

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Branko V. Tomić

**STRUKTURA TOPOLOŠKI ZATVORENE
ORI SEKVENCE
DIHIDROFOLATREDUKTAZNOG LOKUSA
U INTERAKCIJI SA INICIJACIONIM
PROTEINOM ORC**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Branko V. Tomić

**STRUCTURE OF TOPOLOGICALLY
CLOSED *ORI* SEQUENCE FROM
DIHYDROFOLATE REDUCTASE LOCUS
IN INTERACTION WITH INITIATION
PROTEIN ORC**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR:

- dr Jelena Kušić-Tišma, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
- dr Goran Brajušković, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA:

- dr Jelena Kušić-Tišma, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
- dr Goran Brajušković, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
- dr Dragana Stefanović, viši naučni saradnik u penziji, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
- dr Dragica Radojković, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane: _____

STRUKTURA TOPOLOŠKI ZATVORENE ORI SEKVENCE DIHIDROFOLATREDUKTAZNOG LOKUSA U INTERAKCIJI SA INICIJACIONIM PROTEINOM ORC

REZIME

Replikacija je jedan od osnovnih procesa u životnom ciklusu ćelije. Cilj replikacije je udvajanje genetičkog materijala. Da bi genetički materijal bio pravilno umnožen i kasnije razdvojen na ćerke ćelije, razvijen je veliki broj mehanizama regulacije replikacije. Jedan od načina regulacije je pravilan izbor i aktivacija mesta inicijacije replikacije.

Broj i kompleksnost mesta inicijacije replikacije varira među vrstama. Kod evolutivno nižih eukariota su jednostavnija, dok su kod viših eukariota kompleksnija. Način prepoznavanja ovih mesta od strane inicijacionih proteina nije u potpunosti razjašnjen.

Ori sekvenca, locirana nizvodno od gena DHFR (dihidrofolat reduktaza) hrčka, sadrži tri definisana *ori* mesta inicijacije replikacije: *ori* β , *ori* β' i *ori* γ . *Ori* β sekvenca DHFR je jak replikator i pokazuje aktivnost na ektopičnim mestima. Premda je *ori* sekvenca DHFR jedna od najbolje okarakterisanih *ori* sekvenci kod metazoa i u okviru nje definisani funkcionalno značajni regioni (AT bogati region, DNR region, BEND, RIP60 region, IR 4 bp), njihova funkcija nije u potpunosti razjašnjena.

Protein ORC (eng. *Origin recognition complex*) je heteroheksamer odgovoran za prepoznavanje mesta inicijacije replikacije. Pretpostavka je da nekoliko elemenata ima ulogu u prepoznavanju *ori* sekvence od strane ORC kompleksa kod metazoa.

Funkcija ljudskog proteina Orc4 (HsOrc4) do sad nije u potpunosti razjašnjena. Našim prethodnim istraživanjima, pokazali smo da HsOrc4

prepoznaje nekanonske strukture i ima sposobnost za utiče na formiranje TAT tripleksa i homoadeninskih struktura.

Dosadašnja istraživanja su vršena na linearnim fragmentima, pa je u ovom radu funkcija proteina HsOrc4 ispitivana na cirkularnoj, topološki zatvorenoj DNK, odnosno plazmidu. Za analizu je odabrana sekvenca *ori* β DHFR, uklonirana u plazmid u kojem zauzima strukturu najsličniju *in vivo* topologiji.

U ovom radu je analizirana struktura funkcionalno značajnih regiona *ori* β DHFR sekvence: AT bogatog regiona, DNR, BEND, RIP60. Ispitivano je vezivanje proteina HsOrc4 za superspiralizovanu formu plazmida i eventualna uloga u remodelovanju topologije plazmida i strukture odabranih funkcionalnih regiona *ori* β DHFR sekvence.

Analize su vršene nukleaznim i topoizomeraznim esejom. Nukleaza MB (eng. *Mung Bean*) prepoznaje i iseca jednolančane DNK regione, pa je korišćena za detektovanje nekanonskih struktura unutar plazmida. Topoizomeraza I relaksira plazmid i na taj način „zaključava“ promene topologije izazvane interakcijom sa proteinom HsOrc4.

Ovim istraživanjem je pokazano da topološki zatvoreni AT bogati region *ori* β DHFR formira nekanonsku strukturu. U interakciji sa proteinom HsOrc4, ova struktura nestaje. Moguće je da protein direktnom interakcijom modifikuje ovu strukturu ili da je promena strukture posledica izmene topologije celokupnog plazmida. Ostali ispitivani regioni ne zauzimaju nekanonske strukture na neutralnom pH. Na kiselom pH 5, DNR region zauzima alternativnu strukturu, dok AT region zauzima istu strukturu. Opstanak nekanonske strukture u okviru AT bogatog regiona na različitim pH vrednostima unutar topološki zatvorene sekvence *ori* β DHFR, za razliku od DNR regiona, sugeriše da strukture nisu podjednako osetljive na promene pH.

Pokazano je da se protein HsOrc4 preferencijalno vezuje za superspiralizovanu formu plazmida i modifikuje topologiju plazmida. Ove promena topologije su reverzibilne, jer nestaju po uklanjanju proteina i da bi sve

bile „zapamćene“, potrebno je prisustvo Topoizomeraze I. Protein HsOrc4 se intenzivnije vezuje za plazmid na pH 5 u odnosu na pH 7,5, formirajući komplekse velikih dimenzija.

Na osnovu rezultata ovog istraživanja možemo zaključiti da protein HsOrc4 uvodi topološke promene u plazmidu, koje se ispoljavaju upravo na nivou funkcionalno značajnih elemenata *ori* sekvence.

KLJUČNE REČI: HsOrc4, *ori* DHFR, superspiralizacija, Topoizomeraza I, *Mung Bean* nukleaza

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 577.213:544.13 (043.3)

STRUCTURE OF TOPOLOGICALLY CLOSED *ORI* SEQUENCE FROM DIHYDROFOLATE REDUCTASE LOCUS IN INTERACTION WITH INITIATION PROTEIN ORC

SUMMARY

Replication is one of the fundamental processes in the life cycle of the cell. The aim of replication is a duplication of genetic material. To make genetic material properly duplicated and subsequently divided into daughter cells, a large number of mechanisms of regulation of replication have been developed. One way of regulation is the proper selection and activation of replication initiation.

The number and complexity of the origins of replication (*ori*) varies among species. They are simpler at evolution lower eukaryotes, while in higher eukaryotes are more complex. The way of recognizing these places by initiation proteins is not fully understood.

Ori sequence, located downstream of the DHFR gene (dihydrofolate reductase) hamster, contains three defined origins of replication: *ori* β , *ori* β' and *ori* γ . *Ori* β DHFR sequence is strong replicator and shows activity at ectopic places. Although the sequence of *ori* DHFR is one of the best characterized *ori* sequences in metazoans and within defined functionally important regions (AT rich region, DNR region, BEND, RIP60 region, IR 4 bp), their function is still not completely understood.

ORC (Origin recognition complex) is heterohexamer protein responsible for identifying origins of replication. It is assumed that several elements play a role in recognizing *ori* sequences of the ORC complex in metazoans.

The function of the human protein Orc4 (HsOrc4) has not been fully elucidated. Our previous studies showed that HsOrc4 recognize non-canonical structures and has the ability to influence at formation of TAT triplexes and homo adenine structures.

Our previous studies are done on linear fragments, and in this work we examined the function of protein HsOrc4 the circular, topologically closed DNA, (plasmid). For the analysis of the *ori* β DHFR, this sequence was subcloned into the plasmid which forms the structure similar to topology *in vivo*.

In this work we analyzed the structure of functionally important regions of *ori* β sequence DHFR: AT rich region, DNR, BEND, RIP60. Also, we investigated binding properties of the protein HsOrc4 to supercoiled form of plasmid, and its possible role in the remodeling of plasmid topology and structure of selected regions of functional β DHFR *ori* sequences.

We performed assays with topoisomerase and nuclease. MB nuclease (Mung Bean) recognizes and cut single stranded DNA regions, and it is used to detect non-canonical structures within the plasmid. Topoisomerase I relax plasmid and thus "lock" topology changes caused by interaction with protein HsOrc4.

This research has shown that topologically closed AT rich region of *ori* β DHFR sequence form noncanonical structure. In the interaction with the protein HsOrc4, this structure disappears. It is possible that protein modifies this structure in direct interaction or the structural change is a consequence of changes in the the topology of the entire plasmid. Other regions studied do not form non-canonical structures at neutral pH. At acidic pH 5, DNR region occupies an alternative structure, while the AT region occupies the same structure. The survival of non-canonical structures in the AT rich regions at different pH values in the sequence of topological closed DHFR *ori* β , in contrast to the DNR region, suggest that the structures are not equally sensitive to pH changes.

It is shown that the protein preferentially binds to HsOrc4 supercoiled form of plasmids and modify the topology of plasmids. These topology changes are reversible, since they disappear as protein is removed and for its "remembering" requires the presence of Topoisomerase I. Protein HsOrc4 intensely bind to the plasmid at pH 5 than at pH 7.5, forming large complexes.

Based on the results of this study, we conclude that protein HsOrc4 introduces topological changes in plasmid that are expressed at the level of functionally important elements of *ori* sequences.

KEY WORDS: HsOrc4, *ori* DHFR, supercoiling, Topoisomerase I, Mung Bean nuclease

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 577.213:544.13 (043.3)

SKRAĆENICE:

ARS- autonomno replikujuće sekvence (eng. *A*utonomosly *r*eplicating *s*equences)

ACS- ARS konsenzus sekvence (eng. *A*RS *c*onsensus *s*equence)

ORC- kompleks ORC eng. *O*rigin *r*ecognition *c*omplex

Orc- subjedinica kompleksa ORC

ori- mesto inicijacije replikacije (eng. *O*rigin *o*f *r*eplication)

DHFR- dihidrofolat reduktaza

UTR- nekodirajući region (eng. *U*ntranslated *r*egion)

DNR region- eng. *D*inucleotide *r*epeat *e*lement

RIP60 region- eng. *60kDa* *r*eplication *i*nitiation *p*rotein *b*inding *s*ites

BEND region- eng. *S*equence-*i*nduced *s*table *b*end *i*n *t*he *D*NA

IR-eng. *I*nitiation *r*egion

WA- Voker A domen (eng. *W*alker *A*)

WB - Voker B domen (eng. *W*alker *B*)

ATP-adenozintrifosfat

Pre-RC- prereplikativni kompleks

MCM- eng. *M*inichromosome *m*aintenance *c*omplex

CDK- ciklin zavisne kinaze (eng. *C*yclin-*d*ependent *k*inases)

HMGA- proteini visoke pokretljivosti grupe A (eng. *H*igh *m*obility *g*rope *A*)

Lk- broj spona (eng. *L*inking *n*umber)

MB- eng. *M*ung *B*ean

RE- restikcioni enzim

SC DNK- superspiralizovana DNK (eng. *s*upercoiled *D*NA)

SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
1.1	INICIJACIJA REPLIKACIJE.....	1
1.2	ORI SEKVENCE.....	1
1.2.1	<i>Ori sekvence kvasaca.....</i>	3
1.2.2	<i>Ori sekvence Metazoa.....</i>	4
1.2.2.1	<i>Ori sekvenca DHFR.....</i>	6
1.3	ORC KOMPLEKS.....	10
1.4	PROTEIN HsORC4.....	18
2.	CILJ.....	25
3.	MATERIJAL I METODE.....	26
3.1	METODE ZA PREČIŠĆAVANJE I ANALIZU DNK.....	26
3.1.1	<i>Bakterijski sojevi korišćeni u radu.....</i>	26
3.1.2	<i>Izolacija plazmida.....</i>	26
3.1.3	<i>Topološki esej.....</i>	27
3.1.4	<i>Razdvajanje topoizomera.....</i>	27
3.1.5	<i>Nukleazni esej.....</i>	29
3.1.6	<i>Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA).....</i>	30
3.1.7	<i>Elektroforeza DNK u denaturišućem poliakrilamidnom gelu.....</i>	30
3.1.8	<i>Obeležavanje 5' krajeva DNK radioaktivnim izotopom fosfora.....</i>	31
3.2	METODE ZA EKSPRESIJU, PREČIŠĆAVANJE I ANALIZU PROTEINA.....	32
3.2.1	<i>Ekspresija proteina HsOrc4.....</i>	32
3.2.2	<i>Prečišćavanje rekombinantnog proteina HsOrc4.....</i>	33
3.2.3	<i>Glicerolski gradijenti.....</i>	34
3.2.4	<i>Elektroforeza proteina u gelu od SDS-poliakrilamida (SDS PAGE).....</i>	34
3.2.5	<i>Određivanje koncentracije proteina.....</i>	35
3.3	PUFERI KORIŠĆENI U RADU.....	35
4.	REZULTATI.....	38
4.1	STRUKTURA FUNKCIONALNIH REGIONA ORI/B SEKVENCE DHFR U TOPOLOŠKI ZATVORENOJ FORMI.....	39
4.1.1	<i>AT bogati region.....</i>	44
4.1.2	<i>Region BEND/RIP60.....</i>	49
4.1.3	<i>Region DNR.....</i>	56
4.2	PROTEIN-DNK INTERAKCIJE U OKVIRU ORI SEKVENCE DHFR.....	62
4.2.1	<i>Analiza strukture AT bogatog regiona u prisustvu proteina HsOrc4.....</i>	64

4.2.2	<i>Analiza vezivne sposobnosti proteina HsOrc4 za plazmid pMCD pri različitim uslovima sredine</i>	66
4.2.3	<i>Ispitivanje topoloških promena plazmida pMCD u prisustvu proteina HsOrc4</i>	70
4.2.4	<i>Analiza strukture AT bogatog regiona topoizomera</i>	76
5.	DISKUSIJA	78
6.	ZAKLJUČCI	85
7.	LITERATURA	86

1. UVOD

1.1 INICIJACIJA REPLIKACIJE

Replikacija predstavlja jedan od osnovnih ćelijskih procesa. Cilj je udvajanje genetičkog materijala i priprema za deobu ćelije. Ovo je semikonzervativan proces što znači da novonastali molekul DNK sadrži jedan stari i jedan novosintetisani lanac. Mesto započinjanja (inicijacije) replikacije naziva se ishodište replikacije (eng. *Origin of replication*) ili *ori* sekvenca. Na ovom mestu formira se replikaciono okce, odnosno, lanac DNK se razdvaja. Nezavisno od toga da li se replikacija odvija kod prokariota ili eukariota, ovo je bidirekcionni proces, što znači da se na jednom *ori* mestu formiraju dve replikacione viljuške koje se kreću u suprotnim smerovima. Sinteza DNK se odvija u smeru 5' → 3' tako što se jedan lanac sintetiše kontinuirano, a komplementarni lanac diskontinuirano, formiranjem Okazakijevih fragmenata. Kod prokariota, zbog relativno malog genoma, proces započinje sa jednog *ori* mesta, dok se kod eukariota, zbog veličine genoma, replikaciona okca formiraju na više mesta. Usled toga što je kod eukariota genom podeljen na veći broj hromozoma, organizacija replikacije je daleko kompleksnija i zahteva koordinisano aktiviranje brojnih mesta inicijacije [1].

1.2 ORI SEKVENCE

Veličina i broj mesta inicijacije kod eukariota variraju u zavisnosti od evolutivnog nivoa organizma. Kod kvasaca su jednostavnija, a kod viših metazoa kompleksnija i brojnija. Sve *ori* sekvence prepoznaje karakteristični protein koji formira osnovu za vezivanje ostalih proteina replikacione mašinerije. Mesta vezivanja ovih proteina neravnomerno su raspoređena po genomu i većinom se nalaze u intergenskim sekvencama. Kod različitih višećelijskih organizama

identifikovan je veliki broj *ori* sekvenci i utvrđeno je da kod složenijih eukariota neke od njih nisu aktivirane tokom pojedinačnog ćelijskog ciklusa. Tokom razvića, menja se broj aktiviranih *ori* sekvenci, što ukazuje na postojanje mogućih mehanizama njihove selekcije [2].

Šezdesetih godina dvadesetog veka postavljen je osnovni model inicijacije replikacije [3]. Ovaj model uvodi pojam replikona, jedinice sposobne za samostalnu inicijaciju replikacije. U okviru replikona možemo razlikovati dva elementa: replikator - sekvenca DNK koja definiše specifično mesto inicijacije replikacije i inicijator - protein koji prepoznaje i aktivira mesto inicijacije replikacije, a eksprimira se sa gena koji je udaljen od replikatora. Trenutak započinjanja replikacije zavisi od signala ćelije tokom ćelijskog ciklusa. Ovaj model je prihvaćen kao osnova za razumevanje inicijacije replikacije, ali oko definisanja elemenata i načina regulacije karakterističnih za ovaj model i dalje postoje nedoumice.

U okviru jednog regiona može postojati veći broj replikatora koji obezbeđuju njegovo replikovanje. Svi ovi replikatora ne moraju uvek biti aktivni, već je dovoljna aktivacija samo nekih od njih [4]. Takođe, replikatora se međusobno razlikuju po potentnosti aktiviranja, pa se neki aktiviraju češće, a neki ređe. Postojanje većeg broja replikatora osigurava da se u slučaju inaktivacije pojedinih, aktiviraju ostali, i time obezbedi nesmetan nastavak replikacije [5]. U okviru jednog replikatora, može biti veći broj neophodnih elemenata za njegovu aktivnost, a to se može pokazati mutacionom analizom [6]. Ukoliko po mutiranju izostane inicijacija replikacije, govorimo o esencijalnom elementu za taj replikator.

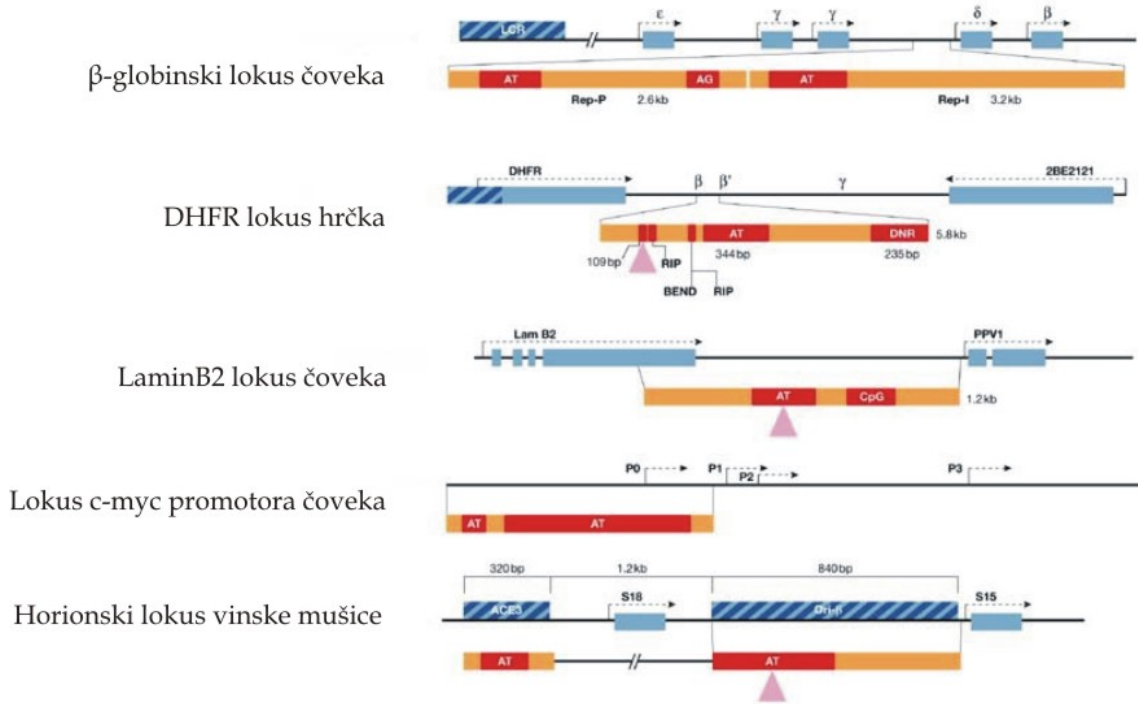
1.2.1 Ori sekvence kvasaca

Kod kvasaca, tipičnih predstavnika nižih eukariota, primećene su prve razlike u strukturi u odnosu na prokariotske modele *ori* sekvenci i mehanizme inicijacije replikacije. Kod pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) su identifikovane sekvence koje imaju sposobnost samostalnog repliciranja i nazvane su autonomno replikujućim sekvencama (eng. *Autonomously replicating sequences*, ARS). Ovi nekodirajući nizovi su dužine od oko 100 do 200 bp i sadrže konzerviran region nazvan ACS (eng. *ARS consensus sequence*) [7]. Nizovi ACS se u manjoj ili većoj meri poklapaju sa sekvencom od 11 bp, (A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/T), esencijalnom za funkciju inicijacije replikacije. Da bi se istakla razlika u konzerviranosti sekvence i mogućih uloga u inicijaciji replikacije, ACS je nazivan A element, dok je drugi, evolutivno divergentniji deo ARS, nazvan B element. Za potpunu funkcionalnost ARS potrebno je prisustvo oba ova elementa [8]. Pokazano je da inicijacioni protein ORC *S. cerevisiae* (eng. *Origin recognition complex*) specifično prepoznaje ACS *in vitro* i *in vivo*, i to na ATP zavistan način.

Ori sekvence kod pivskog kvasca, *Schizosaccharomyces pombe*, pokazuju drugačiju strukturu. Za razliku od *S. cerevisiae*, kod *S. pombe* *ori* sekvence su znatno duže (preko 500 bp), uglavnom smeštene između gena. Daleko su bogatije AT parovima i iako ne poseduju konsenzus sekvence, ovaj AT bogati region predstavlja mesto specifičnog vezivanja proteina ORC. Pokazano je da, ako se *ori* sekvenca zameni nizom asimetričnih AT ponovaka, ne dolazi do gubljenja funkcije u inicijaciji replikacije [9]. Činjenica da strukturno homologni ORC proteini mogu prepoznati različite sekvence, sugerira da u selekciji *ori* sekvenci ulogu imaju i epigenetski faktori kao što je, na primer, struktura hromatina u ovim regionima.

