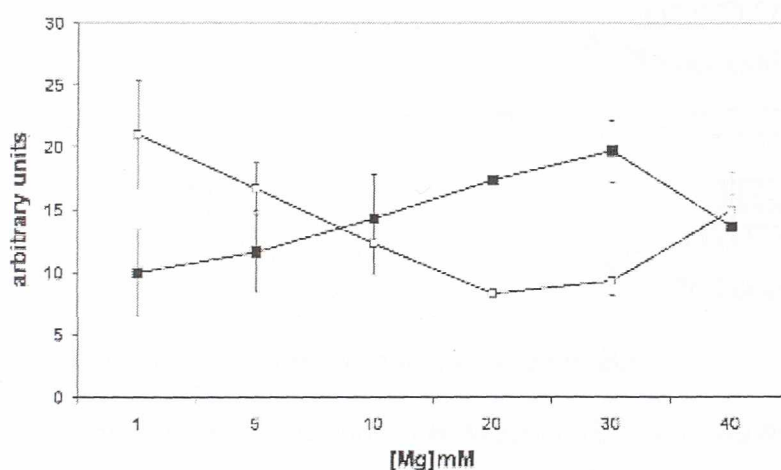
Slika 4.13. Stimulatorni efekat proteina zavisi od koncentracije Mg^{2+} u reakcionoj smeši.

Gornji panel. Denaturisani fragment Ibo I inkubiran je na 37°C sa jednakim količinama HsOrc4 (150 ng) u prisustvu rastućih koncentracija magnezijumovih jona: 1 mM (2), 5 mM (3), 10 mM (4), 20 mM (5), 30 mM (6), 40 mM (7), 50 mM (8).

Donji panel. Denaturisani fragment Ibo I inkubiran je na 37°C bez proteina u prisustvu rastućih koncentracija magnezijumovih jona 1 mM (2), 5 mM (3), 10 mM (4), 20 mM (5), 30 mM (6), 40 mM (7), 50 mM (8).

U reakcijama u kojima nije bilo proteina koncentracija magnezijumovih jona nije imala velikog uticaja na renaturaciju lbo I, dok je u reakcijama sa proteinom koncentracija Mg^{2+} između 20 mM i 30 mM davala najveću količinu reneturisanog produkta.

Izabrani eksperimenti su analizirani Cyclone™ Storage Phosphor System-om (Perkin Elmer) i kvantifikovani korišćenjem OptiQuant softvera. Dobijni rezultati su statistički obrađeni i prikazani na grafiku (Grafik 4.1).



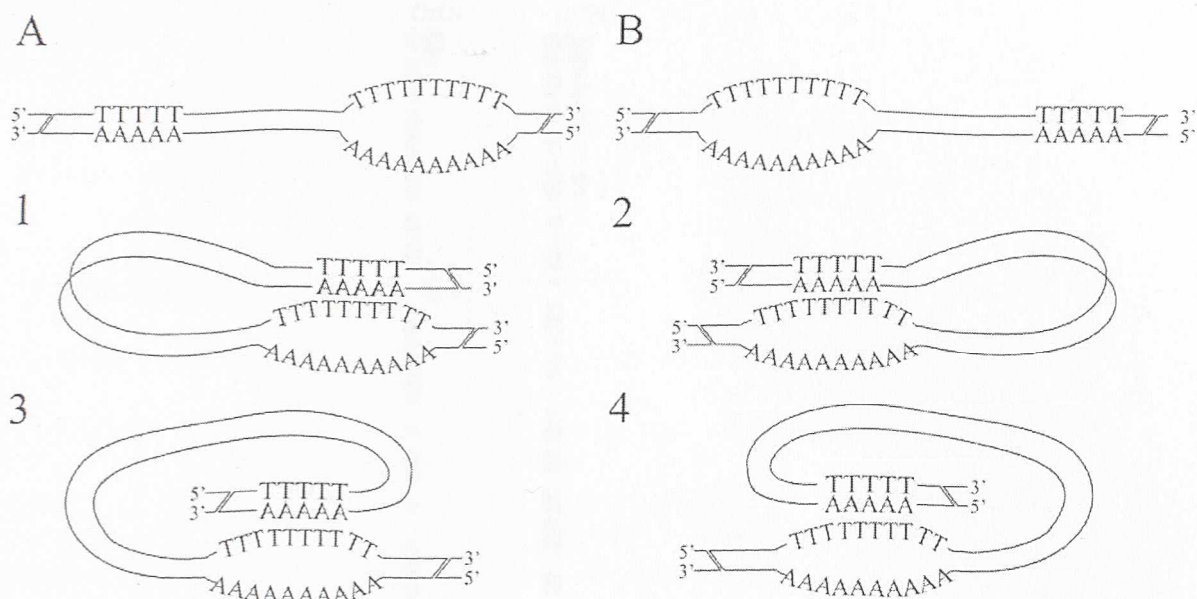
Grafik 4.1. Uticaj jona magnezijuma na renaturaciju fragmenta lbo I stimulisanu proteinom HsOrc4.

Količine dvolančane (■) i jednolančane (□) DNK iz tri različita eksperimenta kvantifikovane i iscrtane u funkciji koncentracije magnezijumovih jona

4.4.2 Struktura produkta renaturacije

Kao što je pokazano u ranijim eksperimentima lbo I zauzima nekanonsku, delimično trolančanu strukturu. Ova struktura okarakterisana je na različite načine,

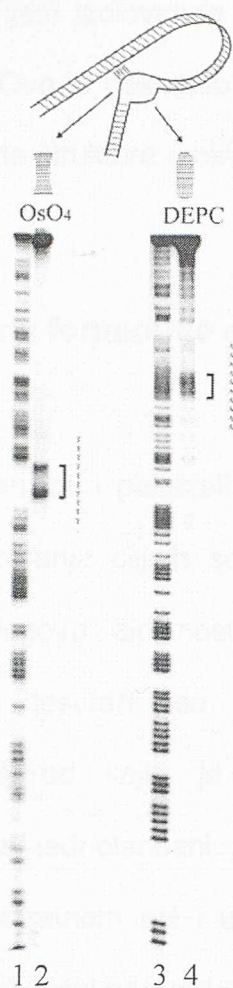
uključujući i testove sa hemijskim agensima OsO_4 -piridinom i DEPC-om, koji su pokazali da se, usred molekula, nalazi otvoreni region, okce, čiji je jedan lanac sastavljen od timina, a drugi od adenina (Slika 4.14).



Slika 4.14 Model trolančane strukture ori-sekvence lamin B2.

Akceptorski region nalazi se uzvodno (A) ili nizvodno (B) u odnosu na donorski lanac tripleksa, a lanci spojeni Hugstinovim vodoničnim vezama mogu biti paralelno (1, 2) ili antiparalelno (3, 4) orijentisani.

Timinski lanac interaguje sa nesusednom, komplementarnom sekvencom i gradi intramolekulski tripleks, što rezultira karakterističnim obrascem sečenja piperidinom posle modifikacije baza osmijum tetraoksidom i dietilpirokarbonatom. Ovaj obrazac je karakterističan za pretežno jednolančane regione u fragmentu lbo I pokazuje delimičnu zaštićenost središnjih timina trolančanom TAT strukturom. Da bi se utvrdilo da li HsOrc4 takođe stimuliše formiranje trolančane strukture, fragment lbo I renaturisan pod delovanjem HsOrc4 izolovan je uz gela i tretiran OsO_4 -piridinom i DEPC-om (Slika 4.15).



Slika 4.15. Produkt renaturacije fragmenta lbo I stimulisane proteinom HsOrc4 predstavlja intramolekulski tripleks.

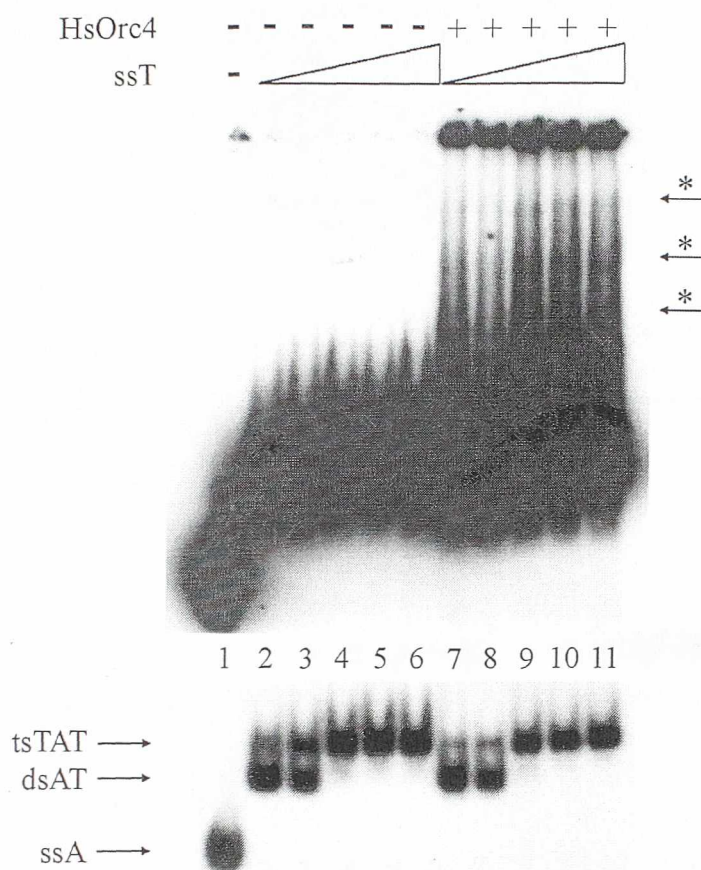
Shematski je prikazan TAT tripleks koji se detektuje u fragmentu lbo I, kao i obrazac sečenja sekvence koja daje treći lanac.