1.2.2 Ori sekvence Metazoa

Inicijacione zone viših eukariota (Metazoa) su znatno većih dimenzija nego kod kvasaca. Inicijacione zone kod sisara su, na primer, veličine od 100 do 500 kb [10]. Tokom analize strukture mesta inicijacije replikacije viših eukariota primećeno je da se *ori* sekvence mogu podeliti u dve grupacije. Prvu grupu *ori* sekvenci odlikuje definisano mesto inicijacije replikacije koje ima tačnu poziciju i aktivira se sa velikom učestalošću, slično kao kod kvasca. *Ori* sekvence pokazuju replikativnu aktivnost i na ektopičnim mestima, što je dokaz da funkcionišu kao nezavisni replikator. Ovaj tip replikatora se naziva ograničenom replikativnom zonom i prisutan je kod *ori* sekvenci horionskog lokusa vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) [11], β globina čoveka [12] i lamin B2 [13] (Slika 1). Sa druge strane, postoje replikoni (proširena inicijaciona zona) koji se odlikuju širokom inicijacionom zonom sa velikim brojem mesta inicijacije. Proširene inicijacione zone sadrže veći broj slabijih replikona, a učestalost njihove aktivacije može da varira u zavisnosti od uslova sredine, epigenetskih modifikacija ili transkripcione aktivnosti u blizini mesta aktivacije. Ovakav tip inicijacione zone imaju *ori* sekvence DHFR [14] i rodopsina hrčka [15] (Slika 1).



Slika 1. Osobine replikatora metazoa koji su aktivni na ektopičnim mestima. Geni koji okružuju pet *ori* sekvenci su prikazani plavim, dok su šrafirano plavi kvadrati elementi neophodni za inicijaciju replikacije. Inicijacioni region u svakom lokusu (roze trouglovi). U svakom replikatoru (žuto) predstavljen je i deo neophodan za potpunu inicijaciju (crveno) [16].

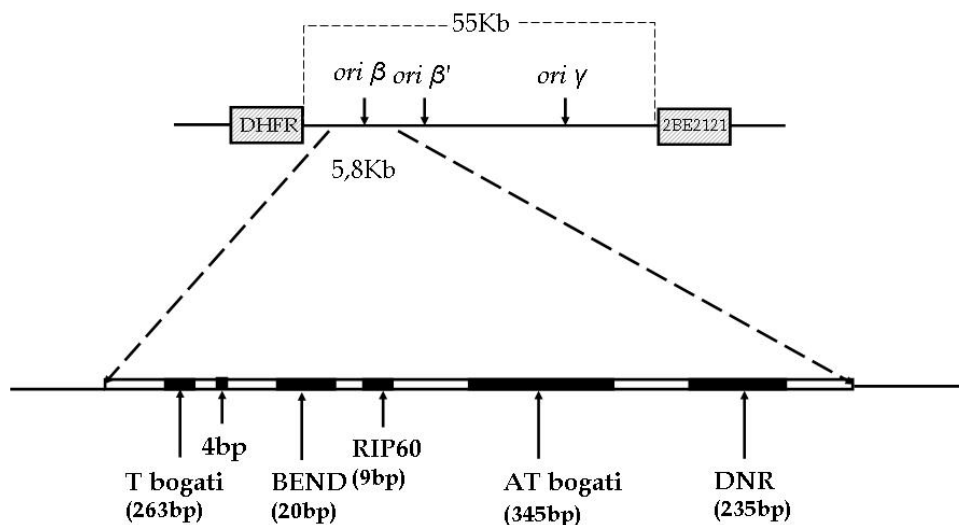
Postoje mišljenja da dva gore navedena načina organizovanja inicijacionih zona, predstavljaju ekstremne modele, a da većina zona ima mešovitu organizaciju. Naime, moguće je da se slabija *ori* mesta unutar proširenih inicijacionih zona pasivno replikuju kao posledica aktiviranja efikasnijih i jačih replikatora ograničenih replikativnih zona koje se nalaze u relativnoj blizini [17]. Sa druge strane, postoje slučajevi kad slabi replikator biva inhibirani od strane jačih replikatora. Takav je slučaj sa *ori* DHFR lokusom, gde je posle uklanjanja određenih regiona unutar ove inicijacione zone došlo do povećanja aktivnosti preostalog dela regiona [18]. Postoje i „uspavani“ replikator koji se aktiviraju

samo u uslovima stresa [19] [20]. Ovi replikatori vezuju inicijacione proteine, ali se aktiviraju u uslovima kada izostane aktiviranje jačih replikatora. Na ovaj način se osigurava potpuna replikacija velikih genoma uz relativno mali broj aktivnih replikatora.

Kao što je već opisano u slučaju *S. pombe*, i kod metazoa, za inicijaciju replikacije potrebna je kooperacija više elemenata DNK. AT bogati regioni [6], mesta vezivanja za matriks [21], mesta vezivanja transkripcionih faktora [21], CpG ostrvca [21], dinukleotidni ponovci [6] i asimetrične purinsko-pirimidinske sekvence jesu domeni karakteristični i esencijalni za funkcionalnost *ori* sekvence. Topologija DNK tokom procesa transkripcije kao i hromatinska struktura, takođe mogu da utiču na izbor i vremenski profil aktiviranja replikona. Acetilacija histona je, takođe, jedan od epigenetskih faktora koji mogu da utiču na aktivnost replikatora i na pozicioniranje inicijacionih proteina [22].

1.2.2.1 *Ori* sekvenca DHFR

Jedno od najbolje definisanih ishodišta replikacije jeste *ori* sekvenca DHFR (dihidrofolat reduktaza) hrčka. *Ori* sekvenca DHFR hrčka se nalazi u blizini gena za DHFR lociranog na hromozomu 2p23 [23]. Locirana je u regionu između gena DHFR i 2BE2121 i obuvata oko 55 kb (Slika 2). U okviru ovih 55 kb nalaze se tri mesta inicijacije replikacije: *ori* β (oko 17 kb nizvodno od gena DHFR), *ori* β' nizvodno od *ori* β i *ori* γ (23 kb nizvodno od *ori* β') [24] [25]. Neki autori smatraju da se ne može govoriti o tri definisana lokusa, već o širem potentnom regionu u kome se izdvajaju dva preferabilna regiona za inicijaciju replikacije [26] ili o većem regionu sastavljenom od više malih, i definisanih regiona nepravilno raspoređenih unutar *ori* regiona [14]. Eksperimenti pokazuju da u ovom regionu od 55 kb postoji barem 19 mesta inicijacije replikacije koja se aktiviraju u ranoj S fazi ćelijskog ciklusa.



Slika 2. Funkcionalno značajni regioni DHFR *ori β* sekvence

DHFR *ori β* funkcioniše kao nezavisan i jak replikator i za inicijaciju replikacije mu nije neophodno prisustvo *ori β'* i *ori γ* [27]. *In vitro*, *ori β* ipak ima različitu aktivnost u zavisnosti od okruženja u koje je ukloniran, odnosno pokazuje određen pozicioni efekat. Tu sposobnost pokazuje na ektopičnim mestima u ćelijama hrčka ili ćelijama čoveka. Sa druge strane, postoje dokazi da *ori β* nije esencijalni replikator za inicijaciju replikacije unutar *ori* DHFR regiona [28]. Usled delecije *ori β* u ispitivanim ćelijskim linijama nije primećena smanjena aktivnost inicijacione zone, jer su tu ulogu, u odsustvu *ori β*, preuzela ostala dva *ori* mesta. Ovo potvrđuje prethodno iznete tvdnje, da ulogu inaktiviranog, a u ovom slučaju deletiranog, replikatora mogu da preuzmu, susedni, iako možda slabiji replikator. Nakon delecije sve tri *ori* sekvence DHFR nije došlo do kašnjenja u inicijaciji replikacije ovog regiona tokom rane S faze [28], pa izgleda cela zona biva replikovana sa susednog jakog replikatora. Možemo reći da nijedan replikator pojedinačno nije esencijalan za inicijaciju replikacije. Njihov broj i raspored po

genomu, omogućava dinamičnu i regulisanu aktivnost, koja za rezultat ima pravilno umnožen genetički materijal.

Aktivnost inicijacione zone DHFR može biti regulisana i epigenetskim faktorima. Pokazano je da 3' UTR region gena DHFR reguliše aktivaciju *ori* sekvenci DHFR [29] što upućuje na moguću vezu transkripcione i replikativne mašinerije. Transkripcija gena DHFR povećava inicijaciju replikacije unutar DHFR *ori* sekvence tokom rane S faze i suprimira inicijaciju replikacije unutar gena [30]. Pored uloge u inicijaciji replikacije, pokazano je da *ori* DHFR ima i ulogu u vezivanju ovog dela DNK za nuklearni matriks [31]. Takođe, pokazano je da je za selektivnu aktivaciju ovog replikatora *in vitro* bio odgovoran molarni odnos ispitivanih inicijacionih proteina i DNK [32]. Broj aktiviranih replikatora bio je srazmeran upotrebljenoj količini inicijacionih proteina u eksperimentu.

Analizom strukture *ori* β DHFR, uklonirane u plazmid, je pokazano da određeni domeni ove sekvence mogu da zauzmu Z formu heliksa DNK i da je ova struktura odgovorna za progresiju replikacione viljuške [33]. Zanimljivo je da na kiselom pH ovaj domen može da formira trolančanu strukturu sa B-DNK zavojnicom. Mutacionom analizom *ori* β otkriveno je da je za aktivnost inicijacije neophodno više različitih sekvenci i da je svaka neophodna za funkcionisanje ovog replikatora [27]. Međutim, u okviru ovih funkcionalnih elemenata nisu identifikovane konsenzus sekvence.

U okviru 5,8 kb dugačke *ori* β sekvence definisani su domeni esencijalni za funkcionisanje DHFR *ori* sekvence: AT bogati region, DNR region, IR, RIP60 (Slika 2) [6]. Svaki od njih je neophodan, ali ne i pojedinačno dovoljan za potpunu inicijacionu aktivnost DHFR *ori* sekvence.

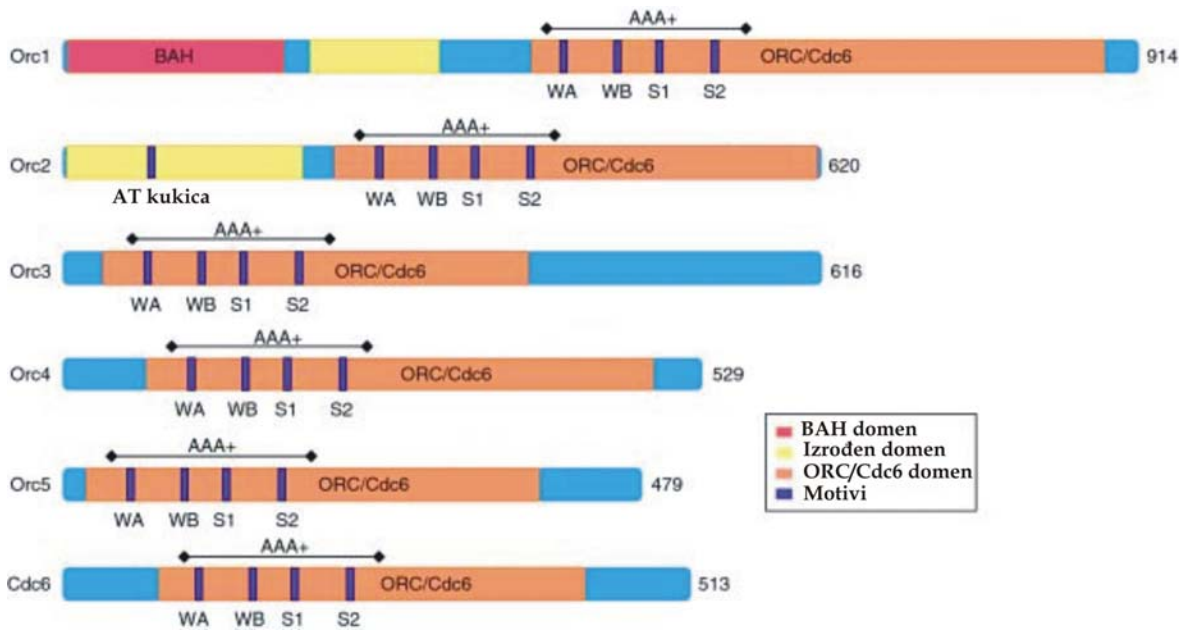
Osobine pojedinačnih domena u okviru DHFR:

- **AT bogati region** (eng. *(AT)_n repeats and AT-rich sequences*) – Ovaj region je karakterističan za svaku *ori* sekvencu. Unutar replikatora Lamin B2 postoji AT sekvenca bitna za vezivanje proteina odgovornih za ćelijski ciklus [34]. Pretpostavlja se da, na osnovu homologije sa ovom sekvansom, i AT bogati region DHFR *ori* β može biti mesto vezivanja inicijacionih proteina. Nađeno je da AT bogati region unutar DHFR *ori* β ima mesta homologna mestu vezivanja ORC-a kod *S. pombe* ARS elementa kao i kod elementa za kontrolu umnožavanja ACE3 (eng. *Amplification control element*) horionskog lokusa *D. melanogaster*. Deletanti za ovaj region su pokazali smanjenje aktivnosti inicijacije replikacije [6].
- **DNR region** (eng. *GA+CA Dinucleotide repeat element*) – Ovaj region je bogat GA dinukleotidnim ponovcima. Pretpostavlja se da ova struktura usporava ili zaustavlja napredovanje replikativne viljuške. Da bi se utvrdilo da li je za punu aktivnost ovog replikatora neophodna specifična sekvenca, rađena je mutaciona analiza. Utvrđeno je da za punu aktivnost replikatora neophodna specifična sekvenca identične orijentacije. Analizama *in vitro* pokazano je da ovaj region može da formira dve nekanonske strukture: levogiru Z-zavojniciu i tripleks DNK strukture. Delecionom analizom je pokazano da je prva polovina ovog regiona odgovorna za funkcionalne karakteristike, dok druga polovina doprinosi tome u manjoj meri [6].
- **RIP60 region** (eng. *60 kDa Replication initiation protein binding sites*) – Ovo je mesto vezivanja RIP60 inicijacionog proteina koji ima strukturu cinkanih prstića. Kod mutiranog RIP60 regiona menja se lokalna struktura DNK i opada aktivnost *ori* β [6].

- **BEND region** (eng. *Sequence-induced stable bend in the DNA*) - Zamenom 5 nukleotida AT trakta GC parovima iste dužine, ispravljena je struktura ovog „savijenog“ regiona, što je za posledicu imalo smanjenje inicijacione aktivnosti [6].
- **IR 4 bp** (eng. *Initiation region*) - Deletanti za ovaj region su pokazali smanjenje aktivnosti inicijacije replikacije. Delecija 4 bp odgovara polovini navoja spirale i mogla bi da naruši mesto vezivanja inicijacionih proteina ili njihovu interakciju. Zamenom ove sekvence (GGCC) sekvencom iste dužine (CATG) ne dolazi do obnavljanja aktivnosti [6].

1.3 ORC KOMPLEKS

Proteinski kompleks koji je odgovoran za prepoznavanje *ori* sekvence nazvan je ORC (eng. *Origin recognition complex*). Kao i *ori* sekvence, prvo je izolovan i najbolje okarakterisan ORC pekarskog kvasca *S. cerevisiae*. Izolovan je na osnovu svoje sposobnosti da specifično prepozna ARS element *ori* sekvenci [35]. Proteinski kompleks ScORC se sastoji od šest subjedinica označenih brojevima od 1 do 6, na osnovu svoje veličine (Slika 3). Geni za ovaj heteroheksamer su raspoređeni na različitim hromozomima i veličine su od 1308 bp do 2745 bp [36].



Slika 3. Struktura i poređenje domena proteina Orc1-5 i Cdc6 *S. cerevisiae*. Orc1, Orc4, Orc5 i Cdc6 sadrže AAA+ domen kao deo većeg ORC/Cdc6 domena (narandžasto), Orc2 and Orc3 po predikciji sadrže ovu strukturu. Motivi: Voker A (WA), Voker B (WB), Senzor-1 (S1) i Senzor-2 (S2). Broj aminokiselina prikazan sa strane [37].

Pojedinačne ORC subjedinice, kao i ceo kompleks, su indentifikovane kod pivskog kvasca i kod metazoa (*Drosophila melanogaster*, *Xenopus levis* i kod čoveka). Subjedinice Orc1-5 pokazuju određen stepen homologije [1] i veličina subjedinica ne varira od vrste do vrste. Veličina gena Orc1-5 je mnogo veća kod viših eukariota zbog prisustva intronskih sekvenci koje izostaju kod pekarskog kvasca. Proteini Orc 1-5 kao i protein Cdc6, koji interaguje sa ORC-om tokom inicijacije replikacije imaju strukture AAA+ spirale. Ove strukture su karakteristične za ATP-zavisne proteine i omogućavaju formiranje prstenaste strukture oko DNK. Kod *Archea*, AAA+ domen Orc1 subjedinice direktno doprinosi vezivanju za *ori* sekvencu [38].

Unutar AAA+ domena detektovani su regioni nazvani Senzor 1 i 2 (Slika 3) koji prepoznaju vezane molekule ATP-a ili ADP-a [39], kao i dva ATP funkcionalna domena: Voker A (WA, domen za vezivanje ATP-a) i Voker B (WB,

domen za hidrolizu ATP-a) (Slika 3). Ovi domeni su definisani i kod viših eukariota, ali njihova uloga, odnosno uticaj ATP-a na DNK vezivnu sposobnost subjedinica, nije u potpunosti ispitana.

Iako član proteinskog kompleksa ORC, Orc6 subjedinica pokazuje malu evolutivnu sličnost sa ostalim subjedinicama Orc1-5. Subjedinica Orc6 veoma je malo konzervirana kod pivskog kvasca u odnosu na metazoe [40]. Ovo upućuje na moguće različite uloge ove subjedinice kod vrsta. Sa druge strane, C terminalni kraj Orc1 i Cdc6 pokazuju sličnost sa celokupnom sekvencom proteina Orc4 i skoro celom Orc5, što ukazuje na zajedničko evolutivno poreklo, od predačkog inicijacionog proteina koji je evoluirao u višeproteinski kompleks [41].

Konzerviranost proteina ORC sugeriše da postoji zajednički mehanizam inicijacije replikacije kod eukariota, iako se *ori* sekvence eukariota drastično razlikuju i ne dele zajedničke konsenzus sekvence.

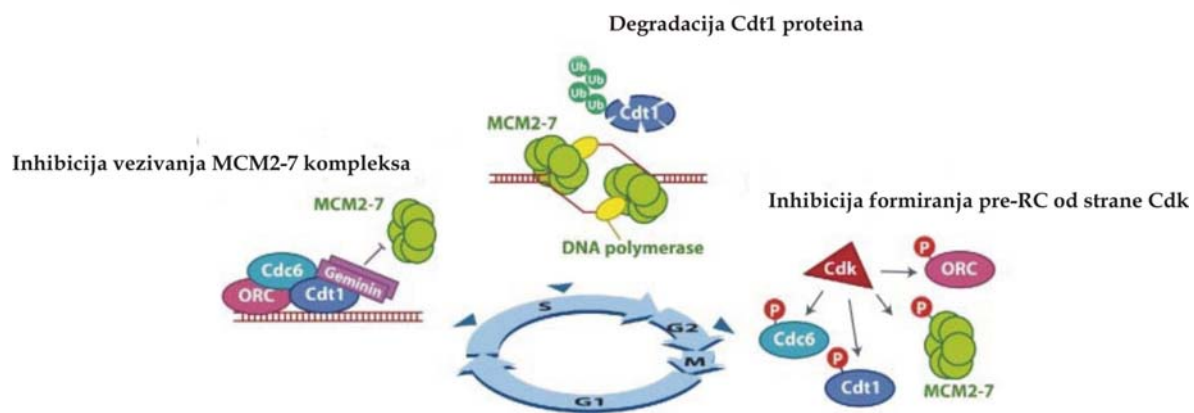
1.3.1 Regulacija inicijacije replikacije

Inicijacija replikacije se može podeliti u dva osnovna koraka: prvi korak, prepoznavanje replikatora i formiranje prereplikativnog kompleksa (eng. *Pre-RC*) i drugi korak, inicijacija replikacije i sprečavanje ponovnog aktiviranja replikatora [42].

Pre-RC se formira tokom prelaska iz M u G₁ fazu ćelijskog ciklusa i održava se tokom G₁, a aktivira se tokom S faze [1] (Slika 4). Vezivanje proteina ORC za replikator je kod svih eukariota prvi korak u formiranju *Pre-RC*. Pokazano je da protein ORC ostaje vezan za *ori* sekvencu kroz skoro ceo ćelijski ciklus [43] [44]. Nakon vezivanja ORC-a za replikator, vezuje se protein Cdc6 koji za sebe ima vezan ATP. Na ovako formiran kompleks, vezuju se protein Cdt1, a zatim i proteinski kompleks MCM2-7 (eng. *minichromosome maintenance complex*). Hidrolizom ATP-a, posredstvom proteina Cdc6, dolazi do konformacionih promena unutar kompleksa MCM2-7 i njegovog čvršćeg vezivanja za DNK, kao i

oslobađanja proteina Cdt1. Nakon hidrolize ATP-a, može da otpočne novi ciklus vezivanja MCM2-7 kompleksa. Pretpostavke su da kompleks MCM2-7 ima funkciju DNK helikaze. Pokazano je da ovaj kompleks ne može samostalno da rasplete DNK, tako da je za ovu funkciju verovatno potrebna interakcija sa ostalim komponentama inicijacionog kompleksa. Smatra se da je broj kompleksa MCM2-7 u ćeliji veći od broja replikatora, odnosno da nisu svi sve vreme vezani za replikatore i da je reč o dinamičnoj strukturi.

Formiranje *Pre-RC*-a je regulisano ciklin zavisnim kinazama (eng. *cyclin-dependent kinases*, CDK) čiji nivo aktivnosti varira tokom ćelijskog ciklusa. Za vreme M i G1 faze, smanjena je aktivnost CDK i omogućeno formiranje *Pre-RC*. Tokom S i G2 faze aktivnost CDK je najveća i na taj način omogućena je inicijacija replikacije, ali je sprečeno ponovno formiranje *Pre-RC*. Tokom M i G1 faze ponovno je smanjena aktivnost CDK i dozvoljeno ponovno formiranje *Pre-RC*. Na ovaj način se postiže da se replikator aktivira samo jednom tokom jedne ćelijske deobe i da bude pripremljen za sledeću.



Slika 4. Formiranje *Pre-RC* i mogući načini kontrole aktivacije replikona tokom ćelijskog ciklusa [45].

ORC kompleks služi i kao kontrolna tačka u regulaciji ćelijskog ciklusa. Blokiranje translacije proteina HsOrc2 rezultuje zaustavljanjem formiranja kompleksa HsOrc u ćelijama čoveka i zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G1 fazi [46]. Na važnost proteina ORC u inicijaciji replikacije ukazuje činjenica da broj vezanih proteina kompleksa MCM2-7 za DNK zavisi od broja vezanih molekula proteina ORC. Kod kvasca je, na primer, pokazano da su mutacije proteina ORC-a koje dovode do smanjenja broja vezanih proteina MCM2-7, letalne za ćeliju [47].

Usled primećene dinamike ORC kompleksa tokom ćelijskog ciklusa, uveden je pojam ORC ciklusa [48, 49]. Ovo je višestepeni proces u kome je vezivanje proteina ORC za DNK inhibiran od prelaza iz G1 u S fazu do formiranja jedra u M fazi, a postaje ponovo omogućeno tokom G1 faze. Međutim, koraci u ORC ciklusu mogu varirati između vrsta i tokom razvića. Kod kvasaca, ORC ostaje vezan za DNK tokom celog ćelijskog ciklusa, dok kod višćelijskih organizama jedna ili više subjedinica disocira od kompleksa. Orc1 subjedinica kod sisara i čoveka disocira od kompleksa i najčešće biva degradovana nakon ubikvitinacije tokom S faze ćelijskog ciklusa (Slika 4) [50].

1.3.2 Interakcija ORC i *ori* sekvence

Pored uloge u formiranju prereplikacionog kompleksa, smatra se da ORC ima ulogu u prepoznavanju (eng. *licencing*) *ori* sekvenci. Analizom ScORC utvrđeno je da tri subjedinice ovog kompleksa (ScOrc 2, 4, 5) formiraju bliske kontakte sa DNK. Iako subjedinica 6 ne vezuje DNK, ona je neophodna za vezivanje celog kompleksa za *ori* sekvencu *in vivo* [44]. Ovi rezultati su potvrđeni radom Prasanth SG i saradnika, s tim što je sugerisano da pored uloge u replikaciji verovatno ima dodatnu ulogu u citokinezi [51]. Sa druge strane, svih šest subjedinica ORC kompleksa *D. melanogaster* je neophodno za efikasno vezivanje celog kompleksa kao i za replikaciju DNK *in vitro* [52]. Kod *S. cerevisiae* vezivanje ORC za DNK je proces zavistan od ATP-a i specifično se vezuje za definisana ARS

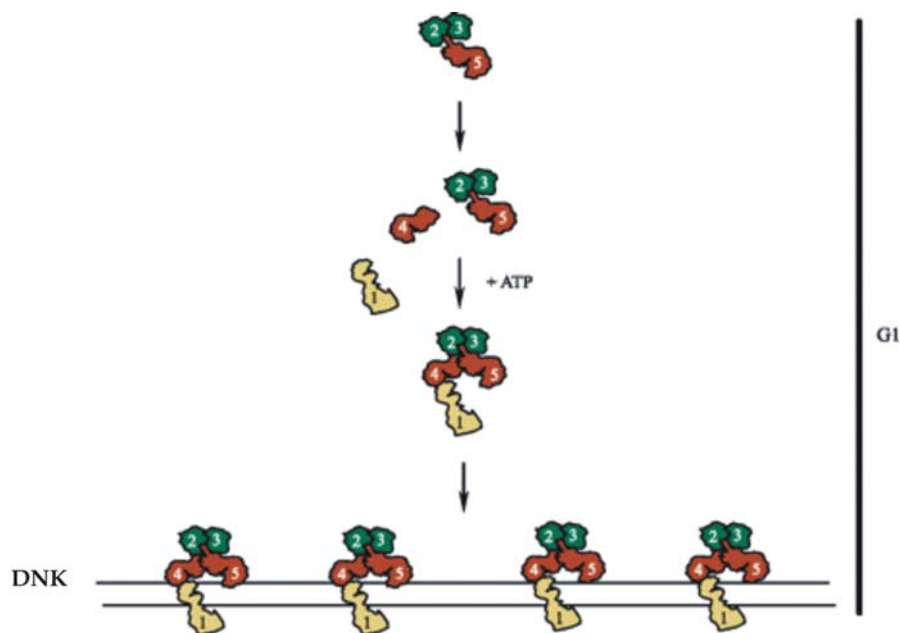
mesta. Takođe je pokazano da se eksprimira kroz ceo ćelijski ciklus i da nivo proteina subjedinica ne fluktuiraju [53].

Kod *S. pombe* vezivanje kompleksa ORC je zavisno od Orc4 subjedinice. Prisustvo mnogobrojnih motiva AT-kukica kod proteina SpOrc4 omogućava vezivanje za AT bogati region *ori* sekvence. Šta više, pokazano je da je ova subjedinica dovoljna za vezivanje kompleksa za DNK i to na ATP nezavisan način [54]. Ostale subjedinice SpORC ne pokazuju specifično vezivanje za DNK, niti ometaju vezivanje Orc4 subjedinice za *ori* sekvencu [55]. Ovakva homologija u strukturi Orc4 subjedinice nije nađena kod ostalih vrsta, ali je isti tip strukture i ista funkcija AT kukica već primećena i opisana kod familije proteina visoke pokretljivosti (eng. *High mobility group A*, HMGA) [56].

Ori sekvence metazoa su većih dimenzija i slične po kompleksnosti odgovarajućim sekvencama *S. pombe*. AT bogati regioni metazoa, koje prepoznaju inicijacioni proteini, pokazuju međusobnu sličnost u sekvenci i do 80%. Protein ORC izolovan iz *Xenopus laevis* i ljudski ORC se čak vezuju za istu AT bogatu sekvencu kao i SpORC [57].

Protein ORC *D. melanogaster* (DmORC) se preferencijalno vezuje za negativno superspiralizovanu DNK, što sugeriše da je za prepoznavanje *ori* sekvence pored sekvence, bitna i topologija DNK [58]. Zanimljivo je da DmORC pokazuje specifičnost za vezivanje za heterohromatinske regione što upućuje na moguću dodatnu ulogu u remodelovanju strukture hromatina [59]. Kao i kod *S. cerevisiae*, Orc6 subjedinica kod *D. melanogaster* ima ulogu u citokinezi i njen C terminalni kraj zauzima strukturu sličnu transkripcionom faktoru TFIIB kod čoveka sugerišući da su transkripcioni i replikacioni proteini koevoluirali [60]. *In silico* analizom genoma *D. melanogaster* je utvrđeno postojanje oko 5000 mesta vezivanja ORC kompleksa koji su pretežno lokalizovani u otvorenim hromatinskim strukturama, odnosno u blizini transkripciono aktivnih mesta [61].

Ispitivanjem u bakulovirusnom ekspresionom sistemu praćena je dinamika međusobnog vezivanja ORC subjedinica čoveka (HsORC) [62]. Ovom analizom utvrđena je interakcija između subjedinica 2 i 3. Nakon formiranja dimera, priključuje im se subjedinica HsOrc5 i stabilizuje naknadno vezivanje subjedinice HsOrc4, formirajući na taj način jezgro ORC kompleksa (eng. *core complex*) (Slika 5). HsOrc4 može da se veže za dimer Orc2-3 i samostalno, bez prisustva subjedinice 5, ali je takva veza nestabilna.



Slika 5. Formiranje jezgra HsORC kompleksa i vezivanje za DNK tokom G1 faze ćelijskog ciklusa [63]

Subjedinica 1 predstavlja regulatorni faktor u aktiviranju celog kompleksa HsORC. Smanjenjem količine HsOrc1 inaktivira se HsORC kao i stabilnost vezivanja proteina MCM za DNK [64]. Moguće je postojanje i dodatnih proteina koji pomažu vezivanje HsORC kompleksa za replikatore. Pokazano je da protein Ku koimunoprecipitira sa subjedinicom HsOrc2, ali ne i sa ostalim subjedinicama ORC-a izolovanog iz nuklearnog ekstrakta [65]. Kod ćelija mutiranih za protein Ku

dolazi do smanjenog vezivanja HsORC za replikatore, iako ova mutacija ne utiče na nivo ekspresije proteina ORC [66].

Rekombinantni protein HsORC pokazuje DNK vezivnu sposobnost, vezujući se za fragmente Lamin B2 *in vitro* [57]. Vezivanje je moguće i bez ATP-a, ali je ipak stimulirano u njegovom prisustvu. HsORC se preferencijalno vezuje za AT bogate sekvence, ali ne pokazuje preferencijalno vezivanje za *ori* sekvence čoveka. Rekombinantni HsORC kompleks, koji se sastoji od subjedinica 1-5, stimuliše inicijaciju sa bilo koje DNK sekvence *in vitro*. Ovo sugerira da se inicijacija kod metazoa može odvijati sa nasumičnih mesta, ali da preferira AT bogate regione. Nakon fosforilacije, HsOrc2 disocira ceo ORC kompleks sa hromatina, što ukazuje da nije samo Orc1 subjedinica odgovorna za regulaciju integriteta kompleksa ORC-a [67]. Novija istraživanja su sugerisala da u ćelijama čoveka postoje ORC-pomoćni proteini (ORC-A) koji su odgovorni za vezivanje ORC kompleksa za hromatin tokom postreplikativne faze ćelijskog ciklusa [68]. Mutacije ovih proteina dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi.

Kao i kod *D. melanogaster*, potvrđena je sličnost HsOrc6 sa transkripcionim faktorom TFIIB što potvrđuje DNK vezivnu sposobnost ove subjedinice [60]. Subjedinica 6 Orc kompleksa čoveka, ne učestvuje u formiranju jezgra kompleksa i ima dodatnu ulogu sem one u formiranju *Pre-RC*. Pored interakcije sa subjedinicama Orc1-5, HsOrc6 interaguje i sa proteinom Cdc6, kao i sa proteinom šaperonom HMGA1 (*High mobility group protein A1a*) i na taj način stimuliše vezivanje ORC za DNK [69]. U eksperimentima sa ćelijama vinske mušice u kojima je bio mutiran protein DmOrc6, homolog HsOrc6 čoveka uspeo je da nadomesti funkciju u inicijaciji replikacije, što govori u prilog evolutivnoj konzerviranosti ovog proteina kod metazoa [70].

Mutacionom analizom Voker A motiva kod subjedinica 1, 4, 5 ORC kompleksa čoveka primećena je smanjena DNK vezivna aktivnost jezgra HsORC kompleksa *in vitro* [71]. Prisustvo ATP-a nije imalo uticaja na međusobno vezivanje Orc2, Orc3, Orc5 subjedinica. Međutim, prisustvo ATP-a stimuliše vezivanje Orc4 subjedinice za subkompleks Orc2,3,5, kao i naknadno vezivanje Orc1 za kompleks Orc2-5 [63]. Autori su pokazali da se tokom S faze nakon disocijacije HsOrc1 subjedinice, od kompleksa odvaja i Orc4 subjedinica, dok veza između subjedinica 2,3,5 ostaje konstantna tokom celog ćelijskog ciklusa. Moguće je da ORC kompleks nakon disocijacije i potonje degradacije Orc1, disosuje na Orc4 subjedinicu koja ostaje vezana za DNK i subkompleks 2,3,5 koji disosuje sa DNK [63, 72].

Mapiranjem i *in silico* analizom je potvrđeno da se ORC i MCM kompleks vezuju za inicijacione zone *ori* DHFR sekvence sa velikom preferencijom [73]. Vezivna mesta za ORC nalaze se u regionima bez nukleozoma, kao i u blizini mesta početka transkripcije.

Budući da su u našim eksperimentima prevashodno ispitivana svojstva proteina HsOrc4, ovaj protein biće opisan malo detaljnije.

1.4 PROTEIN HsOrc4

Kao što je već pomenuto, subjedinica 4 je jedna od šest subjedinica inicijacionog kompleksa ORC. Subjedinica 4 ljudskog ORC kompleksa (HsOrc4) je eksprimirana tokom celog ćelijskog ciklusa i procenjuje se da je eksprimirano 5×10^5 molekula ovog proteina po ćeliji. Poređenjem sekvenci utvrđena je sličnost sa ScOrc4 od 29%. Takođe, detektovan je nukleotidtrifosfat (NTP) vezivni domen od 67. do 73. aminokiseline (GXXGXGKT). Sekvenciranjem cDNK otvorenog okvira čitanja HsOrc4 utvrđeno je da ovaj protein ima 436 aminokiselina. Predviđena masa proteina je 45kDa [74].

Iako su determinisane subjedinice i evolutivna homologija kod različitih vrsta, njihova pojedinačna funkcija u okviru kompleksa nije u potpunosti razjašnjena. Funkcija subjedinice 4 je najpre definisana kod pivskog kvasca *S. pombe*. SpOrc4 je odgovorna za vezivanje kompleksa za DNK i direktno vezivanje preko AT kukica za AT bogati region *ori* sekvence kvasca [54]. Sličan mehanizam funkcija subjedinice 4 kod ostalih vrsta nije primećena. U našim prethodnim eksperimentima pokazano je da HsOrc4 prepoznaje i vezuje nekanonsku DNK [72]. Kao i kod *S. pombe*, vezivanje je nezavisno od ATP-a i pokazuje preferenciju za AT bogate regione.

Dalja istraživanja pokazuju da je za vezivanja HsOrc4 za DNK važna i struktura, a ne samo sekvenca DNK. Ranije je pokazano da Orc4 *S. pombe* preferencijalno vezuje superspiralizovanu DNK, u odnosu na linearizovanu formu [75], što upućuje da bi i subjedinica 4 ORC čoveka mogla da ima sličnu sposobnost. U ovim istraživanjima je pokazano da SpOrc4 uvodi topološke promene u plazmid i da su veće u odnosu na ceo SpORC. Pokazano je da SpOrc i SpOrc4 uvode topološke promene u plazmid tako što obavijaju DNK oko sebe. Analizom je utvrđeno da se oko 140 bp obavija oko SpOrc4 proteina i da je potrebno oko 300 bp između dva vezivna mesta ORC-a.

U našim prethodnim ispitivanjima je pokazano da *in vitro* protein HsOrc4 deluje na jednolančane strukture i da može da podstakne formiranje nekanonskih struktura kao što su TAT tripleksi ili specifične strukture sastavljene od homoadenina [76]. Ovakve strukture su formirane Hugstinovim vezama i pokazuju stabilnost na povišenim temperaturama. Ispitivanjem vezivnih sposobnosti HsOrc4 za *ori* sekvence Lamin B2 utvrdili smo da se preferencijalno vezuje za trolančane strukture, u odnosu na dvolančane forme DNK [77].

Zbog daleko veće koncentracije proteina u ćeliji u odnosu na mesta inicijacije replikacije, pretpostavlja se da postoje dve grupacije proteina HsOrc4, od kojih je samo jedna sposobna za aktiviranje replikona [74]. U skladu sa činjenicom da su proteini ORC-a esencijalni za funkcionisanje ćelije, skorija istraživanja ukazuju da je mutacija u genu za HsOrc4 uzročnici naslednog oboljenja kod ljudi, Majer-Gorlin sidrom. Ovaj redak sindrom karakteriše nizak rast, male ušne školjke i odsustvo patela. Ove fenotipske karakteristike se povezuju sa promenom tirozina u cistein na poziciji 174 proteina HsOrc4 koji se nalazi u blizini Voker B motiva, ali ova promena još nije funkcionalno ispitana [78, 79].

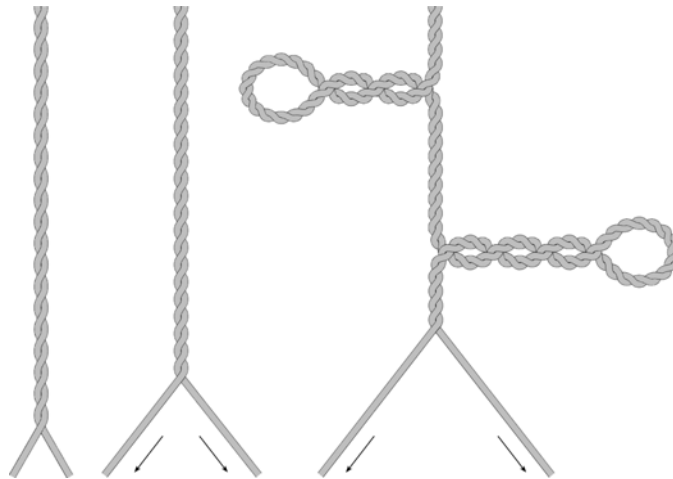
Naši eksperimenti pokazali su da osim pukog vezivanja za DNK, inicijacioni proteini mogu da proizvedu i značajne promene u strukturi DNK. Kada se ima u vidu da pod delovanjem odgovarajućih helikaza i topoizomeraza, DNK dramatično menja strukturu tokom replikacije, ali da i sami protein ORC, pripadajući grupi AAA+, čiji su članovi sposobni da na račun hidrolize ATP-a izvrše mehanički rad, ovo nije nimalo čudno. Budući da inicijatori deluju u okviru zatvorenih topoloških domena, očekuje se da pre svega imaju efekta na superspiralizaciju. Za sada je poznato da se inicijatori preferencijalno vezuju za superspiralizovanu DNK, kao što su ORC kompleksi *S. pombe* i *D. melanogaster* [58, 75]. Zbog mogućeg uticaja proteina koji ispituje na superspiralizaciju DNK, deo uvodnog materijala biće posvećen ovom fenomenu.

1.4 POJAM SUPERSPIRALIZACIJE

Prilikom izučavanja DNK i njene funkcije, razmatranje njene strukture često se uprošćava i ona se posmatra kao linearni dvolančani molekul. S tim u vezi, procesi replikacije, reparacije i transkripcije u kojima DNK učestvuje se pojednostavljaju i svode na funkciju niza nukleotida određenog redosleda. Međutim, DNK je veliki molekul i može da zauzme različite forme, a uglavnom je

smeštena i upakovana u nukleusu koji je veoma malih dimenzija. Zbog svega ovoga molekul DNK ima daleko kompleksniju topologiju [80].

S obzirom da je molekul DNK nesrazmerno dugačak u odnosu na svoju širinu, moguće su pojave lokalnih distorzija i blagih uvrtnja oko uzdužne ose molekula, koje za posledicu mogu imati uvrtnje celokupnog molekula oko samog sebe. Uvijanje spiralnog molekula oko samog sebe, naziva se superspiralizacija. Pojava i pojam superspiralizacije se najbolje opisuje „modelom kanapa“ (Slika 6) [80]. Rasplitanjem jednog kraja kanapa (koji oponaša napredovanje replikacione viljuške), dok je drugi kraj fiksiran (usled velike dužine DNK molekula), uvode se pozitivni navoji, što dovodi do uvrtnja strukture oko svoje ose i molekula oko samog sebe.



Slika 6. Pojam i pojava superspiralizacije („model kanapa“) [80]

Energija angažovana usled superspiralizacije se naziva torziona energija (torzioni napon) i teži oslobađanju što dovodi do pojave supernavoja [80]. Uslov za pojavu superspiralizacije jeste nemogućnost rotacije oko slobodnih krajeva, pa se superspiralizacija može pojaviti kod veoma dugih linearnih molekula kod kojih se lokalna distorzija strukture ne prenosi na ceo molekul, ili kod cirkularnih molekula koji nemaju slobodne krajeve oko kojih bi se oslobađala torziona energija.

Model sistem koji *in vitro* najbolje oponaša prirodu dugačkog linearnog molekula čiji krajevi nemaju mogućnost rotacije jeste plazmid. Plazmid je cirkularni, topološki-zaključan dvolančani molekul DNK koji odgovara zatvorenim topološkim domenima hromatinske DNK. Svaka promena strukture DNK molekula utiče na celokupnu topologiju plazmida i na njegov stepen superspiralizacije.

Kvantitativna mera stepena superspiralizacije jeste broj spona (eng. *linking number*, Lk). Lk je uvek ceo broj i može biti pozitivan (+) ili negativan (-). Lk broj je jedinstvena karakteristika svakog cirkularnog DNK molekula i zavisi od veličine molekula tj. broja nukleotida kao i od uslova u kojima se molekul nalazi.

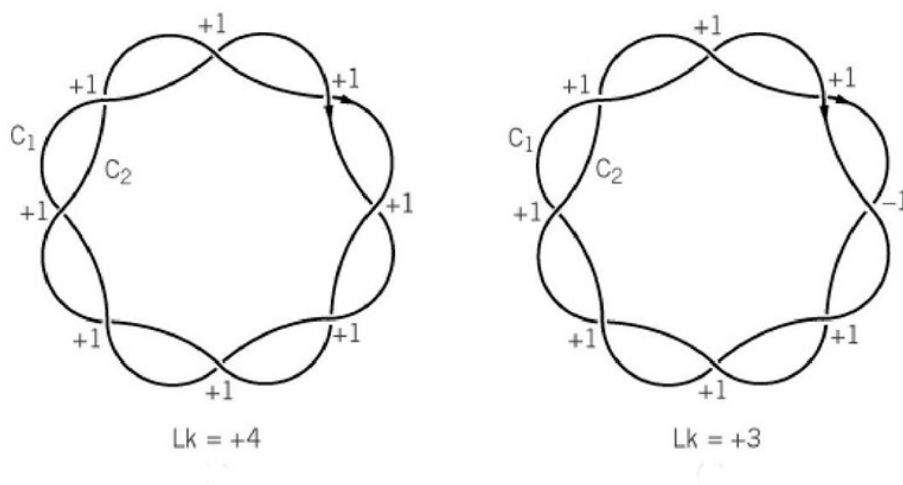
$$Lk=N/h$$

gde je N- ukupan broj baznih parova (bp) u DNK, a
h- broj baznih parova (bp) po navoju

Molekul sa određenim Lk brojem ima drugačiju strukturu u drugačijim uslovima sredine, odnosno drugačiji stepen superspiralizacije.

Za promenu Lk broja potrebno je raskidanje jednog ili oba lanca DNK, obrtanje oko ose molekula i ponovno spajanje lanaca. Ovaj proces u biološkim sistemima obavlja enzim topoizomeraza. Lk broj je topološka karakteristika cirkularnog DNK molekula i ne zavisi od geometrije DNK.

Plazmidi koji se razlikuju samo po Lk broju nazivaju se topoizomeri (Slika 7). Dakle, reč je o molekulima iste primarne strukture, ali se razlikuju po topologiji, odnosno stepenu superspiralizacije.



Slika 7. Topoizomeri i njihovi Lk brojevi [80]

Kao teoretska veličina uveden je standardni Lk broj (Lk_m) [80]. Ovaj broj jednak je Lk broju pri optimalnim uslovima sredine (0.2M NaCl, pH 7, 37°C) pri kojima je h jednako 10.5 bp/navoj, odnosno veličini jednog B navoja u molekulu bez torzionog stresa. Lk_m odgovara relaksiranoj formi plazmida. Relaksirani plazmid zauzima planarnu formu i teoretski se nalazi u ravni. Ipak, i relaksirana forma plazmida sadrži određen stepen spiralizacije i po standardu, Lk_m nosi pozitivan predznak (+). Svako odstupanje u Lk broju od standardnog Lk_m dovodi do pojave torzionog napona unutar plazmida koji može dovesti do formiranja topoizomera. Ukoliko se u plazmid uvode dodatni navoji, plazmid se prevodi u pozitivno supespiralizovane topoizomere (+), a ako se plazmid odvija, u negativne topoizomere (-).