G+A sekvenca gornjeg lanca fragmenta lbo I određena po metodi Maksama i Gilberta (1), lanac bogat timinom modifikovan OsO_4 -om (2), G+A sekvenca donjeg lanca fragmenta lbo I određena po metodi Maksama i Gilberta (3), lanac bogat adeninom modifikovan DEPC-om

Profil koji je dobijen sečenjem izolovanog fragmenta bio je isti kao i patern sečenja samog fragmenta Ibo I. Ovo je pokazalo da HsOrc4 potpomaže formiranje prethodno identifikovane trolančane strukture u okviru fragmenta Ibo I.

4.4.3 Uticaj proteina HsOrc4 na formiranje oligonukleotidnih višelančanih struktura

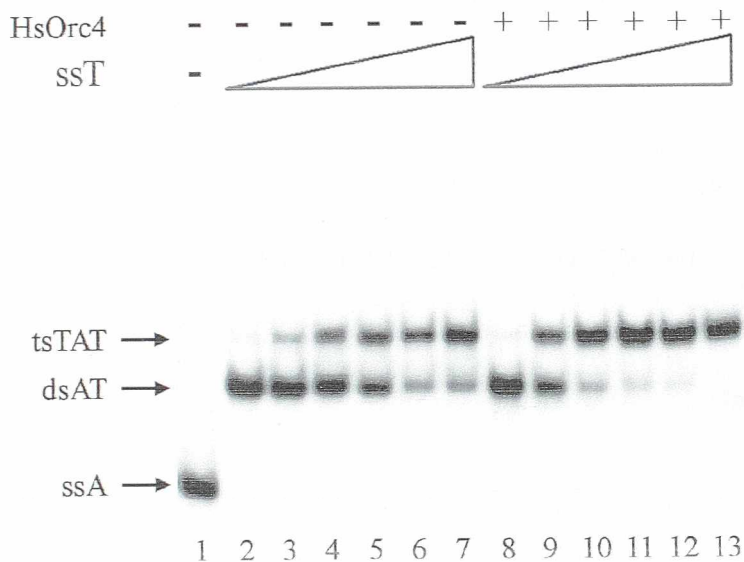
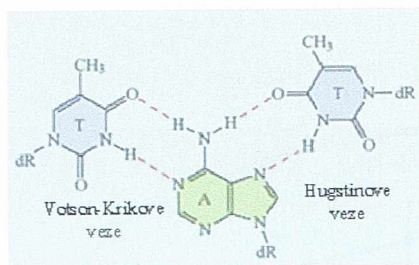
Eksperimenti sa fragmentom Ibo I pokazali su da HsOrc4 može da utiče na strukturu DNK. Radi boljeg definisanja ciljnih sekvenci i supstratne specifičnosti proteina HsOrc4 ispitana je njegovu aktivnost sa različitim oligonukleotidnim supstratima. U prvom koraku testirani su homotiminski i homoadeninski oligonukleotidi slični elementima od kojih je sačinjena struktura prethodno identifikovana u Ibo I. Kada se jednolančani oligoadenin inkubira sa viškom jednolančanog oligotimina, na neutralnom pH i u prisustvu magnezijumovih jona, formiraju se intermolekulski tripleksi slični neortodoksnim elementima fragmenta Ibo I. Kao i za Ibo I, HsOrc4 se vezuje za ove strukture (Slika 4.16). U eksperimentu prikazanom na Slici 4.16., obeleženi oligoadenin inkubiran je sa rastućim količinama neobeleženog oligotimina, u prisustvu proteina HsOrc4. Smeše su inkubirane 15 minuta na 37°C u puferu koji je sadržao 20 mM Mg²⁺. Nakon inkubacije, u kontrolnim uzorcima HsOrc4 je digeriran proteinazom K. Uzorci su analizirani elektroforezom u TBM gelu (Slika 4.16).



Slika 4.16. HsOrc4 se vezuje za višelančane strukture i stimulše njihovo formiranje.

Obeleženi $(dA)_{34}$ (1) inkubiran je sa rastućim koncentracijama neobeleženog $(dT)_{34}$ u prisustvu HsOrc4 (2 – 6 i 7 – 11). Kontrolni uzorci (2 – 6) su digerirani proteinazom K. Na donjem panelu je prikazana kraća ekspozicija istog gela. DNK-protein kompleksi označeni su zvezdicama

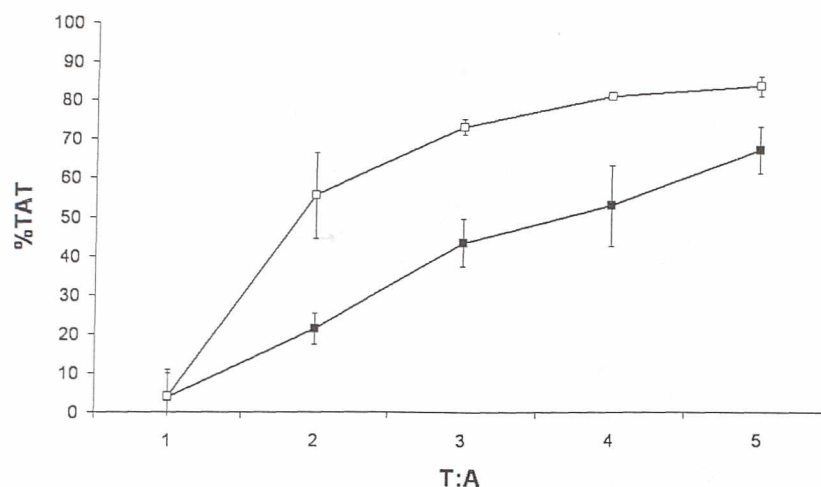
Da bi se ispitalo da li HsOrc4 utiče na formiranje ove strukture obeleženi oligoadenin inkubiran je sa rastućim količinama neobeleženog oligotimina, bez HsOrc4 ili sa njim. Smeše su inkubirane 15 minuta na 37°C u puferu koji je sadržao 20 mM Mg^{2+} . Po završetku inkubacije HsOrc4 je uništen dodavanjem proteinaze K, a produkti reakcije su analizirani elektroforezom u 8% TBM gelu (Slika 4.17 i Grafik 4.2).



Slika 4.17. HsOrc4 stimuliše formiranje intermolekulskih TAT tripleksa

Gornji panel. Model formiranja TAT tripleksa

Donji panel. Obeleženi $(dA)_{34}$ (1) inkubiran sa rastućim količinama $(dT)_{34}$ bez HsOrc4 (2-7) i u priustvu 150 ng HsOrc4 (8-13).

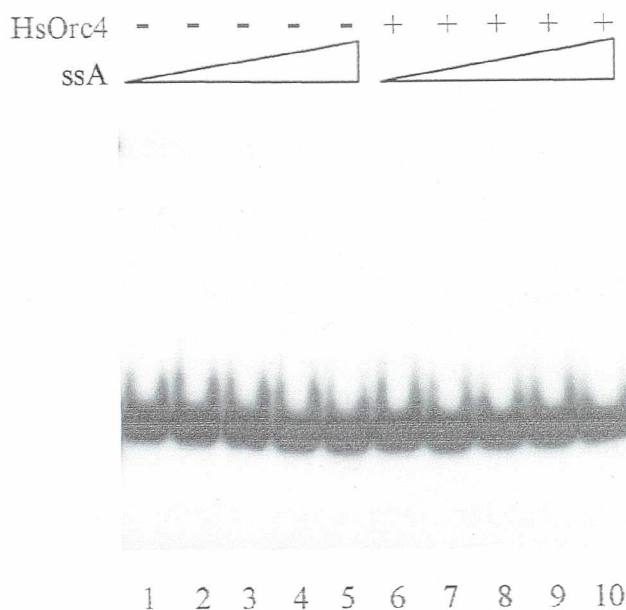
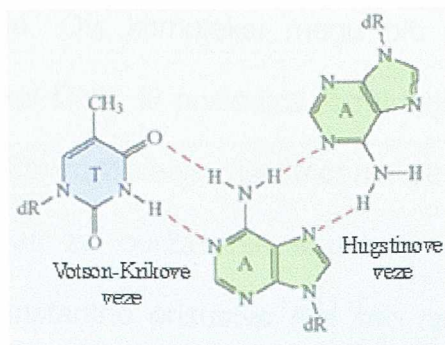


Grafik 4.2. HsOrc4 stimuliše formiranje intermolekulskih TAT tripleksa.

Na grafiku je prikazana količina formiranih TAT tripleksa u zavisnosti od odnosa T:A u prisustvu HsOrc4 (□) i kada on nije prisutan (■) (grafikom su predstavljeni rezultati tri nezavisna eksperimenta)

Iz prethodne slike i grafika vidi se da se u prisustvu HsOrc4 intermolekulski TAT tripleksi formiraju pri nižem odnosu T:A nego bez njega, što potvrđuje da protein stimuliše formiranje ove strukture.