S obzirom da Lk mora biti ceo broj, a samim tim i Lk_m , uvedena je pomoćna hipotetička veličina Lk^0 koja predstavlja Lk linearizovanog plazmida. Pretpostavka je da se pri zatvaranju linearizovane DNK, ipak dolazi do određenog stepena uvrtnja DNK, pa teoretski postoji razlika između Lk^0 i Lk_m . Ova razlika je merljiva i značajna samo kod plazmida dužina manjih od nekoliko hiljada bp.

Veličina koja opisuje stepen superspiralizacije koju jedan topoizomer ima u određenim uslovima sredine naziva se specifična razlika spona (eng. *specific linking difference*, δ). Ova veličina predstavljena je relativnim odnosom razlike brojeva Lk i Lk^o (ΔLk) u odnosu na Lk^o (koji je u direktnoj vezi sa brojem bp). Veličina δ je neimenovani broj i može biti decimalna.

$$\delta = (Lk - Lk^o) / Lk^o = \Delta L / Lk^o$$

Na stukturu i stepen superspiralizacije topoizomera mogu da utiču različiti sredinski faktori. Ovi faktori kao što su jonska jačina rastvora u kome se nalazi, pH vrednost, različiti DNK interkalatori, dovode do lokalnih distorzija strukture DNK koje mogu da dovedu do većih distorzija strukture i promene broja navoja unutar topološki zatvorene strukture plazmida. Glavni modifikatori topologije DNK u ćeliji jesu topoizomeraze. Osim njih na topologiju mogu da utiču i enzimi, kao što su RNK i DNK polimeraze. Značajni topološki modifikatori mogu biti i inicijacioni proteini, što je delimično predmet ovog rada.

2. CILJ

Cilj ovog rada jeste ispitivanje strukture koju tipična sisarska *ori* sekvenca zauzima u topološki zatvorenoj formi i ispitivanje mogućeg uticaja odabranog DNK- vezivnog proteina na strukturu i topologiju date sekvence. Zbog dobro definisanih strukturnih i funkcionalnih svojstava i postojanja serije mutanata karakterističnih za određene regione kao model sekvence odabrana je *ori* β DHFR, a promene u njenoj strukturi praćene su pod različitim uslovima sredine ili pod uticajem proteina HsOrc4. DNK vezivna svojstva ovog proteina predmet su višegodišnjih studija u našoj laboratoriji, a ovom prilikom želeli smo da ispitamo posledice njegove interakcije sa superspiralizovanom DNK. Nedostatak metodologije adekvatne za ovaj tip interakcija pokušali smo da prevaziđemo kombinovanjem različitih metoda i zajedničkom interpretacijom rezultata što će biti prikazano u poglavlju Rezultati i Diskusija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 METODE ZA PREČIŠĆAVANJE I ANALIZU DNK

3.1.1 Bakterijski sojevi korišćeni u radu

- 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 ispitivanih plazmida [81].
- 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 rekombinantnog proteina *HsOrc4* fuzionisanog sa *His* markerom [81].

3.1.2 Izolacija plazmida

Plazmidna DNK izolovana je iz bakterijske kulture kitom *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (*Qiagen*) po proceduri proizvođača. Plazmid je rastvaran u vodi (100ng/μl) i čuvan na -20°C u alikotima od 1μg. U eksperimentima su korišćeni samo sveže odmrznuti preparati plazmidne DNK.

3.1.3 Topološki esej

Za detekciju konformacionih promena DNK korišćena je Topoizomeraza I poreklom iz timusa govečeta (Topo I, *Fermentas*). Topoizomeraza I katalizuje relaksaciju pozitivno i negativno superspiralizovane DNK preko privremenog prekida fosfodiesterne veze u jednom od komplementarnih lanaca. Ovim esejem su praćene promene koje izaziva protein HsOrc4 u interakciji sa plazmidom [75, 82]. Prvo je vršeno vezivanje 400ng proteina HsOrc4 za 500ng plazmida pMCD u puferu za vezivanje proteina HsOrc4 (20 mM HEPES pH 7,9, 30 mM NaCl, 6 mM MgCl₂) u 15µl reakcione smeše. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37°C u smešu je dodavano 1,5µl BSA (2mg/ml, *Fermentas*), 9,5 µl pufera za Topo I (2x, *Fermentas*) i 0,5 µl Topo I (10U/µl). Reakcija relaksacije je vršena 30 minuta na 37°C. Uzorci su potom deproteinisani Proteinazom K i fenol/hloroformskom ekstrakcijom, precipitirani etanolom i rastvarani u vodi. Na ovaj način delovanjem topoizomeraze nastaju različiti topoizomeri koji se mogu razdvojiti i analizirati agaroznom elektroforezom.

3.1.4 Razdvajanje topoizomera

Razdvajanje topoizomera se vrši na agaroznom gelu na principu različite elektroforetske pokretljivosti.

Na osnovu strukture razlikujemo tri osnovne forme plazmida:

- linearizovana forma
- cirkularna forma sa prekidom u jednom od komplementarnih lanaca- „nikovana“ forma (eng. *nick*)
- zatvorena cirkularna forma ((+) ili (-) superspiralizovana i relaksirana forma)

U zavisnosti od forme, plazmidi pokazuju različitu elektroforetsku pokretljivost. Plazmidi sa većim stepenom superspiralizacije pokazuju veću pokretljivost, dok plazmidi u relaksiranoj formi, kao i „nikovani“ plazmidi migriraju na agaroznom gelu najsporije [80]. Linearne forme migriraju u zavisnosti od svoje dužine.

U prisustvu interkalatora menja se pokretljivost zatvorenih cirkularnih formi plazmida. Umetanjem u strukturu DNK, interkalatori dovode do blage distorzije žljebova koji za posledicu ima promenu topologije celokupnog plazmida. Interkalatori „uvode“ pozitivne navoje u lancu DNK, pa se forme plazmida menjaju iz (-) superspiralizovane ka relaksiranoj i (+) superspiralizovanoj i na taj način dolazi do „usporavanja“ na gelu. Linearizovana i „nikovana“ forma ne menjaju svoju pokretljivost u prisustvu interkalatora, jer imaju slobodne krajeve oko kojih se oslobađa torzioni napon uveden umetanjem interkalatora u strukturu DNK.

Topoizomeri se mogu razdvajati po stepenu i smeru superspiralizacije. Po stepenu superspiralizacije, topoizomeri se razdvajaju bez prisustva interkalatora. Da bi se topoizomeri razdvojili i po smeru superspiralizacije, elektroforeza se vrši naknadno u drugoj dimenziji u prisustvu interkalatora, upravno na smer prve elektroforeze.

Razdvajanje topoizomera u prvoj dimenziji-Uzorci su naneti na gel u puferu za nanošenje (0,25% ksilen cijanol, 0,25% bromfenol, 30% glicerol, 5xTBE). Topoizomeri su razdvajani u 0,8% agaroznom gelu bez etidijum-bromida u prisustvu ili odsustvu hlorokvina. Elektroforeza je tekla 17h na 3,2V/cm u puferu TBE. Po završenoj elektroforezi, gel je bojen u 0,1% rastvoru etidijum-bromida u puferu TBE. Gelovi sa hlorokvinom su pre bojenja ispirani u vodi 3 puta po 20 minuta uz blago mešanje.

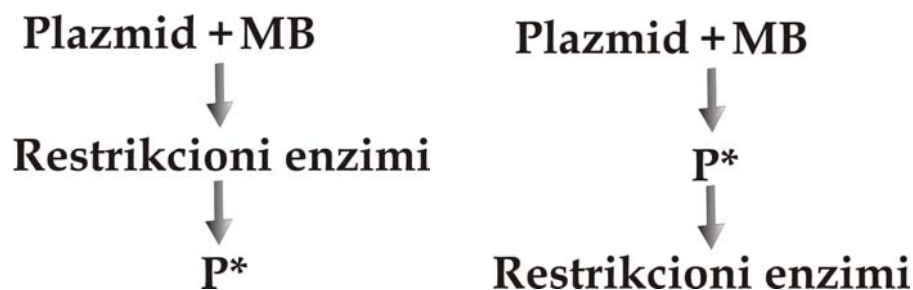
Razdvajanje topoizomera u drugoj dimenziji-Elektroforeza je vršena u 0,8% agaroznom gelu bez etidijum-bromida u puferu TBE. Prva dimenzija je tekla 17h na 3.2V/cm. Nakon elektroforeze, gel je inkubiran 30 minuta u 1xTBE puferu

sa hlorokvinom (1 μ g/ml). Elektroforeza u drugoj dimenziji je tekla 8h ortogonalno u odnosu na prvu u puferu sa 1 μ g/ml hlorokvina. Nakon elektroforeze, gel je ispiran u vodi 3 puta po 20 minuta uz blago mešanje i bojen u rastvoru etidijum-bromida 30 minuta. Prebojeni gelovi su ispirani u vodi preko noći. Uzorci na gelovima su vizualizovani CCD kamerom.

3.1.5 Nukleazni esej

Za detektovanje jednolančanih regiona u DNK korišćena je nukleaza MB (*Mung Bean, Pharmacia*). Nukleaza MB katalizuje specifičnu degradaciju jednolančanih regiona u jednolančanim i dvolančanim fragmentima nukleinskih kiselina pri čemu proizvodi mono i oligonukleotide koji imaju fosforilisan 5' kraj (specifikacija *Mung Bean Nuclease, Amersham Biosciences*). Po 240ng plazmida pMCD je inkubirano 60 minuta na 37°C sa 0.5 μ l nukleaze MB (45U/ μ l) u odgovarajućem puferu (pH 7,5) u zapremini od 20 μ l reakcione smeše. Nakon reakcije, vršena je deproteinizacija Proteinazom K (15 min na 37°C) i fenol/hloroformska ekstrakcija, a zatim i precipitacija. Nakon toga, uzorci su rastvarani u vodi.

Fragment od interesa je izolovan digestijom definisanim parom restrikcionih enzima, a produkti digestije su deproteinisani, defosforilisani, a zatim radioaktivno obeležavani (Slika 8, levo). U cilju detektovanja tačne pozicije mesta sečenja nukleaze MB, nakon već opisanog tretmana nukleazom, nastali 5' krajevi su defosforilisani i radioaktivno obeležavani, a potom sečeni jednim ili parom prethodno izabranih restrikcionih enzima (Slika 8, desno).



Slika 8. Sheme dva pristupa detektovanja mesta sečenja nukleaze MB

P*- defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

3.1.6 Esej smanjene elektroforetske pokretljivosti (EMSA)

Reakcija vezivanja proteina HsOrc4 za pMCD je ispitivana EMSA metodom. 2µl (100ng/µl) pMCD je inkubirano 30min. na 37°C sa rastućim količinama proteina HsOrc4 (20ng-640ng) u odgovarajućem puferu u finalnoj zapremini od 15µl. Za reakcije vezivanja pri pH 5 korišćen je 1xMBN pufer (*Pharmacia*), a za reakcije pri pH 7,5 pufer za vezivanje HsOrc4 (20 mM HEPES pH 7,9, 30 mM NaCl, 6 mM MgCl₂). Zapremina uzorka proteina HsOrc4 je u reakcijama nadomešćena 1x glicerolskim puferom za vezivanje proteina u kome je protein rastvoren prilikom preparacije (20 mM HEPES pH 7,9, 30 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10% glicerol). Elektroforeza je vršena u 0.8% agaroznom gelu 1xTAE puferu. Nakon reakcije vezivanja, a za potrebe deproteinizacije uzoraka, uzorak je inkubiran sa Proteinazom K u trajanju od 15 min, na 37°C. Nakon elektroforeze, gel je bojen u 0,1% rastvoru etidijum-bromida 30 minuta i nakon toga vizualizovan.

3.1.7 Elektroforeza DNK u denaturišućem poliakrilamidnom gelu

Produkti nukleaznog eseja analizirani su elektroforezom u denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Fragmenti su nakon denaturisanja 5min. na 95°C

inkubirani na ledu do nanošenja na gel. Uzorci su razdvajani u 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu u 1xTBE puferu. Elektroforeza je vršena pri konstantnoj voltaži 40 - 50 V/cm. Po završenoj elektroforezi gelovi su osušeni i autoradiografisani.

3.1.8 Obeležavanje 5' krajeva DNK radioaktivnim izotopom fosfora

DNK je obeležavana reakcijom fosforilacije u prisustvu [γ - ^{32}P]ATP i T4 polinukleotid kinaze. Uzorci posle nukleaznog eseja su pre radioaktivnog obeležavanja defosforilisani fosfatazom CIAP po uputstvu proizvođača (*BioLabs*). DNK je prečišćena *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) po uputstvu proizvođača. 300ng DNK je obeležavano fosforilacijom T4 polinukleotid kinazom sa 2 μl γ ATPom (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) po uputstvu proizvođača (*Fermentas*). Reakcija fosforilacije se odvijala 45 min na 37°C, a zaustavljena 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*). Količina radioaktivnog izotopa inkorporiranog u fragment DNK merena je u scintilacionom brojaču za tečne uzorke. Na gel je nanošeno od 2000cpm do 4000cpm prethodno denaturisanog uzorka. Elektroforeza je vršena na 6% denaturišućem akrilamidnom gelu i nakon sušenja, gel je autoradiografski eksponiran.

Obeležavanje DNK lestvice od 10 bp vršeno je u reakcionoj smeši (25 μL) 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, osušen pod vakuumom i rastvoren u sterilnoj dH₂O. Ovako obeležena lestvica je korišćena na denaturišućim poliakrilamidnim gelovima kao standard dužine fragmenata DNK.

3.2 METODE ZA EKSPRESIJU, PREČIŠĆAVANJE I ANALIZU PROTEINA

3.2.1 Ekspresija proteina HsOrc4

Kloniranje gena za protein HsOrc4, kao i uslovi za indukciju ekspresije, lizu ćelija, kao i vezivanje i eluciju rekombinantnog HsOrc4 proteina prethodno su standardizovani u našoj laboratoriji [76].

Ekspresija proteina obezbeđena je transkripcionim sistemom pod kontrolom T5 promotora sa vektora pQE-30. 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 HsOrc4 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.

3.2.2 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 puferu (40 mM Tris-HCl pH 7,5; 6 mM MgCl₂). 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.

3.2.3 Glicerolski gradijenti

Dodatno prečišćavanje preparata proteina kroz glicerolski gradijent vršeno je da bi se uklonili insolubilni agregati proteina [76]. Centrifugiranje je izvođeno u 10% do 30% glicerolskim gradijentima pripremljenim u odgovarajućem puferu (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl₂; 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). Nakon merenja koncentracije, frakcije koje su sadržale maksimalnu količinu proteina su sakupljane i razdeljene u alikvote koji su do upotrebe čuvani na -80°C.

3.2.4 Elektroforeza proteina u gelu od SDS-poliakrilamida (SDS PAGE)

U cilju detekcije kvaliteta izolovanog rekombinantnog proteina HsOrc4, uzorci proteina su razdvajani elektroforezom u 12% SDS poliakrilamidnim gelovima. Gel za razdvajanje se sastoji od gela za koncentrovanje (12% poliakrilamid, 375 mM Tris, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijumpersulat i 0,01% TEMED) i gela za razdvajanje (6% poliakrilamid, 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% amonijumepersulfat i 0,01% TEMED). 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 -merkaptotanol; 0,02% boja bromfenol plavo), a pred nanošenje na gel proteini su denaturisani 5 min na 95°C. Uzorci su vizualizovani bojenjem Komasi plavim po uputstvu proizvođača (*Coomassie Brilliant blue G-250, Sigma Aldrich Chimie GmbH, Germany*).

3.2.5 Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina prečišćenih glicerolskih gradijenata je vršena metodom Bradforda uz upotrebu komercijalnog rastvora po uputstvu proizvođača (*Bradford Reagent, ready to use, Fermentas, #R1271*).

3.3 PUFERI KORISĆENI U RADU

Lauri Broth [73]

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 ekvilibraciju 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

6 mM MgCl₂

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 -merkaptoetanol

0,02% boja bromfenol plavo

Pufer za vezivanje

20 mM HEPES pH 7,9

30 mM NaCl

6 mM MgCl₂

10% glicerol

TAE pufer

40 mM Tris acetat

2 mM EDTA pH 8

Pufer za nanošenje uzoraka za agaroznu elektroforezu

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

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 denaturišući gel

95% dejonizovan formamid

0,37% Na₂EDTA pH 7,0

0,3% boja ksilen cijanol

0,3% boja bromfenol

4. REZULTATI

U našim prethodnim eksperimentima ispitivali smo strukturu različitih fragmenata izolovanih iz *ori* sekvenci, vezivanje proteina za odabrane fragmente i uticaj proteina HsOrc4 na strukturu DNK. U ovom radu nastavljeni su eksperimenti sličnog tipa, ali su ispitivane *ori* sekvence bile u okviru cirkularnih plazmida, tj. u superspiralizovanoj formi, što je veoma nalik na situaciju *in vivo* i na strukturu koju *ori* sekvence zauzimaju u zatvorenim topološkim domenima hromozoma. Treba napomenuti da je dostupna metodologija za analizu struktura u relativno velikim regionima superspiralizovane DNK, a posebno za analizu protein - DNK interakcija i strukturnih posledica delovanja proteina u takvim regionima, prilično oskudna, pa smo se trudili da modifikujući postojeće metode i primenjujući ih u različitim kombinacijama, dobijemo podatke o izabranoj *ori* sekvenci. Za analizu smo odabrali DHFR *ori* β zato što je u prethodnim radovima drugih autora [6, 14, 29] utvrđeno koji regioni ove *ori* sekvence imaju značaja za inicijaciju replikacije *in vivo*.

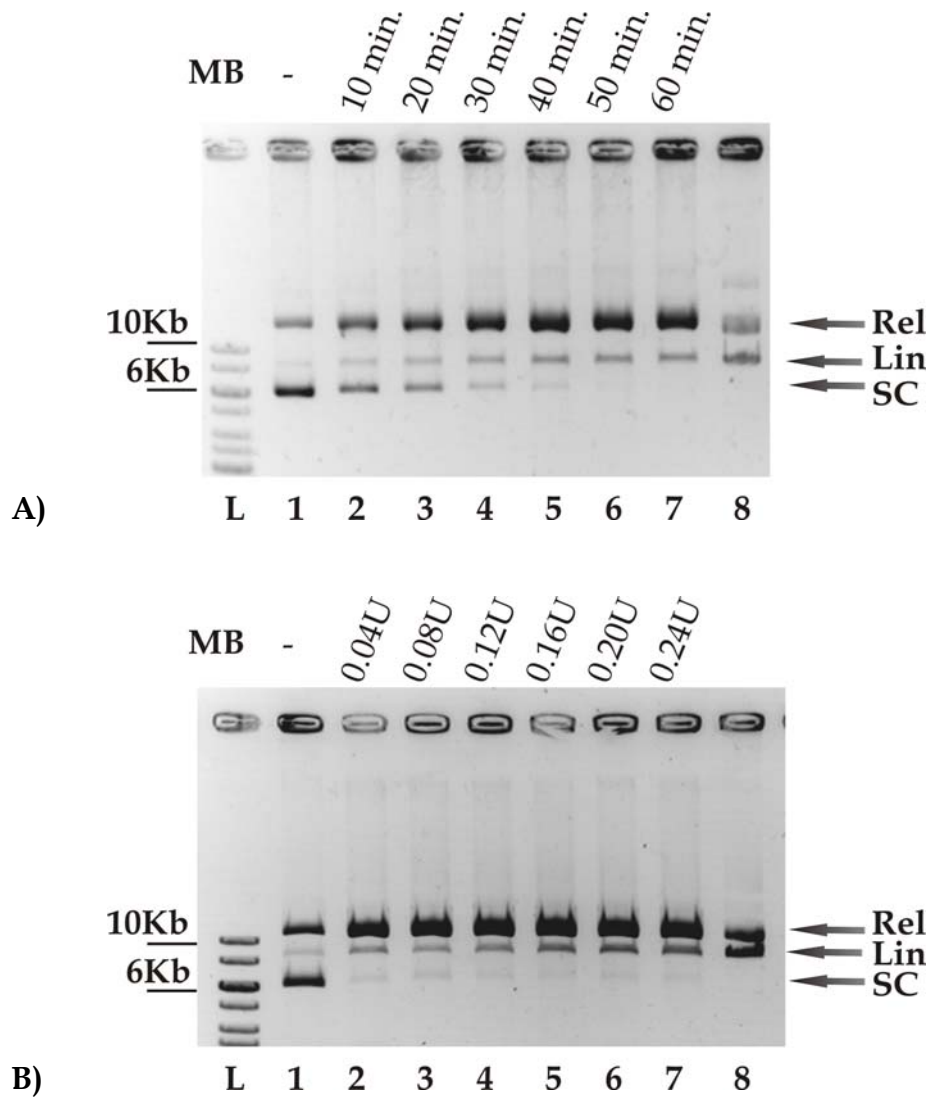
Rezultati ovog rada su predstavljeni u okviru dve celine. U prvom delu, predstavljeni su rezultati analize strukture *ori* β sekvence DHFR u topološki zatvorenoj formi, odnosno struktura funkcionalno značajnih domena u okviru *ori* β sekvence. U drugom delu predstavljeni su rezultati izučavanja strukturnih promena *ori* β sekvence DHFR u topološki zatvorenoj formi nakon interakcije sa proteinom HsOrc4.

Funkcionalno značajni regioni *ori* β sekvence DHFR (AT bogati region, RIP60, BEND i DNR) mogu zauzimati alternativne strukture, pa su odabrani za analizu u ovom radu. Za analizu strukture, korišćene su kako nemutirane tako i mutirane forme odabranih regiona.

4.1 STRUKTURA FUNKCIONALNIH REGIONA *ORI* B SEKVENCE DHFR U TOPOLOŠKI ZATVORENOJ FORMI

Za ispitivanje odabrane *ori* sekvence izabran je plazmid pMCD koji je formiran kloniranjem *ori* β sekvence u plazmid pUC19. Plazmid pMCD veličine 8,4 kb sadrži 5,8 kb dugačak region DHFR *ori* β koji je dovoljan za inicijaciju replikacije DNK na ektopičnoj lokaciji (opisano u Uvodu). U prethodnim istraživanjima detektovano je prisustvo neortodoksne strukture u fragmentima izolovanim iz AT bogatog regiona *ori* sekvence [6]. U okviru plazmida ova sekvenca se nalazi pod topološkim stresom. Da bismo ispitali efekat superspiralizacije na strukturu AT bogatog regiona, kao i drugih funkcionalno značajnih elemenata *ori* sekvence, koristili smo nukleazni esej (opisano u Materijal i metode).

Ovaj esej baziran je na nukleazi izolovanoj iz biljke *Vigna radiata* (U daljem tekstu enzim će biti označen kao nukleaza MB što potiče od engleskog naziva *Mung Bean Nuclease*). Nukleaza MB je enzim koji specifično prepoznaje jednolančanu formu DNK i, na odgovarajućem pH (6,6 do 7), pri fiziološkim koncentracijama enzima, pravi jedan presek u jednom lancu DNK, što rezultira relaksacijom cirkularnog molekula (Slika 9). Usled disanja molekula, svaki cirkularni plazmid može biti supstrat za nukleazu MB, pri čemu se u eksperimentu može pratiti relaksacija plazmida, ali se ne mogu utvrditi mesta sečenja, jer su ona u svakom molekulu nasumična.



Slika 9. Aktivnost nukleaze MB. Uzorak netretiran nukleazom MB (1), kontrolni uzorak koji sadrži relaksiranu i linearizovanu formu plazmida (8) i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83], linearizovana (Lin) i superspiralizovana (SC).

A) kinetika aktivnosti nukleaze MB (2-7, vreme inkubacije prikazano na slici)

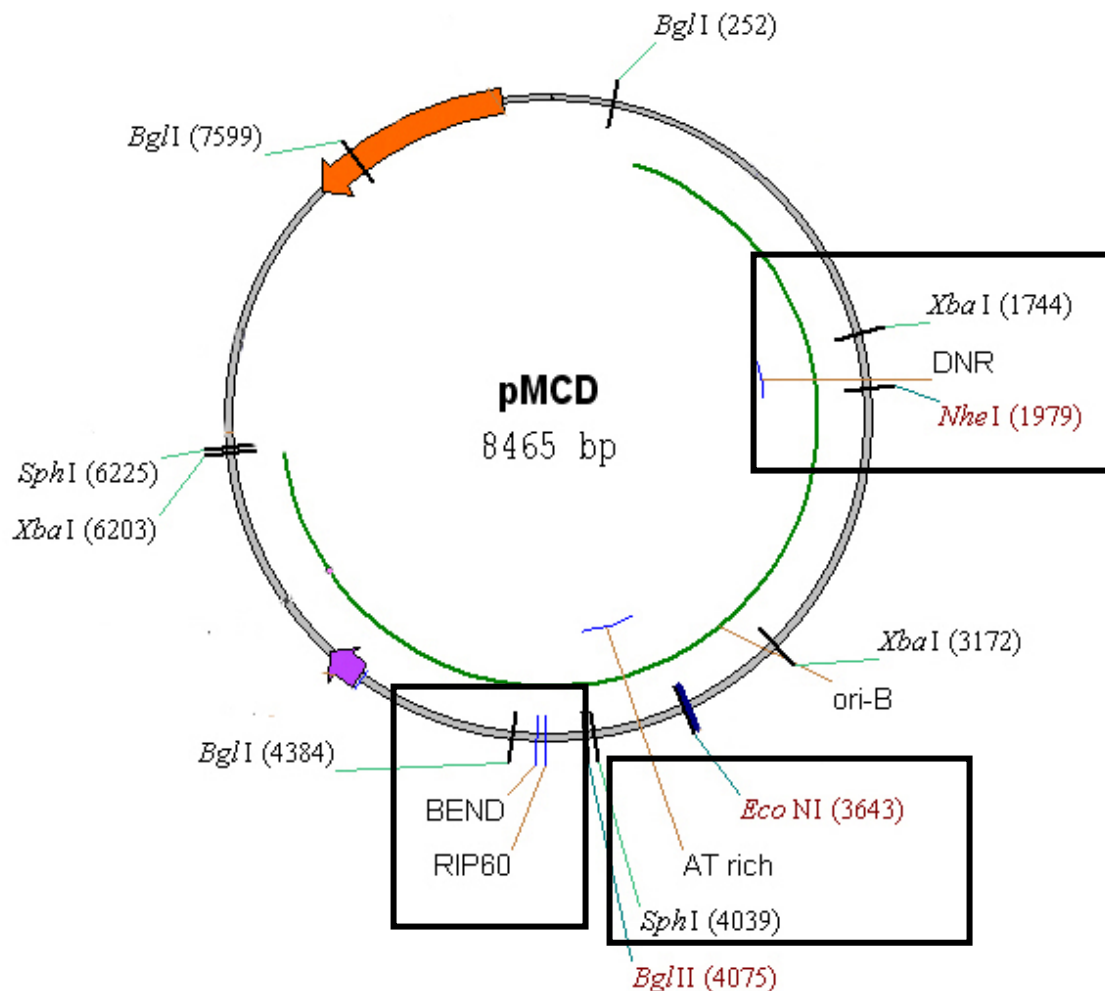
B) rastuće koncentracije nukleaze MB (2-7, količina nukleaze MB prikazana na slici)

Ukoliko neki plazmid u sebi poseduje stabilnu neortodoksnu strukturu, poseduje i deo DNK koji je uvek u jednolančanoj formi što ga čini preferencijalnim supstratom za nukleazu MB, koja će u svakom molekulu delovati na stabilno jednolančanu DNK. Restrikcijom mapiranjem radioaktivno obeleženih fragmenata i identifikovanjem onih na koje je delovala nukleaza MB, mogu se otkriti i mapirati stabilne neortodokсне strukture prisutne u nekom regionu superspiralizovane DNK. Za analizu različitih regiona *ori* β sekvence DHFR odabrali smo odgovarajuće parove restrikcijonih enzima kojima su, nakon delovanja nukleaze MB, isecani fragmenti od interesa. Uzorci su potom radioaktivno obeležavani.

Da bismo ispitali na kom mestu i u kom od komplementarnih lanaca deluje nukleaza MB, uzorci su radioaktivno obeležavani pre tretiranja restrikcijonim enzimima. Na ovaj način obeležena su samo mesta sečenja nukleazom MB. Pozicija mesta sečenja nukleaze MB je utvrđivana naknadno, sečenjem jednim RE iz odabranog para, a potom i drugim, da bi se izdvojio fragment od interesa. Posle svake restrikcijone digestije, uzorci su analizirani na denaturišućoj PAGE u kojoj je, na osnovu dužine nastalih traka utvrđivana lokacija u okviru restrikcijonog fragmenta i udaljenost mesta sečenja nukleaze MB od restrikcijonih mesta.

Na ovaj način, analizirali smo četiri regiona koji su u literaturi okarakterisani kao bitni za funkciju *ori* replikator DHFR: AT bogati region, DNR, BEND i RIP60. U eksperimentima su korišćeni i plazmidi kod kojih su zamenjeni određeni funkcionalni regioni. pATrep i pLamRep su plazmidi kod kojih su zamenjeni AT regioni, a kod pBENDx i pRIP60 DSx, BEND, odnosno RIP60 region, dok je kod plazmida pDNRsPCR zamenjen region DNR.

Detaljan postupak rada opisan je u poglavlju Materijal i metode, a pregled plazmida i restrikcionih enzima, kao i veličina fragmenta koji se dobija digestijom prikazan je u Tabeli 1.



Slika 10. Restrikciona mapa pMCD i pozicija funkcionalno značajnih regiona sekvence *ori β* DHFR (obeležena su mesta sečenja restrikcijom enzimima *Bgl* I, *Bgl* II, *Eco*NI, *Nhe* I, *Sph* I) (generisano programom *Vector NTI*)

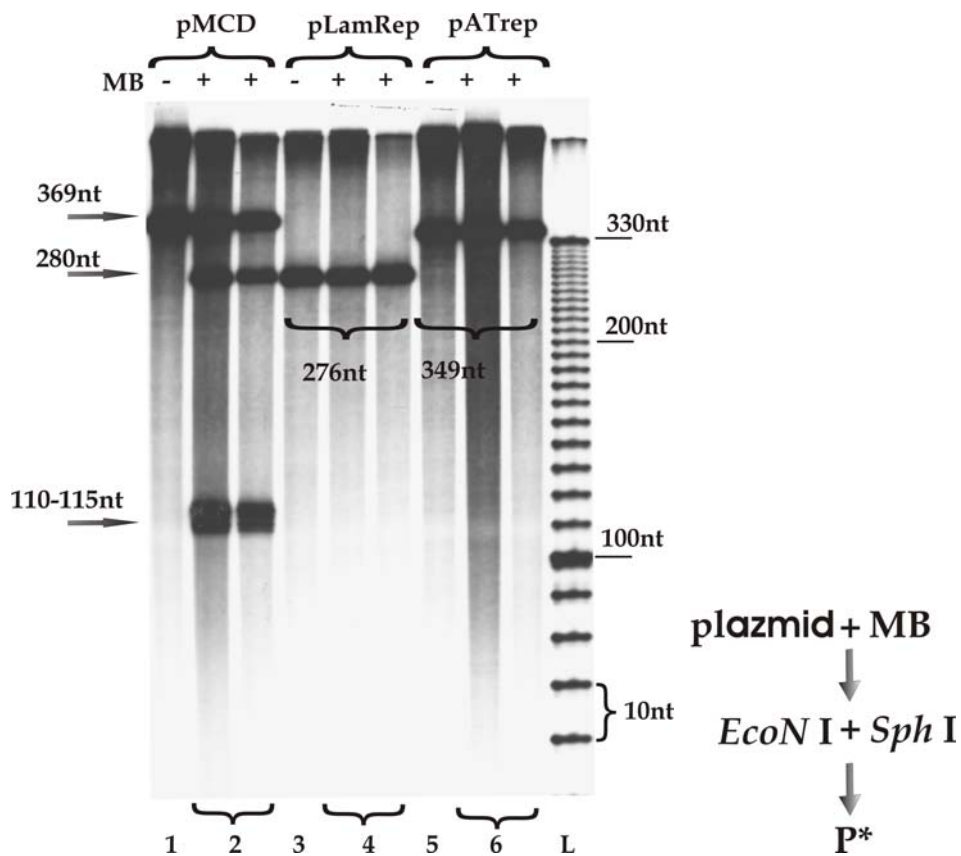
Tabela 1. Restrikcioni enzimi, mesta sečenja i veličine fragmenata u ispitivnim plazmidima

Naziv plazmida	Naziv regiona	Restrikcioni enzim	Broj i pozicija restikcionih mesta u plazmidu	Veličina fragmenata
pMCD,	AT bogati region	EcoN I	1 (3643)	396 bp (3643-4039)
		<i>Sph</i> I	2 (4039,6225)	
pATrep	AT rep	EcoN I	1 (3643)	349 bp (3643-3992)
		<i>Sph</i> I	2 (3992,6178)	
pLam Rep	LamAT	EcoN I	1 (3643)	276 bp (3643-3919)
		<i>Sph</i> I	2 (3919,6105)	
pMCD	DNR region	<i>Xba</i> I	3 (6203, 1744, 3172)	235 bp (1744-1979)
		<i>Nhe</i> I	1 (1979)	
pMCD - DNRspcr	DNRspcr	<i>Sma</i> I	1 (1746)	
pMCD, pBENDx, pRIP DSx	BEND/RIP 60	<i>Bgl</i> I	3 (4384, 7599, 252)	309 bp (4075-4384)
		<i>Bgl</i> II	1 (4075)	
pMCD	Region nizvodno od DN Ra	<i>Dra</i> III	1 (2290, 5139)	311 (1979-2290)
		<i>Nhe</i> I	1 (1979)	

4.1.1 AT bogati region

AT bogati region je karakterističan za svaki replikator. Odlikuje ga sekvenca sastavljena od adeninsko-timinskih nukleotidnih parova, podložna lakom topljenju. Pošto otvoreni regioni predstavljaju moguća mesta inicijacije replikacije, prvo je ispitivana strukturu AT bogatog regiona.

AT bogati region je analiziran sečenjem restrikcionim enzimima *EcoN I* i *Sph I*, a 5' krajevi restrikcionih fragmenata obeleženi su radioaktivnim fosforom. Nakon sečenja pomenutim enzimima, region od interesa obuhvaćen je restrikcionim fragmentom dužine 396 bp (Slika 11, kolona 1). Nakon elektroforeze i radiografije ovaj fragment nalazi se na vrhu gela, dok fragmenti veći od njega ostaju u ležištu. Ukoliko se plazmid pre sečenja restrikcionim enzimima tretira nukleazom MB, u AT traktu se osim fragmenta od 369 nt detektuje još najmanje 5 dodatnih traka, najmanje četiri trake dužine 115-120 nt i jedna ili više traka od oko 280 nt (Slika 11, kolona 2). Da bismo utvrdili da li je detektovana struktura karakteristična samo za AT bogati region istom metodom analizirani su i plazmidi koji su nosili mutirani AT bogati region (Tabela 2). Jedan od ovih mutanata, pATrep, imao je isti bazni sastav kao i originalni plazmid.



Slika 11. Struktura AT bogatog regiona *ori* β DHFR sekvence. Nekanonska struktura je specifična za AT bogati region *ori* β DHFR sekvence, a ne i za sekvence mutiranih regiona (ATrep, LamRep). Uzorci tretirani (pMCD (2), pLamRep (4), pATrep (6)) i netretirani nukleazom MB (pMCD (1), pLamRep (3), pATrep (5)), naknadno su sečeni restrikcionim enzimima *EcoNI* i *SphI*, a zatim obeleženi radioaktivnim fosforom. L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmetni na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

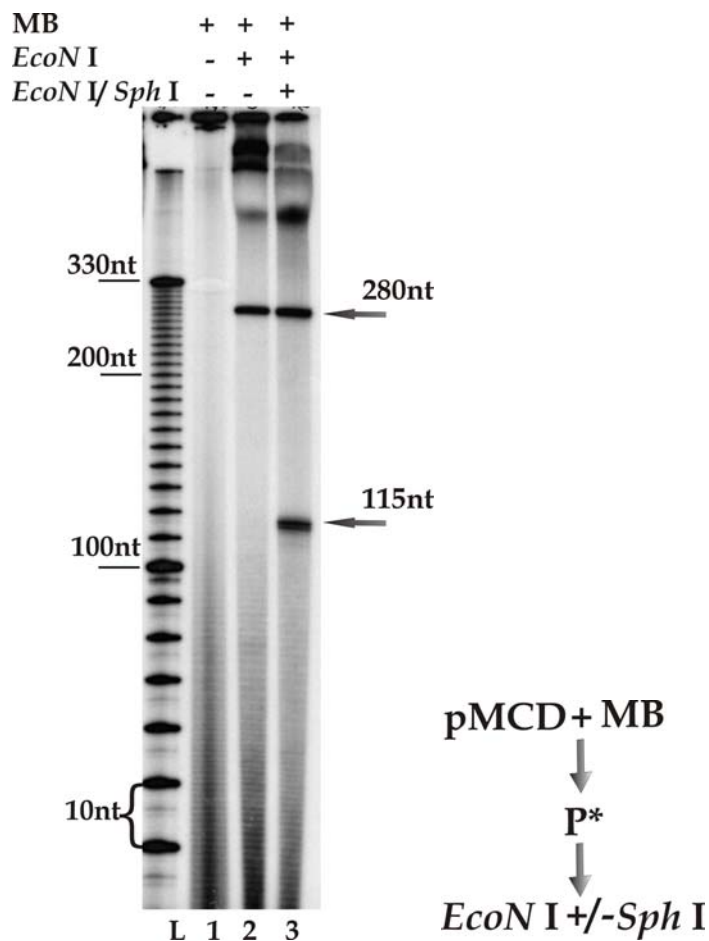
Tabela 2. Plazmidi mutanti za AT bogati region

Mutant	Pozicija prvog nukleotida	Tip zamene
pATrep	2163	AT region <i>SphI</i> -EcoRV od 344 bp zamenjen sa AT regionom 297 bp <i>SphI</i> -PvuII iz pSV2neo
pLamRep	2163	AT region od 344 bp izbačen <i>SphI</i> -EcoRV zamenjen sa AT regionom 224 bp <i>SphI</i> -PvuII iz lamin B2 <i>ori</i> sekvence

Kao što je prikazano na Slici 11 (kolone 3 i 5) digestija prethodno opisanim parom enzima dala je fragmente koji se po dužini malo razlikuju od fragmenta originalnog plazmida i odgovaraju očekivanim dužinama za odgovarajuće plazmide. Tretman nukleazom MB pokazao je da struktura detektovana u originalnom plazmidu ne postoji u mutantima (Slika 11, kolone 4 i 6) kod kojih su detektovane samo trake koje odgovaraju dužini celog fragmenta izbačenog restrikcionim enzimima. Ovaj eksperiment je potvrdio da je detektovana struktura specifična za AT bogati region i nestaje njegovim uklanjanjem iz plazmida.

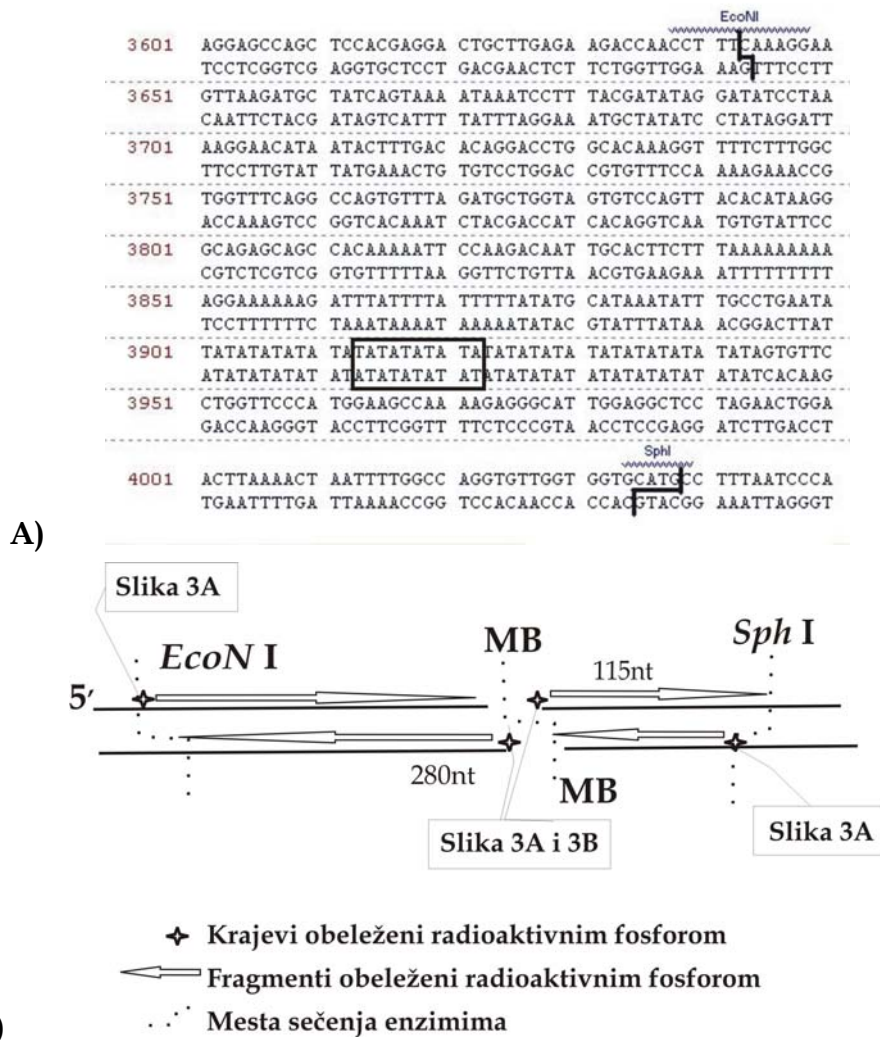
Da bi se precizno pozicioniralo mesto koje prepoznaje nukleaza MB, prvo su radioaktivno obeleženi 5' krajevi nastali po delovanju nukleaze MB, a nakon toga plazmid je sečen odabranim restrikcionim enzimima. Kada su obeležena samo mesta delovanja nukleaze MB, naknadnim tretmanom plazmida enzimom *EcoN* I dobijena je traka od 280 nt (Slika 12, kolona 2). Naknadnim sečenjem enzimom *Sph* I detektovane su bar još 2 trake dužine oko 115 nt (Slika 12, kolona 1). U uzorku bez restrikcionih enzima nisu detektovane zasebne trake, što je u skladu sa činjenicom da MB nukleaza ne pravi više od jednog preseka po molekulu plazmida (Slika 12, kolona 3). Dobijeni rezultati ukazuju da se struktura osetljiva na

nukleazu MB nalazi između dva restrikciona mesta, 280 nt od restrikcionog mesta *EcoN I* i 115 nt od restrikcionog mesta *Sph I* (Slika 13B).



Slika 12. Struktura AT bogatog regiona *ori* β DHFR sekvence. Restrikciono mapiranje pozicije sečenja nukleaze MB unutar AT bogatog regiona *ori* β sekvence. Nakon tretmana nukleazom MB, uzorci su radioaktivno obeleženi i sečeni restrikcionim enzimom *EcoN I* (2) ili parom enzima *EcoN I* i *Sph I* (3). Kontrolni uzorak (1) je tretiran nukleazom MB i naknadno radioaktivno obeležen. L-standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmenti na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment.

Obrazac traka prikazanih na Slikama 11 i 12 sugeriše postojanje više bliskih mesta sečenja nukleazom MB, u regionu prikazanom na Slici 13B. Mesta senzitivna na MB počinju na udaljenosti od 280 nt od mesta za *EcoN I* i nalaze se u oba lanca DNK, oko mesta 3923 unutar plazmida pMCD.



Slika 13. Mesta osetljiva za nukleazu MB u okviru AT bogatog regiona DHFR *ori* β

A) Sekvenca fragmenta AT bogatog regiona (obeležena mesta sečenja restrikcionim enzimima *Sph I* i *EcoN I* i mesto jednolančanog regiona koji prepoznaje nukleaza MB) (generisano programom *Vector NTI*)

B) Shematski prikaz pozicije obeležavanja mesta sečenja nukleaze MB (prikazane udaljenosti od restikcionih mesta *Eco*N I i *Sph* I)

Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju da, kada se *ori* β sekvenca nalazi u superspiralizovanoj formi, AT bogati region zauzima nekanonsku strukturu DNK. O kakvoj strukturi je reč ne možemo utvrditi ovom metodom, ali je izvesno da identifikovana struktura poseduje delimično nesparenu DNK.