Pored toga što se interakcijama između oligadenina i oligotimina može formirati TAT tripleks, teorijski je moguće da se formira i AAT tripleksa. U formiranje ovakve strukture uključene su, pored Votson-Krikovih, reverzne Hugstinove veze. Da bi se utvrdilo da li HsOrc4 utiče na formiranje i ovakvih struktura, obeleženi oligotimin inkubiran je sa viškom oligoadenina, u prisustvu HsOrc4 ili bez njega (Slika 4.18). Rezultati su pokazali da se, pod datim uslovima, AAT tripleks ne formira.



Slika 4.18. HsOrc4 ne dovodi do formiranja AAT tripleksa.

Gornji panel. Model formiranja AAT tripleksa

Donji panel. Obleženi (dT)₃₄ je inkubiran sa rastućim količinama (dA)₃₄, bez HsOrc4 ili sa njim. Količine (dA)₃₄ su bile: 5 fmol (1, 6), 25 fmol (2, 7), 50 fmol (3, 8), 100 fmol (4, 9) i 500 fmol (5, 10). U reakcijama je bilo 150 ng HsOrc4 (6 – 10)

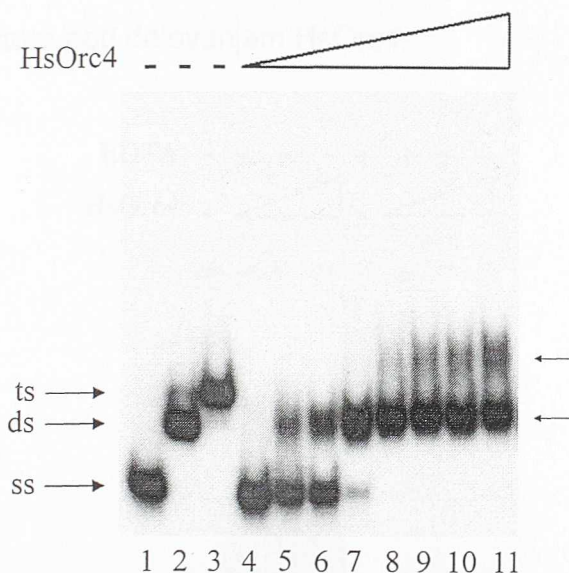
Rezultati prethodnih eksperimenata pokazuju da se pod uslovima u kojima se detektuje neortodoksna struktura lbo I formira samo TAT tripleks, sličan elementu detektovanom u samoj ori sekvenci i da HsOrc4 stimuliše formiranje i inter i intramolekulskih struktura ovog tipa. Eksperimenti vezivanja za TAT tripleks takođe pokazuju da HsOrc4 bar delimično ostaje vezan za ovu strukturu, formirajući

komplekse različitih veličina. Ovi kompleksi mogu biti posledica vezivanja više molekula proteina za molekul DNK, ili posledica formiranja neortodoksnih struktura sa više od tri lanca DNK. Za održavanje višelančanih struktura bilo bi neophodno stalno prisustvo proteina, ali za održavanje struktura koje smo identifikovali u eksperimentima njegovo konstantno prisustvo nije bilo neophodno. Do strukturnih rearanžmana molekula DNK dovela je bar deset puta manja količina HsOrc4, nego što je bilo potrebno proteina da bi se detektovalo njegovo vezivanje za DNK. Ovo ukazuje na to da jedan molekul proteina može da dovede do rearanžmana, tj. restrukturiranja više molekula DNK.

Mada srodni adeninski i timinski elementi preovlađuju u različitim *ori* sekvencama višćelijskih eukariota, neki zajednički guaninski i citozinski elementi, takođe bi mogli da budu uključeni u formiranje neortodoksnih struktura. Tako se, na primer, stabilni GGC tripleks formira u prisustvu HsOrc4, kada se homocitozin inkubira sa dvostrukim viškom homoguanina. HsOrc4 je takođe pokazao sposobnost da stimuliše asocijaciju homopurinskih oligonukleotida u veće strukture, dok to nije mogao da učini sa homopirimidinima. Međutim, TAT, GGC i GG strukture mogle su se oformiti i bez proteina koji je samo stimulisao interakciju oligonukleotida. U tom pogledu apsolutni izuzetak bile su strukture formirane iz adeninskih oligonukleotida koje su se mogle formirati samo u prisustvu proteina HsOrc4. Zbog ovog značajnog svojstva, oligoadeninski supstrat korišćen je kao primer za različite aspekte delovanja HsOrc4.

4.4.4 Interakcije proteina HsOrc4 i oligoadenina

U početnom eksperimentu oligoadenin je inkubiran sa rastućim količinama HsOrc4, koji je potom uklonjen delovanjem proteinaze K. Produkti reakcije su analizirani elektroforezom u TBM gelu na 4°C i upoređeni su sa jednolančanim (dA)₃₄, dvolančanim (AT)₃₄ i trolančanim (TAT)₃₄ molekulima da bi se dobila predstava o njihovoj veličini, kao što je pokazano na Slici 4.19.



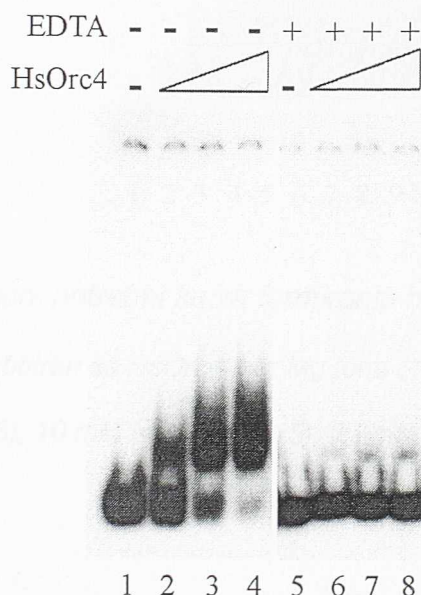
Slika 4.19. HsOrc4 dovodi do formiranja višelančanih homoadeninskih struktura.

Obeleženi (dA)₃₄ (1), dvolančani AT (2) i trolančani TAT (3) tridesetčetvoromeri kao markeri veličine produkata. Obeleženi (dA)₃₄ inkubiran bez HsOrc4 (4) i sa rastućim količinama HsOrc4 (5 – 11). Količine proteina su bile 25 ng (5), 50 ng (6), 100 ng (7), 150 ng (8), 200 ng (9), 250 ng (10) i 500 ng (11). Homoadeninske strukture su obeležene strelicama.

HsOrc4 je izaziva formiranje produkata koji po veličini odgovaraju homodupleksu, a najverovatnije i homokvadripleksu oligoadenina.

Kao što je ranije napomenuto, Mg^{2+} joni značajni su za funkcionisanje AAA+ ATPaza kojima pripada i protein HsOrc4. Radi ispitivanja značaja magnezijuma za formiranje višelančanih oligoadeninskih struktura, eksperimenti restrukturiranja ponovljeni su u prisustvu etilen diamin tetrasirćetne kiselina (EDTA). EDTA predstavlja helatorni molekul koji uklanja dvovalentne (i trovalentne) jone iz rastvora.

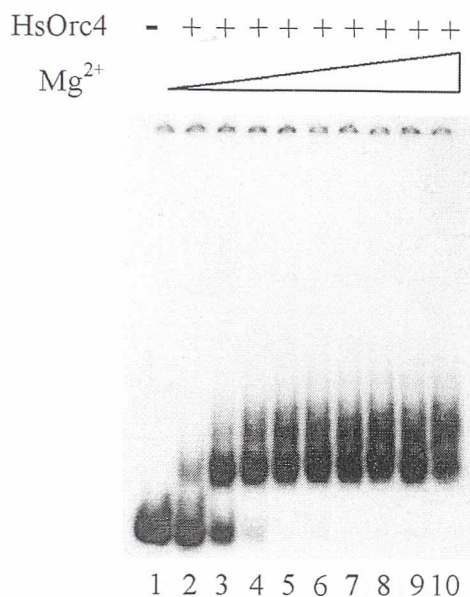
Kada je oligoadenin je inkubiran sa rastućim količinama HsOrc4 u prisustvu EDTA ili bez nje (Slika 4.20) primećeno je da EDTA je sprečava formiranje homoadeninskih struktura pod delovanjem HsOrc4.



Slika 4.20. EDTA sprečava formiranje homoadeninskih struktura pod delovanjem HsOrc4.

$(dA)_{34}$ inkubiran sa rastućim količinama HsOrc4, bez EDTA (1 – 4) i sa 20 mM EDTA (5 – 8). Količine proteina su bile: 50 ng (2 i 6), 100 ng (3 i 7) and 150 ng HsOrc4 (4 i 8)

Da bi se ispitao direktni uticaj jona magnezijuma na formiranje homoadeninskih struktura pod delovanjem HsOrc4, oligoadenin je inkubiran sa proteinom u prisustvu rastućih koncentracija magnezijumovih jona (Slika 4.21).



Slika 4.21. Magnezijumovi joni potrebni su za formiranje homoadeninskih struktura.