4.1.2 Region BEND/RIP60

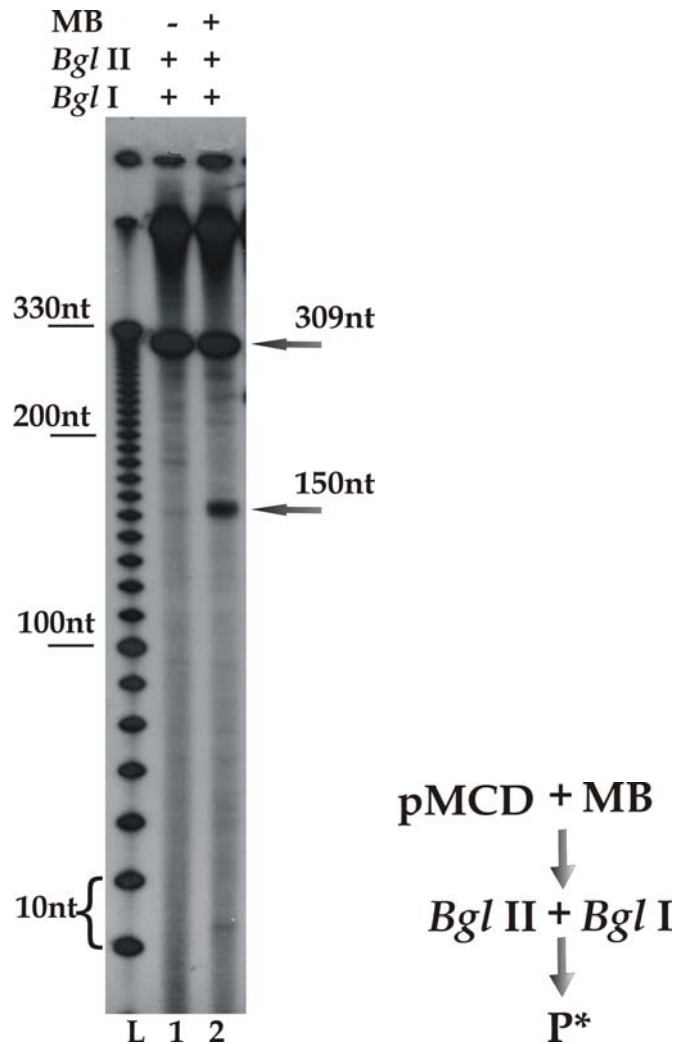
Drugi region za koji je pokazano da ima značaja za inicijaciju replikacije u živim ćelijama jeste RIP60. Ovaj region je mesto vezivanja proteina RIP60 koji ima strukturu sastavljenu od cinkanih prstića. Neposredno uz ovaj region nalazi se i region BEND koji zauzima specifičnu strukturu. Kada se u ovom regionu AT parovi zamene GC parovima, struktura se narušava.

Zbog male međusobne udaljenosti od 28 bp, regioni BEND i RIP60 su analizirani u okviru istog restikcionog fragmenta *Bgl* II - *Bgl* I dužine 309 bp (Slika 14).



Slika 14. Restrikciona mapa plazmida pMCD za analizu BEND / RIP60 region (obeležena mesta sečenja restrikcijom enzimima *Bgl* I i *Bgl* II i BEND i RIP60 regioni) (generisano programom *Vector NTI*)

U uzorku tretiranom nukleazom MB, naknadnim sečenjem parom restrikcijom enzima *Bgl* I i *Bgl* II i radioaktivnim obeležavanjem, pored trake od 309 nt, dobijaju se dve dodatne trake od oko 150 nt (Slika 15, kolona 2). Ispitivanjem plazmida sa mutiranim BEND (pBENDx) ili mutiranim RIP60 (pRIP DSx) (Tabela 3), dobijen je identičan obrazac sečenja nukleazom MB kao i u originalnom plazmidu (nije prikazano), što je sugerisalo da mesto sečenja nije karakteristično za strukturu unutar ispitivanog regiona.



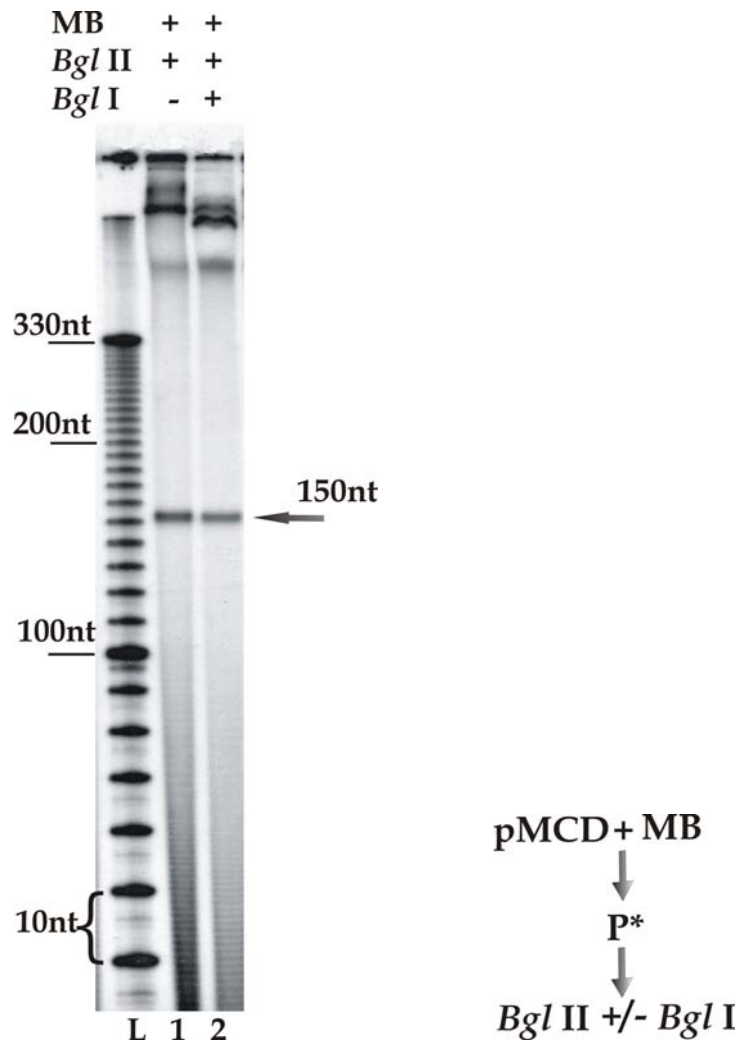
Slika 15. Struktura BEND/RIP60 regiona *ori* β DHFR sekvence (obeležavanje nakon restikcione digestije). Analizom strukture BEND/RIP60 regiona restrikcionim parom enzima detektuje se jednolačani region. Uzorak tretiran (2) i netretiran nukleazom MB (1) naknadno su sečeni restrikcionim enzimima *Bgl* I i *Bgl* II, a zatim obeleženi radioaktivnim fosforom. L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmenti na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

Tabela 3. Mutanti za BEND i RIP60 region

Plazmid mutant	Pozicija prvog nukleotida	Tip zamene	zamena
pBENDx	1895	PCR mutagenezom zamenjeno pet AT traktova sa GC	20
pRIP DSx	1943	Sekvenca TATTATTATTATA zamenjena sekvencom TTATCGATCTCGAGG	9

Da bismo utvrdili tačnu poziciju mesta sečenja nukleazom MB, enzimsku digestiju izveli smo postupno.

Kada su obeležena samo mesta delovanja nukleaze MB, naknadnim sečenjem enzimom *Bgl* II dobijaju se dve trake dužine oko 150 nt. Dodatnim sečenjem uzorka enzimom *Bgl* I ne dobijaju se dodatne trake (Slika 16), što ukazuje da se mesto sečenja nukleaze MB može nalaziti oko 150 nt u gornjem lancu 5' od *Bgl* II mesta ili u donjem lancu 5' od *Bgl* II mesta (Slika 17B).



Slika 16. Struktura BEND/RIP60 regiona ori β DHFR sekvence (obeležavanje nakon tretiranja nukleazom MB). Restrikcijom mapiranjem utvrđeno je da jednolančani region ne potiče iz BEND/RIP60 regiona, već izvan njega. Nakon tretmana nukleazom MB, uzorci su radioaktivno obeleženi i sečeni restrikcijom enzimom *Bgl* II (1) ili parom enzima *Bgl* I i *Bgl* II (2). L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmetni na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

Detaljna analiza produkata delovanja restrikcionih enzima i nukleaze MB, ukazuje da trake od oko 150 nt, koje se pojavljuju kao rezultat analize BEND/RIP60 regiona, ne potiču iz ovog regiona. Naime, *Bgl* II restrikciono mesto nalazi se oko 150 bp udaljeno od mesta sečenja nukleaze MB u AT bogatom regionu i 40 bp od *Sph* I restrikcionog mesta (Slika 17). Ukoliko bi u donjem lancu fragmenta *Bgl* II-*Bgl* I postojalo mesto sečenja za nukleazu MB na 150 nt od mesta *Bgl* II, ono bi takođe moralo biti detektovano digestijom enzimom *Sph* I kao traka od oko 180 nt, što nije slučaj (Slika 15).

Na osnovu prikazanih rezultata analize fragmenta *Bgl* II-*Bgl* I, može se zaključiti da region BEND/RIP60 u okviru plazmida pMCD pod uslovima eksperimenta (opisano u Materijal i metode) ne sadrži jednolančane regione, odnosno da se nalazi u strukturi neosetljivoj na nukleazu MB.

```

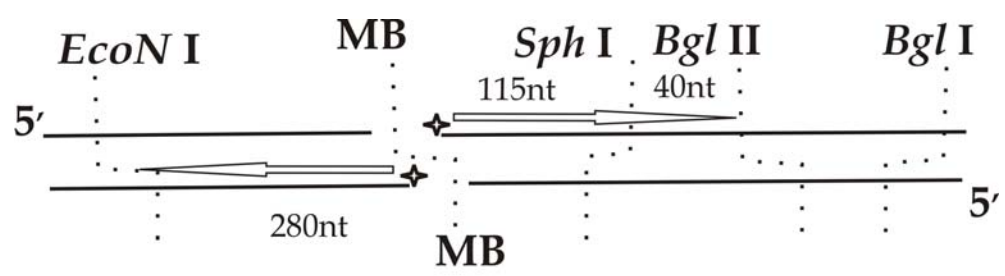
EcoNI
3601 AGGAGCCAGC TCCACGAGGA CTGCTTGAGA AGACCAACCT TTTAAAAGGAA
TCCTCGGTCTG AGGTGCTCCT GACGAACTCT TCTGGTTGGA AAGTTTCCTT
3651 GTTAAGATGC TATCAGTAAA ATAAATCCTT TACGATATAG GATATCCTAA
CAATTCTACG ATAGTCATTT TATTTAGGAA ATGCTATATC CTATAGGATT
3701 AAGGAACATA ATACTTTGAC ACAGGACCTG GCACAAAGGT TTTCTTTGGC
TTCCTTGAT TATGAAACTG TGTCTGGAC CGTGTTCCTCA AAAGAAAACCG
3751 TGGTTTCAGG CCAGTGTTTA GATGCTGGTA GTGTCCAGTT ACACATAAGG
ACCAAAGTCC GGTCCAAAAT CTACGACCAT CACAGGTCAA TGTGTATTCC
3801 GCAGAGCAGC CACAAAATT CCAAGACAAT TGCACCTCTT TAAAAAATAA
CGTCTCGTCTG GTGTTTTTAA GGTCTGTGTA ACGTGAAGAA ATTTTTTTTT
3851 AGGAAAAAAG ATTTATTTTA TTTTATATG CATAAATATT TGCCTGAATA
TCCTTTTTTC TAAATAAAAAT AAAAAATATC GTATTTATAA ACGGACTTAT
3901 TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATAGTGTTC
ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATCACAAAG
3951 CTGGTTCCCA TGGAAAGCCAA AAGAGGGCAT TGGAGGCTCC TAGAACTGGA
GACCAAGGGT ACCTTCGGTT TTCTCCCGTA ACCTCCGAGG ATCTTGACCT

SphI
4001 ACTTAAACT AATTTGGCC AGGTGTGGT GGTGCATGCC TTTAATCCCA
TGAATTTTGA TTTAAACCGG TCCACAACCA CCACGTACGG AAATTAGGGT

BglII
4051 GGACTCGGGA GGCAAAGGCA GGCAGATCTC TGTAGTTCG AGGCCAGCCT
CCTGAGCCCT CCGTTTCCGT CCGTCTAGAG ACACTCAAGC TCCGTCGGA
4101 GGTCTCCAGA GCGAGTGCCA GGATAGGCTC CAAAGCTACA CAGAGAAACC
CCAGAGGTCT CGTCACGGT CCTATCCGAG GTTTCGATGT GTCTCTTTGG

```

A)



- ✦ Krajevi obeleženi radioaktivnim fosforom
- ⇐ Fragmenti obeleženi radioaktivnim fosforom
- ⋮ Mesta sečenja enzimima

B)

Slika 17. Pozicija AT bogatog regiona u odnosu na *Bgl* II restrikciono mesto u plazmidu pMCD

- A) Sekvence fragmenta AT bogatog regiona i *Bgl* II restrikcionog mesta (generisano programom *Vector NTI*)
- B) Shematski prikaz pozicije obeležavanja mesta sečenja nukleazom MB (prikazana udaljenost u odnosu na restrikciona mesta *Eco*N I, *Sph* I i *Bgl* II)

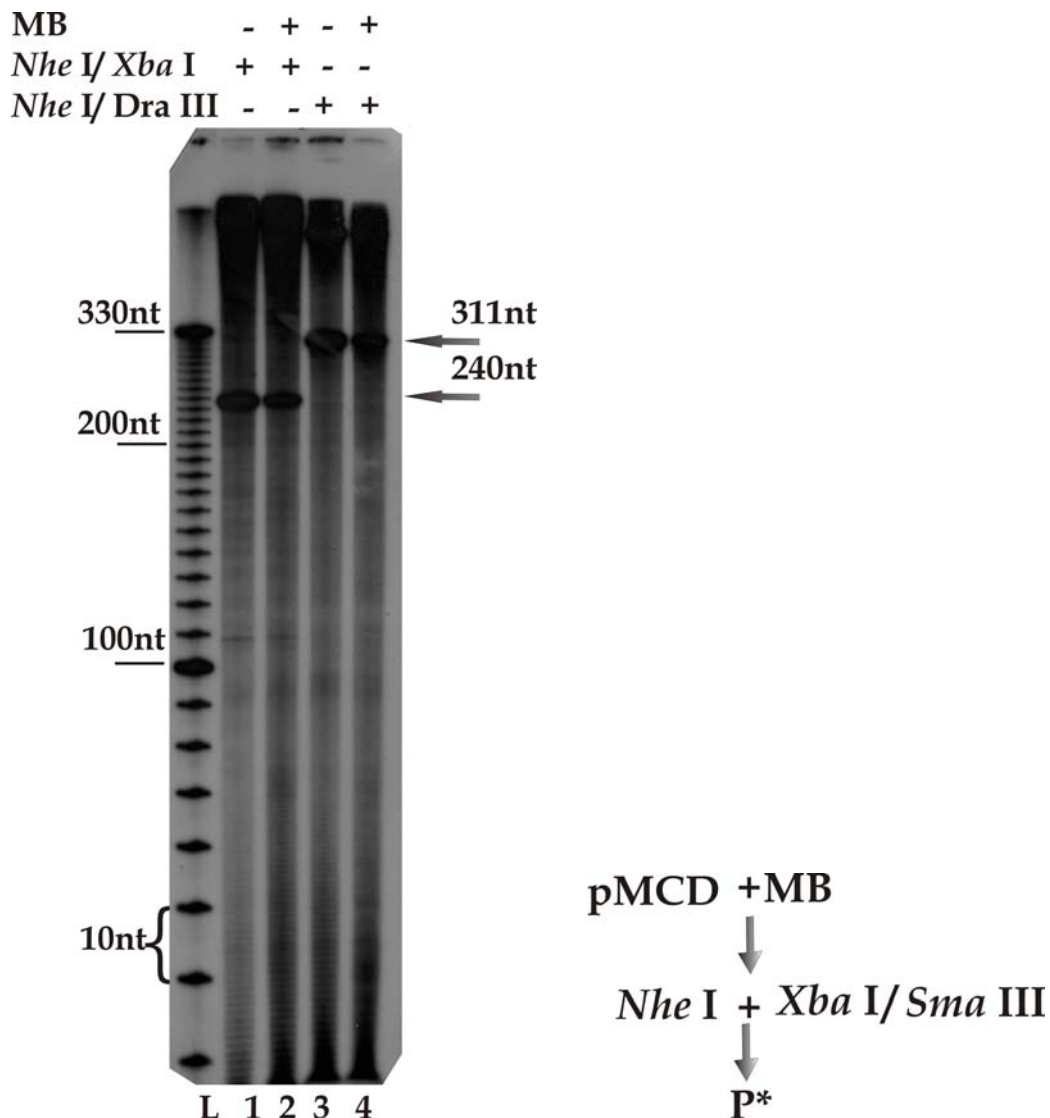
4.1.3 Region DNR

DNR region je bogat GA dinukleotidnim ponovcima, koji zauzimaju formu drugačiju od B-forme DNK [33]. Region DNR se nalazi u okviru *Nhe I*-*Xba I* restrikcionog fragmenta dužine 235 bp (Slika 18). Ukoliko se pre digestije restrikcionim enzimima plazmid tretira nukleazom MB, a digerirani fragmenti obeleže radioaktivnim fosforom, dobija se traka dužine 235 nt, što odgovara dužini celog restrikcionog fragmenta koji nije tretiran nukleazom MB i pokazuje da u ispitanom regionu ne može biti detektovana alternativna struktura.

Na osnovu ranijih istraživanja drugih autora [33], ukazano je na mogućnost postojanja dodatnih struktura u blizini DNR regiona. Da bismo ispitali da li ovakva struktura postoji u superspiralizovanoj formi plazmida pMCD, DNR region smo isecali drugim parom restrikcionih enzima koji zahvataju region nizvodno od DNR regiona. Analizom regiona sa *Dra III/Nhe I* dobija se traka od oko 311 nt sa ili bez nukleaze MB (Slika 18, kolona 3 i 4).

Tabela 4. Mutanti za DNR region

Plazmid mutant	Tip zamene	5' kraj prajmera	templejt	Veličina inserta (bp)
pMCD - DNRspcr	<i>Xba I</i> restrikciono mesto je zamenjeno sa <i>Xma I</i> , nakon čega je DNR je izbačen <i>Nhe I/Xma I</i> i zamenjen sa 5S RNK insertom iz pXP10	1202	pSV2-neo	235



Slika 18. Struktura DNR regiona i nizvodnog regiona unutar ori β DHFR sekvence. Ne postoje alternativne strukture u DNR regionu kao ni unutar analiziranog nizvodnog regiona. Uzorci su tretirani nukleazom MB, a zatim sečeni restrikcionim enzimima (DNR region- *Nhe I* i *Xba I* (2), nizvodni region - *Nhe I* i *Sma III* (4)), potom radiokativno obeleženi. Kontrolni uzorci su tretirani odgovarajućim restrikcionim parom, pa obeleženi radioaktivno (DNR region (1), nizvodni region (3)). L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmetni na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

```

1701 CCAAAAATGT CTCCTCAGT TGATGGTGT GTTT TAGGAG GTTCTAGAAA
GGTTTTTACA GAGGGAGTCA ACTACCACAA CAAAATCCTC CAAGATCTTT
1751 TTTGGGATAT GGGACCAGTC TGATGGAGGT GGGCCTTTGA TTTCTCTCTC
AAACCCTATA CCCTGGTCAG ACTACCTCCA CCCGAAACT AAAGAGAGAG
1801 TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCCC
AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGGG
1851 TCTCTGCCTC TCTCCCTCTG TCTGTCTGTC TGCCCCCCCC CCTCTCTCTC
AGAGACGGAG AGAGGGAGAC AGACAGACAG ACGGGGGGGG GGAGAGAGAG
1901 TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTGTGTGTG TGTGTGTGTG
AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGACACACAC ACACACACAC
1951 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG CGCGCGCGCT AGCGTGTGT TATTGTTTA
ACACACACAC ACACACACAC GCGCGCGCGA TCGCACACAA ATAAACAAAT
2001 TTGTGACATA AACAGCTTCT GCCACACATA TTCTGTCTGC AATGCCTTTA
AACACTGTAT TTGTCGAAGA CGGTGTGTAT AAGGACGACG TTACGGAAAT
2051 TCCCTTTATT GCTGGGATAA GTTGAAATCC TCAGAGACAG TGAGCCAAAA
AGGGAAATAA CGACCCTATT CAACTTTAGG AGTCTCTGTC ACTCGGTTTT
2101 TACATCCTTC TTCCCTGGG TTGCTTCTGT CAGGCTTTCT GTTGCACTGA
ATGTAGGAAG AAGGGGACCC AACGAAGACA GTCCGAAAGA CAACGTCCT
2151 CCCAGAAATG ACAGCTAATG TTAGTAAGAG CTGAGTCTT AGGAAACTGA
GGGTCTTTAC TGTCGATTAC AATCATTCTC GACTCAGGAA TCCTTTGACT
2201 GATGCCAGGT CTCTTCCTTA TCAATGGGAT TGATGAAAGA GGCATCAGGT
CTACGGTCCA GAGAAGGAAT AGTTACCCTA ACTACTTCT CCGTAGTCCA
2251 AGTGAGTGAC AAGTGAGCTT GCTTTCTAGT TTCCACCAAG TGAGAGTGTA
TCACTCACTG TTCACTCGAA CGAAAGATCA AAGGTGGTAC ACTCTCACAT

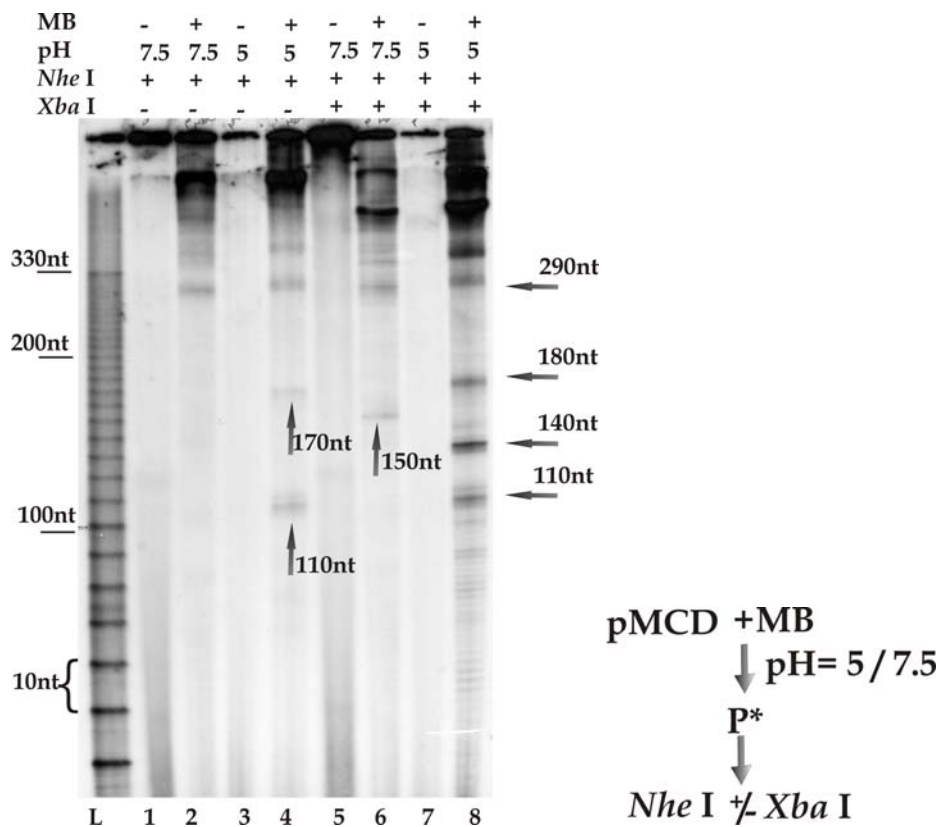
```

Slika 19. Sekvenca DNR regiona i nizvodnog regiona unutar *ori* β DHFR sekvence (obeležena mesta sečenja restrikcioničkih enzima *Xba* I, *Nhe* I i *Dra* III) (generisano programom *Vector NTI*)

Na osnovu ovih rezultata, možemo zaključiti da DNR region kao i region nizvodno od ovog domena pri datim uslovima u superspiralizovanoj formi plazmida pMCD ne sadrže nekanonsku strukturu.