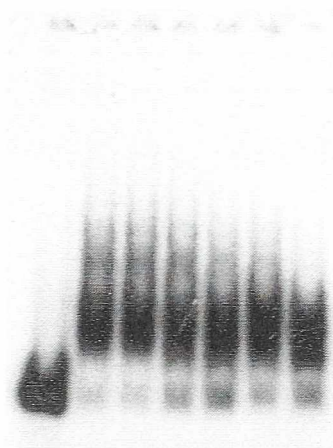
Obeleženi (dA)₃₄ je inkubiran sa HsOrc4 bez Mg jona (1) i u prisustvu rastućih količina Mg: 1 mM (2), 5 mM (3), 10 mM (4), 15 mM (5), 20 mM (6), 25 mM (7), 30 mM (8), 40 mM (9), 50 mM (10)

Najniža koncentracija Mg²⁺ jona koja je obezbeđivala maksimalnu aktivnost HsOrc4 iznosila je 15 mM. Dalje povećanje koncentracije ovih jona nije imalo dodatnog efekta na formiranje višelančanih homoadeninskih struktura.

Višelančane strukture često su okarakterisane povećanom termostabilnošću u odnosu na dvolančanu DNK. Radi ispitivanja termostabilnosti struktura koje formiraju oligoadenini pod delovanjem proteina HsOrc4, ove strukture su kao i obično formirane na 37°C, nakon čega je protein uklonjen proteinazom K. Višelančane

strukture zatim su inkubirane 10 min na temperaturama od 55°C do 95°C, a onda analizirane elektroforezom u TBM gelu na 4°C (Slika 4.22).

HsOrc4	-	+	+	+	+	+	+
T(°)		37	55	65	75	85	95



1 2 3 4 5 6 7

Slika 4.22. Homoadeninske strukture formirane po delovanjem HsOrc4 s izuzetno termostabilne.

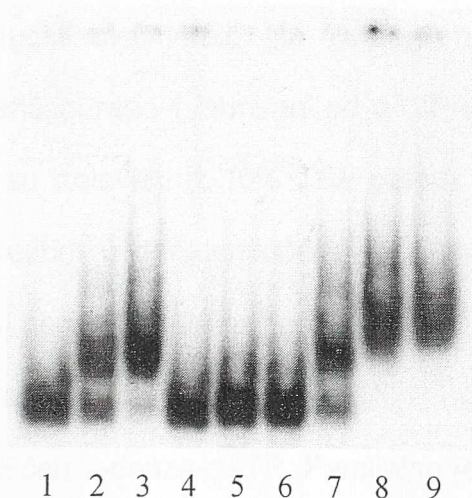
Strukture formirane interakcijom obeleženog $(dA)_{34}$ sa proteinom HsOrc4 inkubirane na 55°C (3), 65°C (4), 75°C (5), 85°C (6) i 95°C (7). Obeleženi $(dA)_{34}$ (1) i produkt formiran i inkubiran na 37°C (2)

Homoadeninske strukture formirane pod delovanjem proteina HsOrc4 pokazale su neobično visoku termostabilnost. Najveći deo formiranih produkata ostao je stabilan čak i na temperaturi od 95°C.

HsOrc4 pripada familiji ATPaza asociranih sa različitim funkcijama u ćeliji, pa je bilo zanimljivo ispitati uticaj ATP-a na funkcionisanje proteina u reakcijama restrukturiranja DNK. ATP može da ima tzv. strukturnu ulogu – da samim prisustvom i vezivanjem za protein omogućava njegovo funkcionisanje ili da hidrolizom obezbeđuje energiju za funkcionisanje proteina. Za razjašnjavanje uloge ATP-a u funkcionisanju HsOrc4 napravljeni su mutirani proteini – HsOrc4 WA, koji ne može da

veže ATP, i HsOrc4 WB, koji ne može da hidrolizuje ATP. Ovi mutirani proteini su ispitivani u esejima restrukturiranja homoadenina, izvedenim kao i u slučaju proteina divljeg tipa (Slika 4.23).

HsOrc4	-	-	-	-	-	-	+	+	+
HsOrc4 WA	-	-	-	+	+	+	-	-	-
HsOrc4 WB	+	+	+	-	-	-	-	-	-

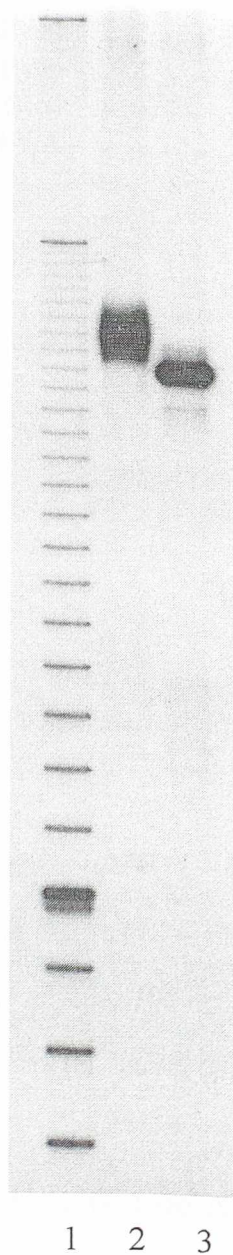


Slika 4.23. HsOrc4 WA – HsOrc4 mutant koji ne može da vezuje ATP, ne dovodi do formiranja homoadenskih struktura. Hidroliza ATP-a nije neophodna da bi se formirale homoadeninske strukture.

Obeleženi $(dA)_{34}$ je inkubiran sa rastućim količinama proteina HsOrc4 WB (1 – 3), HsOrc4 WA (4 – 6) i HsOrc4 (7 – 9). Količine odgovarajućih proteina su bile 50 ng (1, 4 i 7), 100 ng (2, 5 i 8) i 150 ng (3, 6 i 9)

Kao što se sa slike može videti ukoliko protein ne može da veže ATP u potpunosti nestaje i njegova sposobnost da restruktuiru homoadeninske supstrate. Ovo pokazuje da je vezivanje ATP-a neophodno za funkcionisanje HsOrc4, što nije slučaj sa njegovom hidrolizom. Mutant neaktivan u hidrolizi ATP-a još uvek je mogao da restruktuiru oligoadenin.

Pod pretpostavkom da se homoadeninske strukture formiraju uspostavljanjem vodoničnih veza između oligoadeninskih molekula, bilo je zanimljivo je videti koji tip veza je uključen u formiranje ovih struktura. Radi ispitivanja tipa veza prisutnih u oligoadeninskim strukturama konstruisani su posebni supstrati za protein HsOrc4. U tu svrhu korišćen je fragment 7-deaza-lbo I u kome su adenini zamenjeni bazama koje ne mogu da grade Hugstinove veze. Na ovakav molekul terminalnom transferazom dodati su jednolančani repovi formirani od dATP-a ili 7-deaza-dATP-a. Produkti sa dodatim repićima su izolovani iz 10% TBE gelova i njihova celovitost i dužina su provereni elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu (Slika 4.24). Supstrati koji su dobijeni na ovaj način najčešće su imali jednolančane repiće duge 50 do 90 nukleotida kada je za sintezu korišćen dATP i 90 do 140 nukleotida kada je za njihovu sintezu korišćen 7-deaza-dATP. Parcijalno jednolančani supstrati inkubirani su u prisustvu HsOrc4, kao i u predhodnim eksperimentima, a produkti ove reakcije takođe su analizirani TBM PAGE i autoradiografijom.

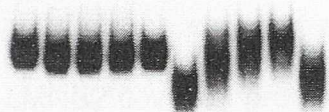


Slika 4.24. Tipični produkt posle dodavanja dATP repića terminalnom transferazom na fragment 7-deaza-lbo I.

Dužina produkta (2) proverena je elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu poređenjem sa standardom dužine (1) i samim fragmentom lbo I (3)

Dalja analiza ovih supstrata vršena je kao i u prethodnim eksperimentima (Slika 4.25).

7-Deaza-AMP rep	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
dAMP rep	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
HsOrc4	-	▴			-	▴			-	-
HsOrc4 WA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Slika 4.25. Hugstinove vodonične veze su neophodne za restrukturiranje supstrata delovanjem proteina HsOrc4.

Fragment 7-deaza-lbo I sa 7-deaza-dATP (1 – 5) ili dATP (6 – 10) repićima inkubiran sa rastućim količinama proteina HsOrc4 (2 – 4 i 7 – 9) ili sa proteinom HsOrc4 WA (5 i 10). Količine proteina HsOrc4 su bile: 100 ng (2 i 6), 150 ng (3 i 7) i 200 ng (4 i 8), dok je HsOrc4 WA dodat u količini od 150 ng (5 i 10)

Supstrati sa dATP repićima su pod delovanjem HsOrc4 prevedeni u veće strukture. Ovo nikad nije bio slučaj sa supstratima koji su imali jednolančane 7-deaza-dATP repiće. Iz ovih rezultata jasno je da u formiranju viših struktura DNK pod delovanjem proteina HsOrc4 učestvuju Hugstinove vodonične veze. Delovanje proteina HsOrc4 u restrukturiranju supstrata sa jednolančanim repićima zavisilo od prisustva Mg^{2+} i ATP-a, dok je reakcija bila inhibirana u prisustvu EDTA. Mutirani protein HsOrc4 WA nije imao uticaja na restrukturiranje ovih supstrata.

5 DISKUSIJA

Složeni mehanizmi sastavljeni od genetičkih i epigenetičkih elemenata određuju sposobnost ćelije da inicira sintezu DNK. U ovom radu istraživanjem su obuhvaćeni samo neki od učesnika u procesu inicijacije replikacije, sa ciljem da se rasvetli priroda njihovih međusobnih interakcija, a diskutovan je i mogući značaj dobijenih rezultata za proces u celini. Opisani eksperimenti nastavljaju ranije započetu analizu interakcije replikatora LMNB2 čoveka i proteina HsOrc4, koji je deo inicijacionog kompleksa ORC.

Replikator LMNB2 aktivan je u velikom broju ćelijskih linija humanog porekla, a zadržava aktivnost i po prebacivanju na ektopična mesta u genomu. U ovom radu bio je korišćen fragment označen kao lbo I koji je neophodan za ektopičnu aktivnost LMNB2, a obuhvata pretpostavljeno mesto otpočinjanja bidirekcionne sinteze DNK i region zaštićen proteinima *in vivo* i *in vitro*. Osim toga, lbo I sadrži i sekvencu koja, u esaju ektopične ekspresije, može da zameni funkcionalno značajni element poreklom iz *ori* DHFR hrčka (62). Međusobno zamenjivi elementi poreklom iz oba replikatora ne poseduju konsenzusne sekvence, a njihova funkcionalnost zavisi od visokog sadržaja i rasporeda AT parova. Fragment lbo I u svom sastavu ima 55% AT parova, a adenini i timini su asimetrično raspoređeni u odnosu na osu zavojnice. Višestruki homotiminski traktovi nalaze se u gornjem lancu fragmenta lbo I. U *in vitro* uslovima, na neutralnom pH, fragment lbo I zauzima neortodoksnu strukturu (89).

Neortodokсна struktura predstavlja intramolekulski tripleks koji nastaje kao posledica interakcije dve nesusedne homoadeninske/homotiminske sekvence. Tripleks po svemu sudeći zauzima strukturu upletenog čvora koja uključuje centralne

timine strukture okca u regionu 3900-3912 i jedan od kraćih nizova (dA)·(dT), van okca.

Protein HsOrc4 je jedna od subjedinica kompleksa ORC, univerzalnog eukariotskog inicijatora. On pripada porodici AAA+ ATPaza uključenih u različite funkcije u ćeliji (103). Za ove proteine je karakteristično da posle vezivanja ATP prolaze kroz konformacionu promenu ili je indukuju u svojim partnerima. Osim tipičnog AAA+ domena, sastavljenog iz konzervisanih motiva odgovornih za vezivanje ATP-a i njegovu hidrolizu, HsOrc4 ne sadrži ni jedan do danas opisani funkcionalni proteinski domen. Eksperimentalno je pokazano da se ovaj protein vezuje za DNK, ali osim AAA+ domena koji je uključen u protein-DNK interakcije inicijatora Arhea, kod ovog proteina takođe nije identifikovan nijedan poznati DNK-vezivni domen. Kao što je opisano u Uvodu, AAA+ domen sastavljen je iz motiva Voker A i Voker B uključenih u vezivanje i hidrolizu ATP-a. U literaturi postoji mnogo podataka o uticaju mutacija u Voker motivima (pretežno Voker A) na formiranje kompleksa ORC i njegovu ATPaznu aktivnost, dok se daleko manje zna o njihovom uticaju na interakcije sa DNK. Postoje podaci da je ekspresija mutiranih proteina primetno niža u odnosu na ekspresiju proteina divljeg tipa (130). Vezivanje ATP za HsOrc4 neophodno je za formiranje kompleksa sastavljenog od subjedinica 2-5, kao i za interakciju subkompleksa HsOrc1-5 sa HsOrc1 (135, 145). HsOrc4 sa mutiranim Voker A motivom ne može da formira kompleks sa HsOrc2/3/5, dok se mutanti u Voker B i argininskom ostatku u ovom slučaju ponašaju kao protein divljeg tipa (145). Pretpostavlja se da je uloga ATP pre svega strukturna, da on deluje kao neophodni kofaktor u formiranju kompleksa i da je njegovo prisustvo neophodno za održavanje integriteta kompleksa. Pokazano je da hidroliza ATP-a nije potrebna da bi se nagradio HsORC kompleks, jer se njegov nehidrolizabilni analog, ATP γ S, u

eksperimentima se ponaša isto kao i sam ATP. Subjedinica HsOrc4 izgleda ima ključnu ulogu u prenošenju efekta ATP na međusobne interakcije subjedinica kompleksa, i u stabilizaciji kompleksa (135). Pokazano je da se kompleks koji sadrži mutiran Voker A motiv HsOrc4 vezuje za DNK manje efikasno nego protein divljeg tipa (80%) (130). Nema podataka kako mutacije u Voker B motivu HsOrc4 utiču na interakcije sa DNK. Što se tiče prečišćenog proteina HsOrc4, pokazano je da njegovo vezivanje za DNK ne zavisi od ATP-a (151).

U ovom radu je potvrđeno da HsOrc4 poseduje samostalnu DNK-vezivnu aktivnost i vezuje se prirodne i sintetičke DNK bogate AT parovima, uključujući i sekvencu Ibo I, poreklom iz LMNB2 *ori* čoveka. Interakcije HsOrc4 i fragmenta Ibo I ispitivane su EMSA esejom. U EMSA esejom pokazano je da dolazi do formiranja višestrukih kompleksa proteina i DNK. Ranije je pokazano da se višestruki kompleksi formiraju kooperativno, prilikom vezivanja proteina za višestruka mesta u okviru *ori* (151). Sposobnost HsOrc4 da se vezuje za različite sintetske kopolimere ispitivana je afinitetnom hromatografijom. U ovim eksperimentima takođe je potvrđeno da protein preferira supstrate bogate AT parovima i da se može vezati kako za dvolančane, tako i za trolančane DNK. Iz ovih rezultata može se pretpostaviti da bi inicijalni korak u interakcijama proteina i DNK moglo biti vezivanje proteina za trolančani element koji se formira u okviru *ori*, za kojim bi mogli da slede kooperativno prepoznavanje manje specifičnih AT bogatih, ali dvolančanih sekvenci.

Na primeru fragmenta Ibo I mogu se opisati strukturni elementi neophodni za formiranje tripleksa. Da bi se ovakva struktura formirala neophodno je postojanje jednog dovoljno dugog ili više relativno kratkih purinsko/pirimidinskih regiona u molekulu DNK. Da bi različiti delovi jednog ovakvog regiona, ili različiti regioni mogli međusobno da interaguju neophodno je da budu simetrični, a tipovi simetrije koju

moraju zadovoljiti jesu refleksija i klizajuća refleksija. U intramolekulskom tripleksu centralni lanac je uvek bogat purinima, jer samo purini imaju dve površine koje mogu da grade vodonične veze sa komplementarnim bazama. Centralni lanac povezan klasičnim Watson-Krikovim vezama sa sebi komplementarnom sekvencom gradi dupleks, a sa trećim, takođe komplementarnim lancem interaguje preko Hugstinovih veza. Ukoliko je treći lanac bogat purinima on formira reverzne Hugstinove veze u antiparalelnoj orijentaciji sa centralnim lancem, a ako je bogat pirimidinima Hugstinove veze se formiraju u paralelnoj orijentaciji.

U ovome radu dodatno je analizirana i struktura fragmenta Ibo I. U tu svrhu analizirani su specifično izmenjeni molekuli Ibo I. Analizirani su: mutirani Ibo I koji je imao centralnih 6 timina okca zamenjen citidinima (mutC6) i fragment za čiju je sintezu korišćen 7-deaza-ATP umesto dATP-a (7-deaza-Ibo I). Hemijskim agensima, pogodnim za strukturnu analizu molekula DNK, utvrđeno je da ni fragment mutC6, kao ni 7-deaza-Ibo I ne zauzimaju ranije okarakterisanu neortodoksnu strukturu. U fragmentu mutC6 ne postoji denaturisani region, okca fragmenta Ibo I, pa samim tim ne postoji ni donor trećeg lanca. Fragment 7-deaza-Ibo I ima izuzetno smanjenu osetljivost na OsO_4 -piridin, što pokazuje da je za formiranje ranije okarakterisanog tripleksa neophodno da adenini mogu da grade vodonične veze Hugstinovog tipa. Pored toga uočeno je i postojanje novih signala u okviru fragmenta 7-deaza-Ibo I u odnosu na normalan fragment Ibo I. Ovo može da ukaže na to da su i neki drugi delovi strukture ovog fragmenta stabilizovani formiranjem tripleksa.

Analizom sekvenci genoma eukariota otkriva se hiljade polipurinski/polipirimidinskih traktova koji ispunjavaju teoretske uslove za formiranje tripleksa. Kada se u obzir uzme samo verovatnoća zastupljenosti ovakvih sekvenci u genomu, uviđa se da se one javljaju mnogo češće nego što je očekivano (146).