Struktura DNK dramatično se menja u zavisnosti od spoljašnjih uslova. Prethodna istraživanja drugih autora [33], ukazuju na mogućnost da DNR region u uslovima kisele sredine može da zauzme drugačiju strukturu. Da bismo ispitali da li DNR region u topološki zatvorenoj formi ima alternativnu strukturu na sniženoj pH vrednosti, standardizovali smo nukleazni esej na pH 5 (opisano u Material i metode).

Postupci sečenja i obeležavanja plazmida vršeni su na već opisan način, a u eksperimentu koji sledi želeli smo da ispitamo i uporedimo strukture regiona DNR na neutralnom i kiselom pH.

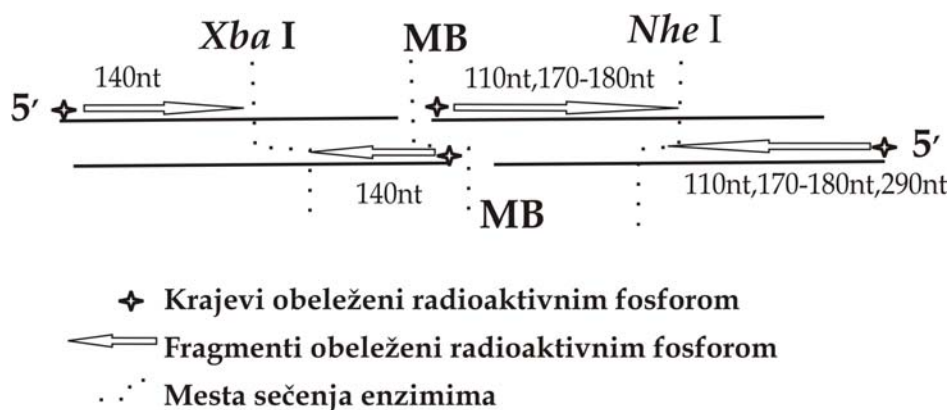


Slika 20. Struktura DNR regiona *ori* β DHFR sekvence pri uslovima od pH 5 i 7,5. Tretirani uzorci nukleazom MB (2,4,6,8) kao i netretirani kontrolni uzorci (1,3,5,7) su radioaktivno obeleženi, i potom sečeni restrikcionim enzimom *Nhe* I (1-4) ili parom enzima *Nhe* I i *Xba* I (5-8). Uzorci su tretirani nukleazom MB pri pH 5 (4,8) i pri pH 7,5 (2,6). L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmetni na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljeni eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

U eksperimentu prikazanom na Slici 20 region DNR plazmida pMCD sečen je restrikcionim enzimima (*Nhe* I, *Xba* I), a obeležavanje 5' krajeva vršeno je pre tretmana restrikcionim enzimima. U cilju boljeg definisanja pozicija mesta sečenja nukleaze MB, fragmenti DNR su tretirani samo jednim (Slika 20, kolone 1-4) ili parom restrikcionih enzima (Slika 20, kolone 5-8). Na ovaj način sve trake koje se dobijaju nastaju kao posledica obeležavanja mesta sečenja nukleaze MB, a odsustvo traka je potvrda nepostojanja nekanonskih struktura u ispitivanim domenima.

Nakon delovanja nukleaze MB na pH 5, potonjim radioaktivnim obeležavanjem, praćenog sečenjem restrikcionim enzimom *Nhe* I, javljaju se trake dužine od oko 110 nt, 170-180 nt i 290 nt (Slika 20, kolone 4). Nakon delovanja oba restrikciona enzima, *Xba* I i *Nhe* I, pored već navedenih traka, javlja se dodatna traka od 140 nt (Slika 20, kolona 8). Kod uzorka netretiranih nukleazom MB nema detektovanih traka.

Na Slici 21 predstavljene su trake koje je moguće dobiti tretmanom plazmida pMCD restrikcionim parom enzima *Xba* I i *Nhe* I nakon aktivnosti nukleaze MB na pH 5. Detektovani fragmenti mogu da potiču iz regiona uzvodno ili nizvodno od mesta za *Nhe* I. Budući da se nakon delovanja oba enzima trake od 290 nt, 170-180 nt i 110 nt ne menjaju, one najverovatnije potiču iz gornjeg lanca, 5' u odnosu na mesto za *Nhe* I (Slika 20). Traka od 140nt, koja se pojavljuje tek nakon dvostruke digestije mogla bi da potiče iz donjeg lanca 5' u odnosu na *Nhe* I mesto. U tom slučaju, traka bi mogla da se nalazi u okviru fragmenta izbačenog dvostrukom digestijom ili izvan njega, 140 nt od *Xba* I mesta, a 375 nt od *Nhe* I mesta. Traka bi takođe mogla pripadati donjem lancu, ukoliko bi se MB senzitivno mesto nalazilo 140 nt 5', u odnosu na *Xba* I mesto. Treba napomenuti da i u oblasti iznad 300 nt ima promena, ali one svakako pripadaju regionima udaljenim od DNR-a.



Slika 21. Shema sečenja DNR regiona restrikcionim enzimima *Nhe I-Xba I* (prikazana hipotetička mesta sečenja nukleaze MB pri pH 5)

U slučaju delovanja nukleaze MB na pH 7,5 pojavljuje se traka od 150nt samo nakon delovanja oba restrikciona enzima (Slika 20, kolona 6) i nakon tretmana nukleazom MB. Ova traka najverovatnije ne pripada fragmentu izbačenom dvostrukom digestijom, jer bi se, da je to slučaj morala videti i na Slici 18.

Da bismo utvrdili da li se bar jedna struktura koja se formira na kiselom pH nalazi u DNR regionu plazmida pMCD, koristili smo mutant pDNRspcr u kome je DNR region zamenjen sekvencom iz pSV2-neo. Radi poređenja sa nemutiranim fragmentom, korišćen je isti par enzima, *Nhe I-Xba I* i način rada kao u prethodno opisanom eksperimentu. U slučaju mutanta nisu otkriveni isti fragmenti kao sa regionom DNR (nije prikazano) što potvrđuje pretpostavku da se u regionu DNR i u njegovom neposrednom susedstvu na kiselom pH formiraju neortodoksne strukture.

Kombinovani, rezultati strukturne analize različitih regiona sekvence DHFR *ori β* uklonirane u plazmid pMCD, i poređenje sa odgovarajućim mutantima, pokazuju da ova sekvenca, kada se nalazi pod topološkim stresom, sadrži neortodoksne strukture u regionima esencijalnim za funkciju u inicijaciji sinteze

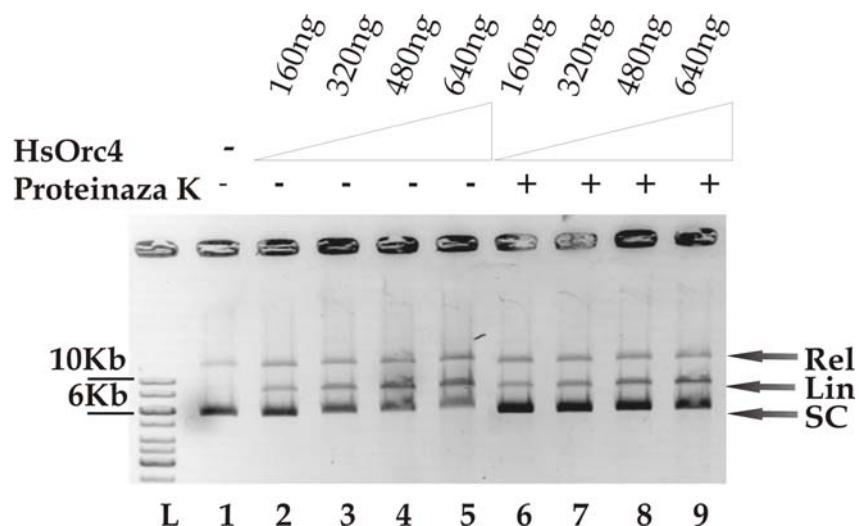
DNK. Polazeći od ovih rezultata i želeći da utvrdimo na koji način interakcije sa odgovarajućim proteinima mogu da utiču na strukturu *ori* sekvenci, uradili smo eksperimente opisane u sledećem poglavlju.

4.2 PROTEIN-DNK INTERAKCIJE U OKVIRU ORI SEKVENCE DHFR

U našim prethodnim istraživanjima pokazali smo da protein HsOrc4 interaguje sa linearnim fragmentima izolovanim iz *ori* sekvence DHFR (neobjavljeni rezultati).

Protein HsOrc4 koji je korišćen u eksperimentima je eksprimiran, prečišćen i pripremljen na način opisan u poglavlju Materijal i metode.

Kad je u pitanju ceo region sekvence DHFR *ori* β u superspiralizovanoj formi, ne mogu se koristiti konvencionalne metode kao što je retardacija na gelu (Slika 22), jer vezivanje relativno malog proteina za veoma veliki cirkularni molekul DNK ne menja dovoljno migraciju kompleksa. Ovo je prikazano na Slici 22 i mada se neki uticaj vezivanja proteina vidi, naročito kada se uporede uzorci tretirani (kolone 6-9) i netretirani (kolone 2-4) proteinazom K, rezultat nije dovoljno ubedljiv i pored višestrukog viška proteina u odnosu na plazmid (Tabela 5). Da bismo prevazišli ova ograničenja, primenili smo neku vrstu modifikovanog nukleaznog eseja, s ciljem da se utvrdi da li se protein HsOrc4 vezuje za neko od mesta na kojima je nukleaznim testom detektovana neortodokсна структура. Uzevši u obzir ranije ustanovljenu preferencu proteina HsOrc4 za regione bogate AT parovima [76], za ovaj eksperiment izabrali smo AT-bogati region sekvence DHFR *ori* β .



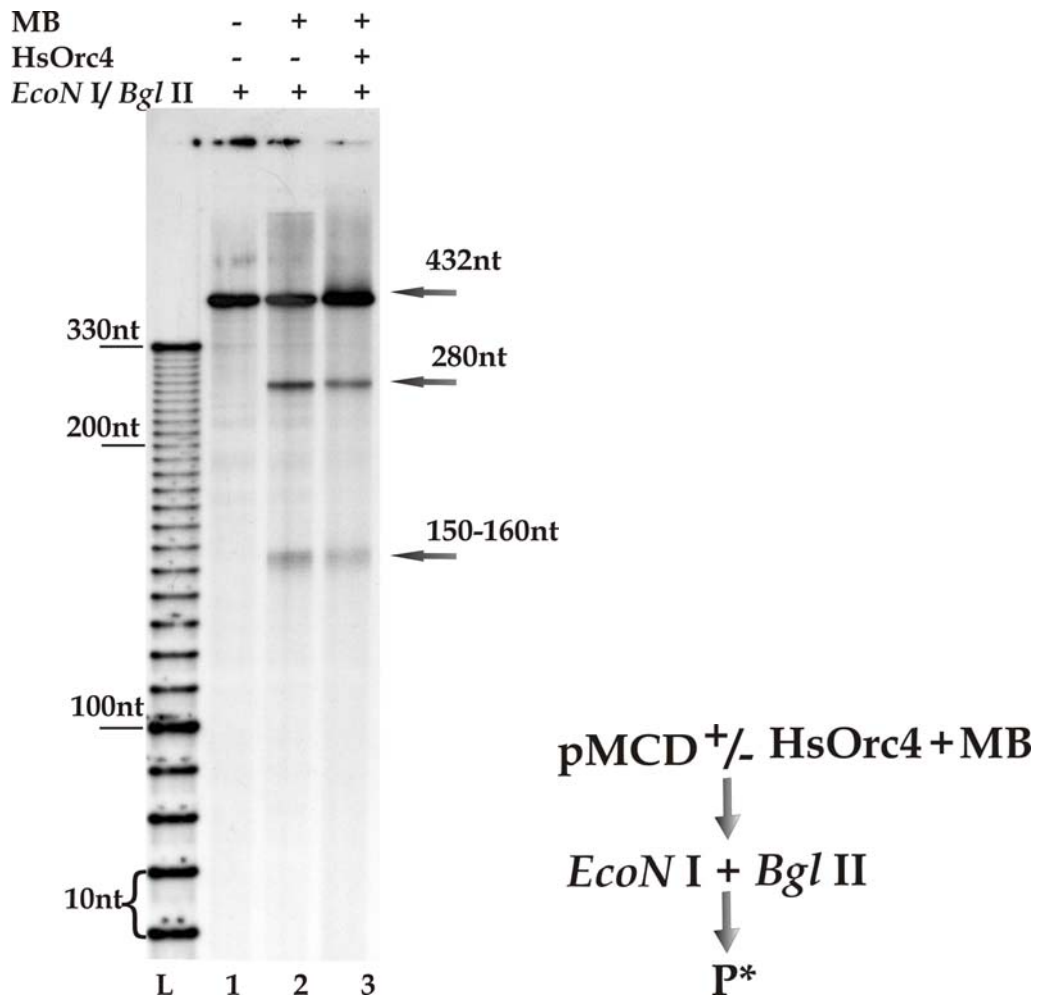
Slika 22. Vezivanje rastućih količina proteina HsOrc4 za plazmid pMCD pri pH 7,5. Plazmid je inkubiran u rastućim količinama proteina (2-9, količine proteina prikazane na slici). Uzorci tretirani Proteinazom K nakon inkubiranja sa proteinom HsOrc4 (6-9). Uzorak neinkubiran sa proteinom (1) i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83], linearizovana (Lin) i superspiralizovana (SC).

Tabela 5. Molarni odnos proteina HsOrc4 i plazmida pMCD u reakciji vezivanja pri pH 7,5

Kolona na Slici 22	Količina proteina HsOrc4		Količina plazmida pMCD (fmol)	Ukupna zapremina reakcione smeše (µl)
	(fmol)	(ng)		
2, 6	356	160	43,2	20
3, 7	712	320	43,2	20
4, 8	1068	480	43,2	20
5, 9	1424	640	43,2	20

4.2.1 Analiza strukture AT bogatog regiona u prisustvu proteina HsOrc4

Pretpostavili smo, da bismo, ukoliko plazmid sečemo nukleazom MB, dok je HsOrc4 još uvek vezan za DNK, mogli da definišemo da li je neortodokсна структура заштићена proteinom. Pretpostavke su bile da bismo bili u mogućnosti da detektujemo pojavu dodatnih traka tj. pomeraj jednolančanog regiona usled vezivanja proteina za AT bogati region u okviru *ori* β sekvence DHFR. Međutim, u ponovljenim eksperimentima smo primetili da nakon dejstva nukleaze MB dolazi do otežanog sečenja od strane restrikcionog enzima *Sph* I, pa smo za analizu AT bogatog regiona umesto ovog enzima izabrali restrikcioni enzim *Bgl* II. Ovako formiran par restrikcionih enzima (*Eco*N I/*Bgl* II) daje fragment od 432 bp, a nakon sečenja nukleazom MB daje fragmente od oko 150 nt-160 nt i 280 nt (Slika 23, kolone 2 i 3). Nakon mapiranja potvrdili smo da i sa drugim parom enzima detektujemo identičnu poziciju sečenja nukleazom MB kao i u prethodnim slučajevima (Slika 17).



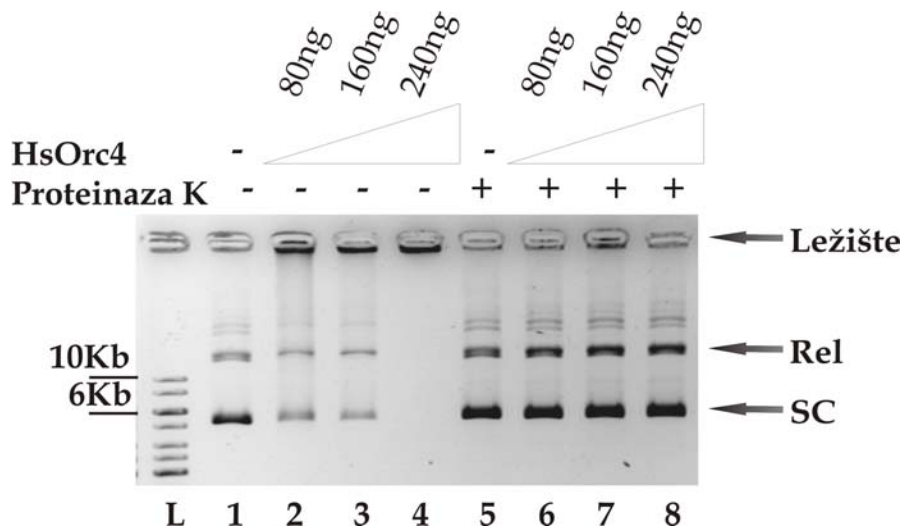
Slika 23. Analiza strukture AT bogatog regiona u prisustvu proteina HsOrc4. Plazmid pMCD je tretiran nukleazom MB u prisustvu (3) ili odsustvu (2) proteina HsOrc4. Nakon tretmana, uzorci su sečeni parom restriktionih enzima *EcoN I* i *Bgl II*, a nakon toga radioaktivno obeleženi. Kontrolni uzorak netretiran nukleazom MB je sečen restriktionim parom enzima, a zatim obeležen radioaktivnim fosforom (1). L-standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmenti na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

Rezultati prikazani na Slici 23 pokazuju da je, u prisustvu proteina HsOrc4, delovanje nukleaze MB otežano. Trake koje nastaju sečenjem nukleazom MB su manjeg intenziteta kod uzorka koji za sebe ima vezan protein HsOrc4, mada se iz trake koja odgovara dužini celog fragmenta vidi da je u traci 3 naneto čak više materijala nego u prethodne dve. Mogući razlozi ove pojave su dvojaki, ili je protein HsOrc4 lociran na mestu delovanja enzima pa blokira pristup nukleazi MB, ili je struktura DNK promenjena u prisustvu proteina, pa nema jednolančanog regiona koji bi prepoznala nukleaza MB. Bez obzira na tačan mehanizam, rezultati sugerišu da HsOrc4 interaguje sa funkcionalno značajnim i strukturno neortodoksnim AT bogatim regionom.

4.2.2 Analiza vezivne sposobnosti proteina HsOrc4 za plazmid pMCD pri različitim uslovima sredine

Prilikom istraživanja različitih uslova pod kojima bismo mogli da pratimo vezivanje proteina HsOrc4 i da kao probu za različite regione *ori* sevice koristimo nukleazu MB, primetili smo da na kiselom pH, i u prisustvu proteina, ceo plazmid ostaje u ležištu agaroznog gela, kao što je prikazano na Slici 24 i Slici 25. Pod ovim uslovima, različiti aspekti interakcije inicijacionog proteina HsOrc4 sa cirkularnim molekulom DNK koji sadrži DHFR *ori* β sekvencu, analizirani su metodom retardacije u agaroznom gelu. Inkubacija pMCD sa proteinom u rastućoj količini dovodi do formiranja struktura koje jedva mogu da uđu u pore agaroznog gela (Slika 24, kolone 2-4 i Slika 25, kolona 4). Molarni odnos proteina i DNK pri kome dolazi do potpunog ili delimičnog zadržavanja plazmida u ležištu prikazan je u Tabeli 6. Tretman proteinazom K pre nanošenja uzoraka obnavlja pokretljivost plazmida, što pokazuje da je promenjena migracija plazmida izazvana vezivanjem proteina (Slika 24, kolone 6-8). Ukoliko se protein denaturiše pre reakcije vezivanja, potpuno se obnavlja pokretljivost plazmida, što ukazuje da interakcija proteina i plazmida zahteva funkcionalno aktivan protein (Slika 25, kolona 11). Važno je

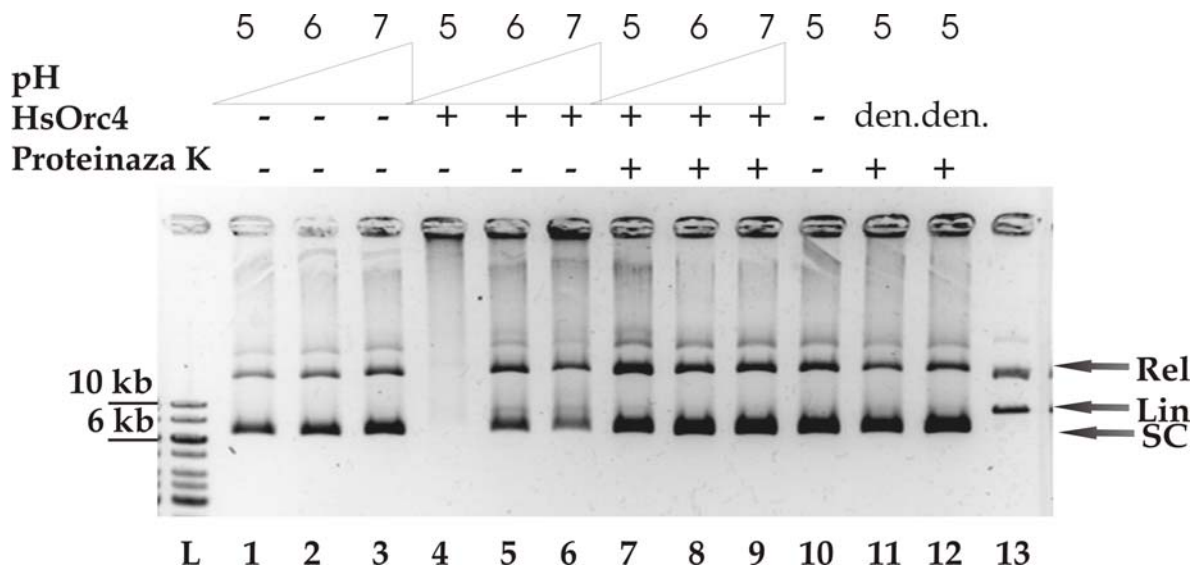
primetiti da se protein mnogo slabije vezuje ili ne pravi umrežene strukture kako raste baznost pufera za vezivanje (Slika 26, kolone 4-6).