Regioni u kojima se nalaze ove sekvence uključeni su u različite procese u ćeliji. One mogu da predstavljaju mesta vezivanja različitih regulatornih proteina, kao i da učestvuju u pozicioniranju nukleozoma i tako utiču na lokalnu i globalnu strukturu DNK ili da vrše neke do danas nepoznate funkcije. Do danas je pokazan biološki značaj više trolančanih regiona genomske DNK – za njih se vezuju neki transkripcioni faktori (npr. protein GAGA *D. melanogaster*), imaju ulogu u procesu rekombinacije, kao i u replikaciji. Ranije je pretpostavljeno da trolančane strukture mogu da predstavljaju mesta terminacije replikacije (147, 148), ali da takođe mogu imati ulogu u inicijaciji replikacije. Da bi došlo do inicijacije mora doći do odmotavanja spirale molekula DNK. Formirani intramolekulski tripleksi mogli bi da obezbede otvoreni region koji bi onda mogao da predstavlja mesto za ulazak proteina uključenih u inicijaciju replikacije. Među ovim proteinima na prvom mestu je svakako ORC, a u njegovoj interakciji sa nekanonskim strukturama *ori* ulogu bi mogao imati i HsOrc4.

Jedna od novih karakteristika HsOrc4 pokazana u ovom radu ogleda se u njegovom delovanju na jednolančane molekule poreklom iz *ori* sekvence Ibo I ili na različite oligonukleotide koje prevodi u nekanonske strukture. Kao što je pokazano u Rezultatima, protein HsOrc4 stimuliše renaturaciju fragmenta Ibo I. Analiza produkta ove reakcije, pokazala je da Ibo I zauzima ranije opisanu strukturu tripleksa. Delovanje HsOrc4 na renaturaciju predstavlja specifično svojstvo ovog proteina, zavisno od koncentracija jona magnezijuma. Pod uslovima pod kojima se detektuje formiranje tripleksa u okviru Ibo I, HsOrc4 dovodi do formiranja TAT, ali ne i AAT tripleksa.

Osim trolančanih opisane su i mnoge druge neortodoksne strukture. Poznato je da nizovi guaninskih nukleotida mogu međusobno da se povezuju i grade četvorolančane strukture, nazvane G-kvarteti ili kvadrupleksi (149). Ovakve strukture

i sekvence sa potencijalom za njihovo formiranje najčešće se javljaju u regionima telomera i promotora i pretpostavlja se da imaju ulogu u njihovom funkcionisanju. U ovom radu je pokazano da i oligoadenini mogu graditi višelančane strukture i to isključivo u reakciji katalizovanoj proteinom HsOrc4. Adeninski nukleotidi u prisustvu proteina HsOrc4 mogu da se sparuju i grade dvolančane, pa čak i strukture višeg reda. U formiranju ovih struktura delovanje HsOrc4 je katalitičko. Kao i G-kvarteti homoadeninske strukture su termostabilne i povezane Hugstinovim vezama, koje adeninski nukleotidi grade preko azota N7 u purinskom prstenu. Za formiranje ovih struktura značajni su magnezijum i ATP, a mutirani protein HsOrc4 WA, koji nema sposobnost vezivanja ATP-a, neaktivan je u restrukturiranju oligoadenina. Protein HsOrc4 WB, mutirana forma koja ne može da hidrolizuje, ali može da veže ATP, pokazuje sličnu aktivnost kao i protein divljeg tipa. Ovi rezultati ukazuju na to da ATP u ovim reakcijama najverovatnije deluje kao kofaktor, i da njegova hidroliza nije neophodna za ovu funkciju HsOrc4. Delovanje proteina u reakcijama restrukturiranja je u skladu sa očekivanim delovanjem proteina koji pripadaju AAA+ familiji, za odvijanje reakcije potrebno je prisustvo jona magnezijuma, a delovanje je regulisano vezivanjem ATP-a za protein.

Sekvence koje mogu graditi neortodoksne AT elemente opisane u predhodnim pasusima veoma su česte u replikatorima višećelijskih eukariota i čoveka. Kao što je navedeno ranije, replikatoru su bogati AT parovima organizovanim u kraće ili duže međusobno simetrične nizove. Nizovi homoadenina i homotimina bi mogli da budu uključeni u reakcije restrukturiranja izazvane ili stimulisane proteinom HsOrc4. Ukoliko bi produkt neke od tih reakcija bio TAT tripleks, jedan adeninski lanac ostao bi slobodan i mogao bi da učestvuje u formiranju višelančanih adeninskih struktura. Finalna struktura replikatora, preoblikovana u ovakvim ili sličnim interakcijama, mogla

bi da bude veoma kompleksna. Formiranje tripleksa *in vivo* bi omogućilo da se svi neophodni strukturni elementi za inicijaciju smeste u okviru jedne petlje, pri čemu bi jedan inicijatorni događaj – vezivanje inicijatora za trolančanu DNK, moglo da otpakuje strukturu i omogući inicijaciju.

Sposobnost proteina HsOrc4 da katalizuje DNK-DNK interakcije zanimljiva je i zbog toga što bi na ovaj način mogao da se znatno proširi repertoar struktura koje genomska DNK može da zauzme, uključujući i energetske nepovoljne strukture. ORC je uključen i u mnoge druge funkcije u ćeliji, pa bi sposobnost HsOrc4 da indukuje DNK-DNK interakcije mogla da bude značajna i za njih. Jedna od ovih uloga je kohezija sestrinskih hromatida nezavisna od kohezina.

Iako do danas nisu opisane konzervisane sekvence u okviru *ori* metazoa, sličnost koja među njima postoji mogla bi da ukaže na to da njihova sekundarna struktura igra značajnu ulogu u određivanju njihove specifičnosti. Postojanje elemenata koji mogu da nagrade alternativne strukture u okviru *ori* i činjenica da HsOrc4 interaguje sa ovakvim strukturama, da može da stimuliše njihovo formiranje možda predstavlja pravac u kojem bi se nastavilo traganje za opštim eukariotskim replikatorom i do kraja razrešilo pitanje specifičnosti i regulacije prvih koraka inicijacije replikacije.

6 ZAKLJUČCI

1. Potvrđeno je da fragment Ibo I, poreklom iz LMNB2 replikatora čoveka, zauzima delimično trolančanu strukturu. Za formiranje ove neortodoksne strukture neophodan je otvoreni region ili okce koje se nalazi na položaju 3900 – 3912, a sastavljeno je od jednog homotiminskog i jednog homoadeninskog lanca uključenog u formiranje Hugstinovih veza tripleksa.
2. Potvrđeno je da se protein HsOrc4, subjedinica univerzalnog eukariotskog inicijatora ORC, vezuje za prirodne ili sintetske DNK bogate AT parovima ili TAT elementima.
3. Utvrđeno je da protein HsOrc4 stimuliše nekanonsku renaturaciju komplementarnih lanaca fragmenta Ibo I ili nekanonsku renaturaciju homoadeninskih i homotiminskih oligonukleotida u odgovarajuće trolančane strukture.
4. Pokazano je da protein HsOrc4 katalizuje asocijaciju adeninskih lanaca u dvolančane i verovatno četvorolančane molekule.
5. Pokazano je da su homoadeninske strukture termostabilne, zavisne od magnezijumovih jona i vezane Hugstinovim vezama.
6. Na osnovu eksperimenata sa mutiranim formama proteina HsOrc4, utvrđeno je da katalitički efekat proteina HsOrc4 zavisi od vezivanja, ali ne i od hidrolize ATP-a.

7 LITERATURA

1. Harland RM, Laskey RA. Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. *Cell*. 1980; 21(3):761-71.
2. Jacob F, Brenner S and Cuzin F. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1963; 28: 329.
3. Norio P. DNA replication: the unbearable lightness of origins. *EMBO Rep*. 2006; 8:779-81.
4. Gilbert DM. In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5(10):848-55.
5. Bramhill D, Kornberg A. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell*. 1988; 54(7):915-8.
6. Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:333-74.
7. Huberman JA, Riggs AD. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol*. 1968; 32(2):327-41.
8. Brewer BJ, Fangman WL. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*. 1987; 51(3):463-71.
9. Brewer BJ, Fangman WL. Mapping replication origins in yeast chromosomes. *Bioessays*. 1991; 13(7):317-22.
10. Deshpande AM, Newlon CS. The ARS consensus sequence is required for chromosomal origin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(10):4305-13.

11. Marahrens Y, Stillman B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*. 1992; 255(5046):817-23.
12. Wyrick JJ, Aparicio JG, Chen T, Barnett JD, Jennings EG, Young RA, Bell SP, Aparicio OM. Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S.cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science*. 2001; 294, 2357–2360.
13. Bolon YT, Bielinsky AK. The spatial arrangement of ORC binding modules determines the functionality of replication origins in budding yeast. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(18):5069–5080.
14. DePamphilis ML. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays*. 1999; 21(1):5-16.
15. Kong D, DePamphilis ML. Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(23):8095-103.
16. Dai J, Chuang RY, Kelly TJ. DNA replication origins in the *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(2):337-42.
17. Patel PK, Arcangioli B, Baker SP, Bensimon A, Rhind N. DNA Replication Origins Fire Stochastically in Fission Yeast. *Mol Biol Cell*. 2006; 17:308–316.
18. Costa S, Blow JJ. The elusive determinants of replication origins. *EMBO Rep*. 2007; 8: 332–334.
19. Taylor JH. Rates of chain growth and units of replication in DNA of mammalian chromosomes. *J Mol Biol*. 1968; 31:579–594.
20. Stambrook PJ, Flickinger RA. Changes in chromosomal DNA replication patterns in developing frog embryos. *J Exp Zool*. 1970; 174:101–113.

21. Blumenthal AB, Kriegstein HJ, Hogness DS. The units of DNA replication in *Drosophila melanogaster* chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1974; 38:205–223.
22. Taylor JH. Increase in DNA replication sites in cells held at the beginning of S phase. *Chromosoma.* 1977; 62:291–300.
23. Hand R. Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell.* 1978; 15:317–325.
24. Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S, Davis RW. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76:1035–1039.
25. Heintz NH, Hamlin JL. An amplified chromosomal sequence that includes the gene for dihydrofolate reductase initiates replication within specific restriction fragments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79:4083–4087.
26. Handeli S, Klar A, Meuth M, Cedar H. Mapping replication units in animal cells. *Cell.* 1989; 57:909–920.
27. Burhans WC, Vassilev LT, Caddle MS, Heintz NH, DePamphilis ML. Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell.* 1990; 62:955–965.
28. Vaughn JP, Dijkwel PA, Hamlin JL. Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell.* 1990; 61:1075–1087.
29. Krysan PJ, Calos MP. Replication initiates at multiple locations on an autonomously replicating plasmid in human cells. *Mol Cell Biol.* 1991; 11:1464–1472.
30. Bell SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature.* 1992; 357:128–134.

31. Kitsberg D, Selig S, Keshet J, Cedar H. Replication structure of the human β -globin gene domain. *Nature*. 1993; 368:588–590.
32. Gavin K, Hidaka M, Stillman B. Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science*. 1995; 270:1667–1671.
33. Hyrien O, Maric C, Mechali M. Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science*. 1995; 270:994–997.
34. Gilbert DM, Miyazawa H, DePamphilis ML. Site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extract requires nuclear structure. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:2942–2954.
35. Aladjem M, Groudine M, Brody LL, Dieken ES, Fournier RE, Wahl GM, Epner EM. Participation of the human β -globin locus control region in initiation of DNA replication. *Science*. 1995; 270:815–819.
36. Wu JR, Gilbert DM. A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science*. 1996; 271:1270–1272.
37. Santocanale C, Diffley J. ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 1996; 15:6671–6679.
38. Walter J, Newport JW. Regulation of replicon size in *Xenopus* egg extracts. *Science*. 1997; 275:993–995.
39. Aladjem MI, Rodewald LW, Kolman JL, Wahl GM. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human β -globin locus. *Science*. 1998; 281:1005–1009.
40. Austin RJ, Orr-Weaver TL, Bell SP. *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev*. 1999; 13:2639–2649.

41. Rein T, Kobayashi T, Malott M, Leffak M, DePamphilis ML. DNA methylation at mammalian replication origins. *J Biol Chem.* 1999; 274:25792–25800.
42. Abdurashidova G, Deganuto M, Klima R, Riva S, Biamonti G, Giacca M, Falashi A. Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science.* 2000; 287:2023–2026.
43. Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell.* 2003; 114:385–394.
44. Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ, Walter JC. Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* 2003; 17:1894–1908.
45. Remus D, Beall EL, Botchan MR. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC–DNA binding. *EMBO J.* 2004; 23:897–907.
46. Harvey KJ, Newport J. CpG methylation of DNA restricts prereplication complex assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:6769–6779.
47. Schaarschmidt D, Baltin J, Stehle IM, Lipps HJ, Knippers R. An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* 2004; 23:191–201.
48. Mesner LD, Li X, Dijkwel PA, Hamlin JL. The dihydrofolate reductase origin of replication does not contain any nonredundant genetic elements required for origin activity. *Mol Cell Biol.* 2003; 23:804–814.

49. Saha S, Shan Y, Mesner LD, Hamlin JL. The promoter of the Chinese hamster ovary dihydrofolate reductase gene regulates the activity of the local origin and helps define its boundaries. *Genes Dev.* 2004; 18:397–410.
50. Lu L, Zhang H, Tower J. Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for *Drosophila* chorion gene amplification. *Genes Dev.* 2001; 15(2):134-46.
51. Paixão S, Colaluca IN, Cubells M, Peverali FA, Destro A, Giadrossi S, Giacca M, Falaschi A, Riva S, Biamonti G. Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(7):2958-67.
52. Liu G, Malott M, Leffak M. Multiple functional elements comprise a mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(5):1832-42.
53. Cohen SM, Hatada S, Brylawski BP, Smithies O, Kaufman DG, Cordeiro-Stone M. Complementation of replication origin function in mouse embryonic stem cells by human DNA sequences. *Genomics.* 2004; 84(3):475-84.
54. Mesner LD, Crawford EL, Hamlin JL. Isolating apparently pure libraries of replication origins from complex genomes. *Mol Cell.* 2006; 21(5):719-26.
55. Dijkwel PA, Wang S, Hamlin JL. Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(9):3053-65.
56. Dijkwel PA, Mesner LD, Levenson VV, d'Anna J, Hamlin JL. Dispersive initiation of replication in the Chinese hamster rhodopsin locus. *Exp Cell Res.* 2000; 256(1):150-7.
57. Aladjem MI, Rodewald LW, Lin CM, Bowman S, Cimbora DM, Brody LL, Epner EM, Groudine M, Wahl GM. Replication initiation patterns in the beta-

- globin loci of totipotent and differentiated murine cells: evidence for multiple initiation regions. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(2):442-52.
58. Zhou J, Ashouian N, Delepine M, Matsuda F, Chevillard C, Riblet R, Schildkraut CL, Birshtein BK. The origin of a developmentally regulated IgH replicon is located near the border of regulatory domains for IgH replication and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(21):13693-8.
59. Aladjem MI. Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(8):588-600.
60. Heinzl SS, Krysan PJ, Tran CT, Calos MP. Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol.* 1991; 11(4):2263-72.
61. Altman AL, Fanning E. The Chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(4):1098-110.
62. Altman AL, Fanning E. Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(10):4138-50.
63. Wang L, Lin CM, Brooks S, Cimborra D, Groudine M, Aladjem MI. The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(8):3373-86.
64. Abdurashidova G, Danailov MB, Ochem A, Triolo G, Djeliova V, Radulescu S, Vindigni A, Riva S, Falaschi A. Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *EMBO J.* 2003; 22(16):4294-303.

65. Ghosh M, Liu G, Randall G, Bevington J, Leffak M. Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal c-myc replicator activity. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(23):10193-207.
66. Antequera F. Genomic specification and epigenetic regulation of eukaryotic DNA replication origins. *EMBO J.* 2004; 23(22):4365-70.
67. Wang L, Lin CM, Lopreiato JO, Aladjem MI. Cooperative sequence modules determine replication initiation sites at the human beta-globin locus. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(17):2613-22.
68. Machida YJ, Dutta A. Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J Biol Chem.* 2005; 280(8):6253-6
69. Kelly TJ, Brown GW. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:829-80.
70. Orr-Weaver TL, Johnson CG, Spradling AC. The role of ACE3 in *Drosophila* chorion gene amplification. *EMBO J.* 1989; 8(13):4153-62.
71. Kalejta RF, Li X, Mesner LD, Dijkwel PA, Lin HB, Hamlin JL. Distal sequences, but not ori-beta/OBR-1, are essential for initiation of DNA replication in the Chinese hamster DHFR origin. *Mol Cell.* 1998; 2(6):797-806.
72. Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(3):1098-108.
73. Pappas DL Jr, Frisch R, Weinreich M. The NAD(+)-dependent Sir2p histone deacetylase is a negative regulator of chromosomal DNA replication. *Genes Dev.* 2004; 18(7):769-81.
74. Pasero P, Bensimon A, Schwob E. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev.* 2002; 16(19):2479-84.

75. Blow JJ, Laskey RA. Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell*. 1986; 47(4):577-87.
76. Coverley D, Laskey RA. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:745-76.
77. Hyrien O, Méchali M. Plasmid replication in *Xenopus* eggs and egg extracts: a 2D gel electrophoretic analysis. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(7):1463-9.
78. Mahbubani HM, Paull T, Elder JK, Blow JJ. DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(7):1457-62.
79. Méchali M, Kearsley S. Lack of specific sequence requirement for DNA replication in *Xenopus* eggs compared with high sequence specificity in yeast. *Cell*. 1984; 38(1):55-64.
80. Spradling A, Orr-Weaver T. Regulation of DNA replication during *Drosophila* development. *Annu Rev Genet*. 1987; 21:373-403.
81. Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*. 1982; 30(3):675-86.
82. Carminati JL, Johnston CG, Orr-Weaver TL. The *Drosophila* ACE3 chorion element autonomously induces amplification. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(5):2444-53.
83. Tribioli C, Biamonti G, Giacca M, Colonna M, Riva S, Falaschi A. Characterization of human DNA sequences synthesized at the onset of S-phase. *Nucleic Acids Res*. 1987; 15(24):10211-32.

84. Giacca M, Zentilin L, Norio P, Diviacco S, Dimitrova D, Contreas G, Biamonti G, Perini G, Weighardt F, Riva S, et al. Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(15):7119-23.
85. Kumar S, Giacca M, Norio P, Biamonti G, Riva S, Falaschi A. Utilization of the same DNA replication origin by human cells of different derivation. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(17):3289-94.
86. Dimitrova DS, Giacca M, Demarchi F, Biamonti G, Riva S, Falaschi A. In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(4):1498-503.
87. Abdurashidova G, Riva S, Biamonti G, Giacca M, Falaschi A. Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *EMBO J*. 1998; 17(10):2961-9.
88. Rowley A, Cocker JH, Harwood J, Diffley JF. Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *EMBO J*. 1995; 14(11):2631-41.
89. Kusic J, Kojic S, Divac A, Stefanovic D. Noncanonical DNA elements in the lamin B2 origin of DNA replication. *J Biol Chem*. 2005; 280(11):9848-54.
90. Falaschi A, Abdurashidova G, Sandoval O, Radulescu S, Biamonti G, Riva S. Molecular and structural transactions at human DNA replication origins. *Cell Cycle*. 2007; 6(14):1705-12.
91. Abdurashidova G, Radulescu S, Sandoval O, Zahariev S, Danailov MB, Demidovich A, Santamaria L, Biamonti G, Riva S, Falaschi A. Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *EMBO J*. 2007; 26(4):998-1009.

92. Mendez J, Stillman B. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays*. 2003; 25(12):1158-67.
93. Bell SP. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev*. 2002; 16(6):659-72.
94. Rowles A, Blow JJ. Chromatin proteins involved in the initiation of DNA replication. *Curr Opin Genet Dev*. 1997; 7(2):152-7.
95. Lee DG, Bell SP. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(12):7159-68.
96. DePamphilis ML. The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene*. 2003; 310:1-15.
97. Chuang RY, Kelly TJ. The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(6):2656-61.
98. Iyerlyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol*. 2004; 146(1-2):11-31.
99. Erzberger JP, Berger JM. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2006; 35:93-114.
100. Bowers JL, Randell JC, Chen S, Bell SP. ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell*. 2004; 16(6):967-78.
101. Chesnokov I, Remus D, Botchan M. Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(21):11997-2002.

102. Klemm RD, Austin RJ, Bell SP. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell*. 1997; 88(4):493-502.
103. Klemm RD, Bell SP. ATP bound to the origin recognition complex is important for preRC formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(15):8361-7.
104. Seki T, Diffley JF. Stepwise assembly of initiation proteins at budding yeast replication origins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(26):14115-20.
105. Lipford JR, Bell SP. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell*. 2001; 7(1):21-30.
106. Foss M, McNally FJ, Laurenson P, Rine J. Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. *Science*. 1993; 262(5141):1838-44.
107. Fox CA, Loo S, Dillin A, Rine J. The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev*. 1995; 9(8):911-24.
108. Pak DT, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, Marr J, Romanowski P, Botchan MR. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*. 1997; 91(3):311-23.
109. Rowles A, Tada S, Blow JJ. Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci*. 1999; 112 (Pt 12):2011-8.
110. Asano M, Wharton RP. E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *EMBO J*. 1999; 18(9):2435-48.

111. Kreitz S, Ritzki M, Baack M, Knippers R. The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(9):6337-42.
112. Nguyen VQ, Co C, Li JJ. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature.* 2001; 411(6841):1068-73.
113. Li CJ, DePamphilis ML. Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(1):105-16.
114. Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature.* 1991; 353(6345):628-32.
115. Chastain PD 2nd, Bowers JL, Lee DG, Bell SP, Griffith JD. Mapping subunit location on the *Saccharomyces cerevisiae* origin recognition complex free and bound to DNA using a novel nanoscale biopointer. *J Biol Chem.* 2004; 279(35):36354-62
116. Lee DG, Makhov AM, Klemm RD, Griffith JD, Bell SP. Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. *EMBO J.* 2000; 19(17):4774-82.
117. Moon KY, Kong D, Lee JK, Raychaudhuri S, Hurwitz J. Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(22):12367-72.
118. Lee JK, Moon KY, Jiang Y, Hurwitz J. The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the

- replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(24):13589-94.
119. Chuang RY, Chretien L, Dai J, Kelly TJ. Purification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex: interaction with origin DNA and Cdc18 protein. *J Biol Chem*. 2002; 277(19):16920-7.
120. Chesnokov I, Gossen M, Remus D, Botchan M. Assembly of functionally active *Drosophila* origin recognition complex from recombinant proteins. *Genes Dev*. 1999; 13(10):1289-96.
121. Chesnokov IN, Chesnokova ON, Botchan M. A cytokinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(16):9150-5.
122. Clarey MG, Erzberger JP, Grob P, Leschziner AE, Berger JM, Nogales E, Botchan M. Nucleotide-dependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2006; 13(8):684-90.
123. Blow JJ. Control of chromosomal DNA replication in the early *Xenopus* embryo. *EMBO J*. 2001; 20(13):3293-7.
124. Kong D, Coleman TR, DePamphilis ML. *Xenopus* origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC. *EMBO J*. 2003; 22(13):3441-50.
125. Tugal T, Zou-Yang XH, Gavin K, Pappin D, Canas B, Kobayashi R, Hunt T, Stillman B. The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J Biol Chem*. 1998; 273(49):32421-9.

126. Masuda HP, Ramos GB, de Almeida-Engler J, Cabral LM, Coqueiro VM, Macrini CM, Ferreira PC, Hemerly AS. Genome based identification and analysis of the pre-replicative complex of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 2004; 574(1-3):192-202.
127. Witmer X, Alvarez-Venegas R, San-Miguel P, Danilevskaya O, Avramova Z. Putative subunits of the maize origin of replication recognition complex ZmORC1-ZmORC5. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(2):619-28.
128. Mori Y, Yamamoto T, Sakaguchi N, Ishibashi T, Furukawa T, Kadota Y, Kuchitsu K, Hashimoto J, Kimura S, Sakaguchi K. Characterization of the origin recognition complex (ORC) from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.). *Gene.* 2005; 353(1):23-30.
129. Collinge MA, Spillane C, Kohler C, Gheyselinck J, Grossniklaus U. Genetic interaction of an origin recognition complex subunit and the Polycomb group gene MEDEA during seed development. *Plant Cell.* 2004; 16(4):1035-46.
130. Giordano-Coltart J, Ying CY, Gautier J, Hurwitz J. Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(1):69-74.
131. Vashee S, Simancek P, Challberg MD, Kelly TJ. Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem.* 2001; 276(28):26666-73.
132. Prasanth SG, Prasanth KV, Stillman B. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science.* 2002; 297(5583):1026-31.
133. Radichev I, Kwon SW, Zhao Y, DePamphilis ML, Vassilev A. Genetic analysis of human Orc2 reveals specific domains that are required in vivo for

- assembly and nuclear localization of the origin recognition complex. *J Biol Chem.* 2006; 281(32):23264-73.
134. Dhar SK, Delmolino L, Dutta A. Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem.* 2001; 276(31):29067-71.
135. Ranjan A, Gossen MA. Structural role for ATP in the formation and stability of the human origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(13):4864-9.
136. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982; 1(8):945-51.
137. Quintana DG, Hou Zh, Thome KC, Hendricks M, Saha P, Dutta A. Identification of HsOrc4, a member of human origin recognition complex. *J Biol Chem.* 1997; 272(45):28247-51.
138. Eki T, Dean FB, Kohda A, Okumura K, Abe M, Murakami Y, Ishiai M, Satomoto K, Hurwitz J, O'Donnell M, Hanaoka F. Assignment of the homologue of the yeast origin recognition complex subunit ORC4 (ORC4L) to human chromosome band 2q22-->q23 by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Cytogenet Cell Genet.* 1998; 81(1):89-90.
139. Stamm S, Riethoven J-JM, Le Texier V, Gopalakrishnan C, Kumanduri V, Tang Y, Barbosa-Morais NL, Thanaraj TA. ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: D46-D55.
140. Thanaraj TA, Stamm S, Clark F, Riethoven JJM, Le Texier V, Muilu J. ASD: the Alternative Splicing Database. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: D64-D69.

141. Clark F, Thanaraj TA. Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. *Hum Mol Genetics*. 2002; 11:451-464.
142. Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Tutgay K, Bukau B. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett*. 2002; 529:6-10.
143. Kohwi-Shigematsu T., Kohwi, Y. Detection of non-B-DNA structures at specific sites in supercoiled plasmid DNA and chromatin with haloacetaldehyde and diethyl pirocarbonate. *Methods Enzymol*. 1992; 212, 155-180.
144. Stefanovic D, Stanojic S, Vindigni A, Ochem A, Falaschi A. In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin. *J Biol Chem*. 2003; 278(44):42737-43.
145. Siddiqui 2007Siddiqui K, Stillman B. ATP-dependent assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*. 2007; 282(44):32370-83.
146. Sinden, DNA structure and function, 1994, Academic press
147. Baran N, Neer A, Manor H. "Onion skin" replication of integrated polyoma virus DNA and flanking sequences in polyoma-transformed rat cells: termination within a specific cellular DNA segment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80(1):105-9.
148. Baran N, Lapidot A, Manor H. Unusual sequence element found at the end of an amplicon. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(7):2636-40.
149. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(19):5402-15.





РД 19700



300150240

СОBISS ©