Slika 24. Vezivanje rastućih količina HsOrc4 za pMCD pri pH 5. Plazmid je inkubiran 30 min. sa rastućim količinama proteina (2-4 i 6-8, količine proteina prikazane na slici). Uzorci tretirani Proteinazom K nakon inkubiranja sa proteinom HsOrc4 (5-8). Kontrolni uzorci koji nisu inkubirani sa proteinom (1,5) i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83] i superspiralizovana (SC), kao i uzorci zaostali u ležištu.

Tabela 6. Molarni odnos proteina HsOrc4 i plazmida pMCD u reakciji vezivanja pri pH 5

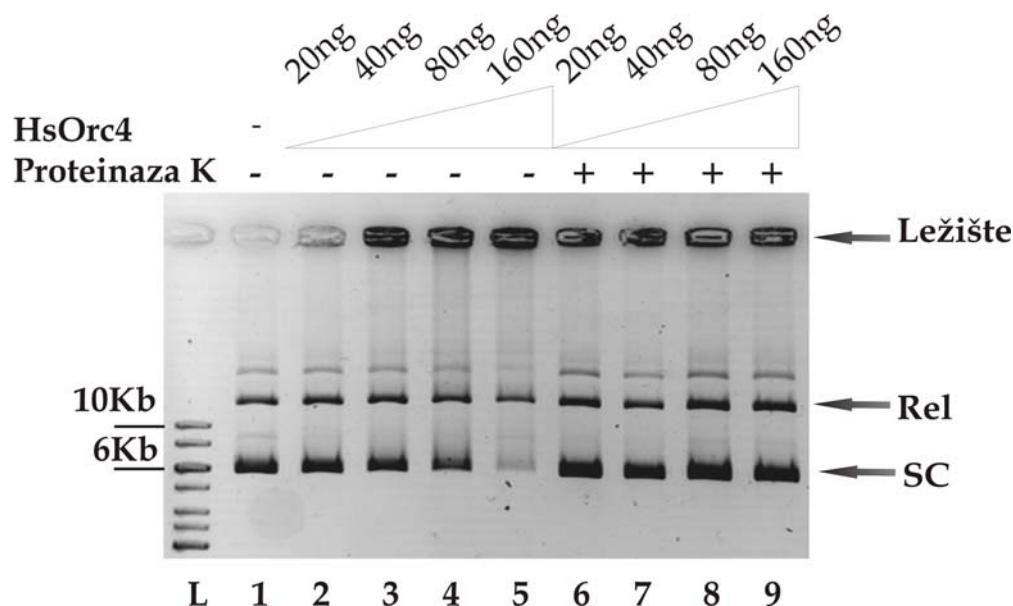
Kolona na Slici 24	Količina proteina HsOrc4		Količina plazmida pMCD (fmol)	Ukupna zapremina reakcione smeše (µl)
	(fmol)	(ng)		
2, 6	178	80	36	15
3, 7	356	160	36	15
4, 8	712	240	36	15



Slika 25. Vezivanje HsOrc4 za pMCD pri različitim pH vrednostima. Plazmid je inkubiran 30min. u puferu rastuće pH vrednosti (vrednosti prikazane na slici) proteinom HsOrc4 (4-9) ili bez proteina (1-3). Uzorci tretirani Proteinazom K nakon inkubiranja proteinom HsOrc4 (7-9). Plazmid pMCD inkubiran denaturisanim proteinom HsOrc4 pri pH 5 (11,12) i naknadno deproteinisan (12). Kontrolni uzorak (13) i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83], linearizovana (Lin) i superspiralizovana (SC). den. – denaturisan protein

Iz Tabele 6 i Slike 15 vidi se da otprilike dvadesetostruki višak proteina zaustavlja sve molekule plazmida u ležištu. Ovakva migracija može se objasniti samo ako protein multimerizuje i pravi mostove između različitih molekula DNK, stvarajući na taj način konglomerate mnogo veće nego što je pojedinačan cirkularni molekul koji je za sebe vezao 20 molekula proteina. Veoma je zanimljivo da smo u pojedinim eksperimentima vezivanja primetili da HsOrc4 pokazuje veliku preferenciju za superspiralizovanu (SC) DNK. Esej zasnovan na retardaciji u agaroznom gelu veoma je grub, pa ipak, na Slici 26 jasno se vidi da postoji takva

količina proteina koja je zadržala u ležištu gotovo svu SC DNK, a da pritom gotovo da nije umanjila količinu relaksirane forme plazmida. Vezivanjem rastućih količina proteina HsOrc4 (Slika 26, kolone 2-5 i 6-9) formira se kompleks pri čemu se protein preferencijalno vezuje za superspiralizovanu formu plazmida pMCD (kolone 3-5) što se ogleda u retenciji u ležištu gela. Nakon deproteinizacije uzoraka plazmida vraćaju svoju mobilnost (kolone 7-9).



Slika 26. Vezivanje rastućih količina HsOrc4 za superspiralizovanu formu pMCD. Plazmid je inkubiran na 37°C u rastućoj količini proteina HsOrc4 (2-5 i 6-9, količine prikazane na slici). Uzorci tretirani Proteinazom K nakon inkubiranja proteinom HsOrc4 (6-9). Uzorak neinkubiran proteinom (1) i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83] i superspiralizovana (SC), kao i uzorci zaostali u ležištu.

Ovo svojstvo je karakteristično za sve inicijacione proteine [58, 75] koji ne samo da imaju veći afinitet za SC DNK nego, u najvećem broju slučajeva, mogu da promene stepen superspiralizacije DNK za koju se vezuju.

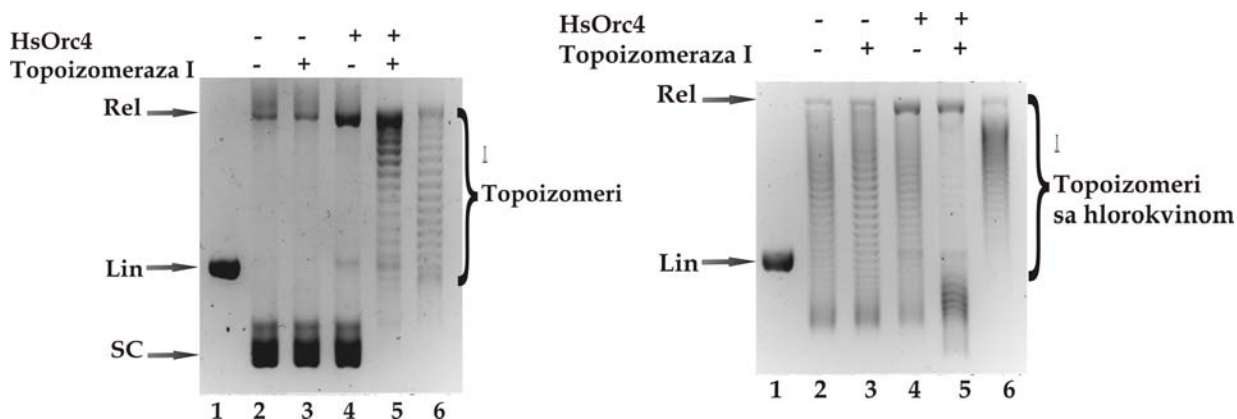
4.2.3 Ispitivanje topoloških promena plazmida pMCD u prisustvu proteina HsOrc4

Pod različitim uslovima, koji uključuju i delovanje inicijacionih proteina, superspiralizacija cirkularnih molekula podložna je reverzibilnim promenama koje bivaju „zadržane“ u strukturi plazmida jedino ako se jedna od kovalentnih veza raskine i ponovo spoji. Da bi se, dakle, pratio uticaj nekog proteina na superspiralizaciju, neophodno je da se njegovo delovanje „fiksira“ odgovarajućom topoizomerazom. Kao produkti ovakvih reakcija nastaju različiti topoizomeri koji se mogu razdvojiti u agaroznom gelu. Pokretljivost DNK topoizomera u agaroznom gelu zavisi od njihove kompaktnosti, tj. od stepena, a ne od smera superspiralizacije. Da bi se utvrdilo kako neki protein utiče na smer i stepen superspiralizacije nekog DNK molekula, migracija cirkularnih molekula DNK u agaroznom gelu prati se u prisutvu varirajućih količina interkalatora.

Da bismo eventualnu promenu strukture plazmida izazvanu dejstvom proteina HsOrc4 „zaključali“, primenili smo Topoizomerazu I. Ovaj enzim hidrolizuje fosfodiesterne veze u DNK lancu i ponovo ih spaja, izazivajući relaksaciju DNK. Na ovaj način privremene promene strukture DNK koje bi mogao da izazove protein HsOrc4 postaju trajno „zapamćene“ u vidu različitih formi topoizomera koji se mogu razdvojiti elektroforezom na agaroznom gelu. Uslovi i način izvođenja eksperimenata opisani su u odeljku Materijal i metode.

Plazmid pMCD smo inkubirali sa proteinom HsOrc4 30min. na 37°C, nakon čega je u reakcionu smešu dodata Topoizomeraza I i reakcija nastavljena pod istim uslovima još 30min. Po završetku reakcije, dodat je pufer za nanošenje, a uzorci razdvajani na agaroznom gelu koji je naknadno bojen etidijum-bromidom. Analizom dobijenih rezultata primećuje se razlika u distribuciji topoizomera u prisustvu i odsustvu proteina što ukazuje da inicijacioni protein uzrokuje promene u topologiji plazmida (Slika 27, kolona 5 levo). Promene su reverzibilne prirode, jer se po uklanjanju HsOrc4, struktura plazmida vraća na prethodno stanje (kolona 4

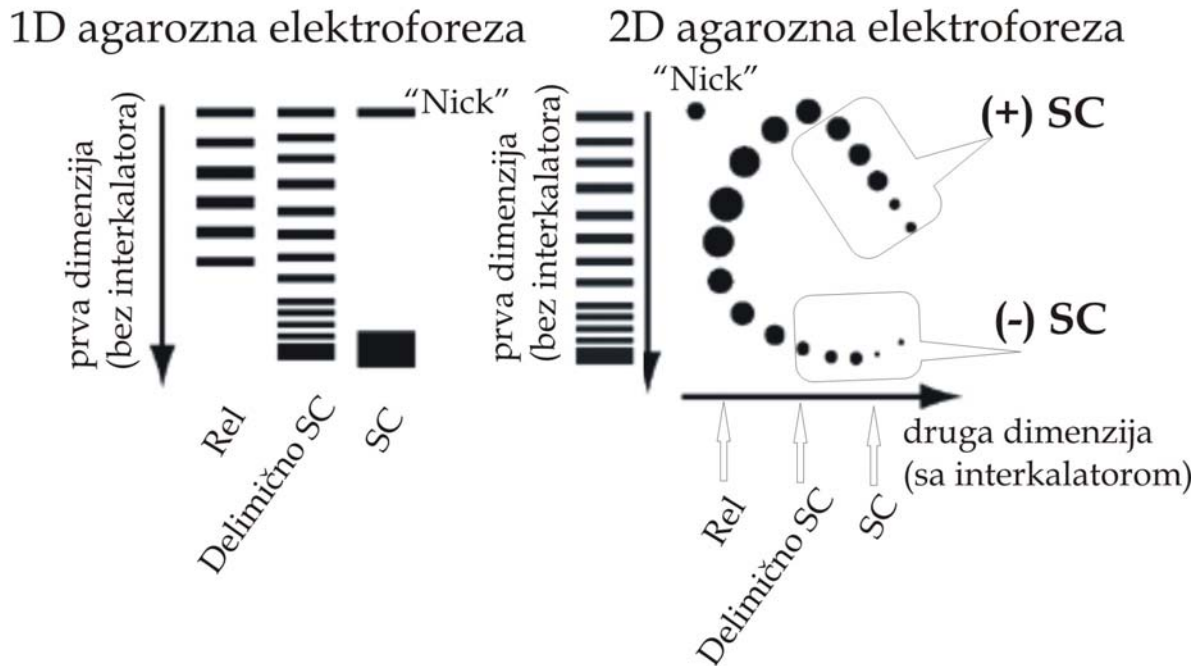
levo). Pod odabranim uslovima sama Topoizomeraza I ne dovodi do vidljive relaksacije plazmida (kolona 3 levo), na osnovu čega možemo zaključiti da je za promenu topologije plazmida u koloni 5, odgovoran protein HsOrc4 u prisustvu Topoizomeraze I. Da bismo utvrdili prirodu promene topologije, uradili smo preliminarni eksperiment elektroforetskog razdvajanja topoizomera na agaroznom gelu u prisustvu interkalatora (Slika 27, desno). Na Slici 27 prikazana je različita distribucija istih uzoraka u odsustvu interkalatora (levo) i u prisustvu interakalatora (desno). Poređenjem rasporeda topoizomera na Slici 27 (kolone 5 i 6, slika levo i desno) može se zaključiti da postoji razlika u prirodi topoizomera nastalih destvom proteina HsOrc4 i Topoizomeraze I (kolona 5), u odnosu na kontrolni relaksirani plazmid (kolona 6).



Slika 27. Protein HsOrc4 u interakciji sa plazmidom pMCD, a nakon tretmana sa Topoizomerazom I formira drugačiji panel topoizomera. Plazmid pMCD je tretiran Topoizomerazom I nakon početnih 30 minuta Inkubiranja sa proteinom HsOrc4 (5). Uzorci su razdvajani na agaroznom gelu u prisustvu (slika desno) i odsustvu (slika levo) hlorokvina (1 μ g/ml). Plazmid tretiran Topoizomerazom I (3) i proteinom HsOrc4 (3). Kontrolni uzorci: netretiran (2), linearizovan (1) i relaksiran (6). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83], linearizovana (Lin) i superspiralizovana (SC). Obeležene razdvojene forme topoizomera.

S ciljem da se utvrdi da li HsOrc4 povećava pozitivnu (+) ili negativnu (-) superspiralizaciju, uzorci su analizirani na dvodimenzionalnoj elektroforezi (Slika 29).

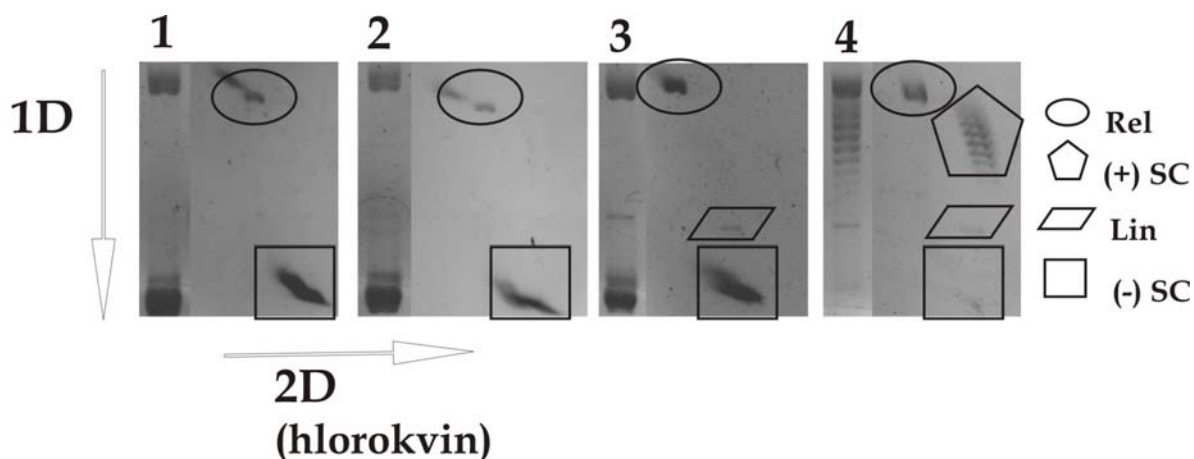
Za razdvajanje topoizomera po smeru superspiralizacije koriste se interkalatori, kao što je hlorokvin. Prilikom ugradnje u žljebove DNK, interkalatori dovode do lokalne distorzije lanaca i odvijanja DNK. Ugradnjom interkalatora povećava se stepen pozitivne superspiralizacije. U zavisnosti od količine ugrađenog interkalatora, topoizomer sa visokim stepenom (-) superspiralizacije, može varirati od konformacije topoizomera (-) superspiralizacije manjeg stepena, preko relaksiranog plazmida do topoizomera sa (+) superspiralizacijom. Topoizomeri istog stepena, a suprotnog smera superspiralizacije na prvoj dimenziji putuju identično (Slika 28, levo). Na drugoj dimenziji u prisustvu interkalatora, negativno superspiralizovan topoizomer usporava, dok pozitivni ubrzava, pa se na ovaj način razdvajaju (Slika 28, desno). Plazmidi kod kojeg je sečen jedan lanac DNK (eng. *nick*) imaju slobodu vezu oko koje mogu da rotiraju i na taj način se odupiru uticaju interkalatora, pa na gelu u bilo kojoj dimenziji putuju najsporije. Ovaj princip se koristi u razdvajanju topoizomera u prvoj dimenziji na osnovu stepena superspiralizacije, a u drugoj dimenziji u prisustvu interkalatora po smeru superspiralizovanosti.



Slika 28. Shema dvodimenzionalne elektroforeze sa interkalatorom. Jednodimenzionalna elektroforeza je vršena bez prisustva interkalatora (slika levo). Razdvojene su forme: relaksirana [83], superspiralizovana (SC), delimično SC, i „nikovana“ forma plazmida (eng. *nick*). Dvodimenzionalna elektroforeza je vršena u prisustvu interkalatora, u smeru upravno na prvu dimenziju. Razdvajaju se forme plazmida: pozitivno superspiralizovana (+), negativno superspiralizovana (-) i „nikovana“ forma. (Preuzeto i delimično izmenjeno [84])

Kao što je prikazano na Slici 29, u prisustvu interkalatora topoizomeri u drugoj dimenziji menjaju stepen superspiralizovanosti i time svoju elektroforetsku pokretljivost. Kao rezultat dolazi do drugačijeg rasporeda topoizomera što se može videti na Slici 29. Rezultati ukazuju da relaksacijom pMCD u prisustvu proteina HsOrc4 nastaju (+) superspiralizovani topoizomeri, jer povećavaju svoju pokretljivost u prisustvu interkalatora u odnosu na (-) superspiralizovane forme topoizomera (Slika 29, kolona 4), što je u skladu sa uočenim ponašanjem drugih

inicijatora [75]. Preparat proteina sadrži i aktivnost koja izaziva prekide u jednom lancu DNK, ali nam moguće značenje ovog fenomena zasada nije jasno (Slika 29, kolona 3 i 4).

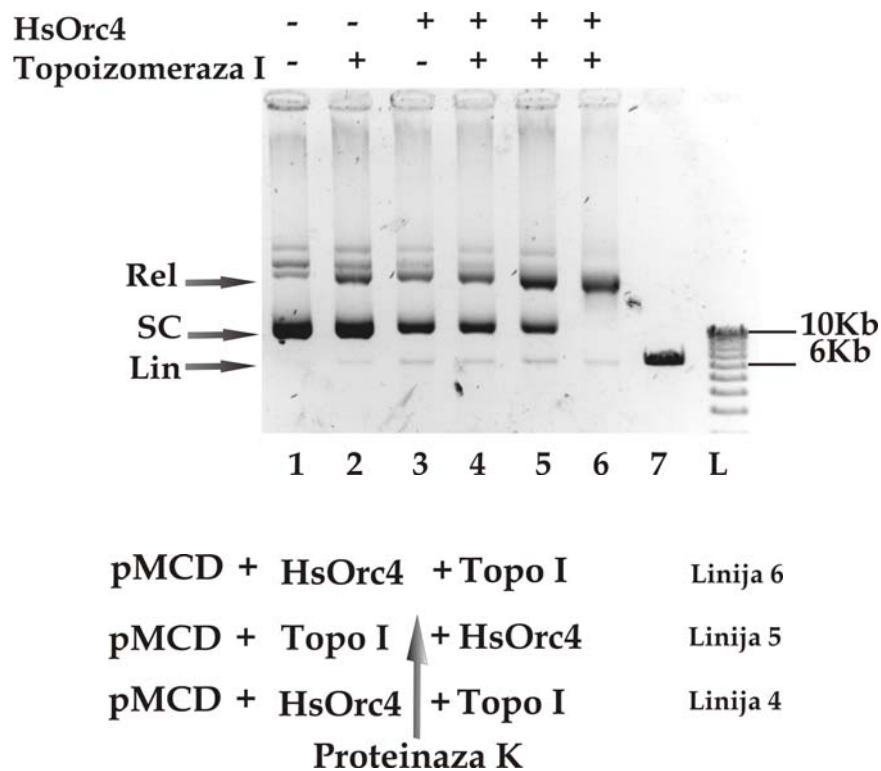


Slika 29. Protein HsOrc4 u interakciji sa plazmidom pMCD, a nakon tretmana Topoizomerazom I, formira topozomere sa manjim stepenom (-) superspiralizacije. Plazmid pMCD je tretiran proteinom HsOrc4 30min na 37°C (3) i nakon toga je nastavljena inkubacija sa dodatom Topoizomerazom I (4). Kontrolni uzorci: netretiran plazmid (1) i plazmid tretiran Topoizomerazom I (2). Uzorci su razdvajani na agaroznom gelu u prvoj dimenziji (1D), a zatim u drugoj (2D) u prisustvu hlorokvina. Prikazane su forme nastalih topozomera: relaksirana [83], linearizovana (Lin), superspiralizovana (SC).

Kao što je prikazano na Slici 30, osnovni efekat proteina HsOrc4 na strukturu plasmida je reverzibilan i može se uočiti samo u prisustvu Topoizomeraze I. Ovaj efekat smo potvrdili već opisanim eksperimentom uz dodatne modifikovane postupke. Plazmid se prvo inkubira sa proteinom, pa nakon deproteinizacije i sa Topoizomerazom I (Slika 30, kolona 4) ili obrnutim redosledom (kolona 5). Nastale forme plasmida se malo ili gotovo uopšte ne razlikuju u rasporedu topozomera kod netretiranog plasmida (kolona 1),

tretiranog samo Topoizomerazom I (kolona 2) ili samo kad je u reakciji samo protein HsOrc4 (kolona 3).

Ovi rezultati potvrđuju prethodne pretpostavke o mehanizmu dejstva HsOrc4 proteina i interakcije sa Topoizomerazom I.



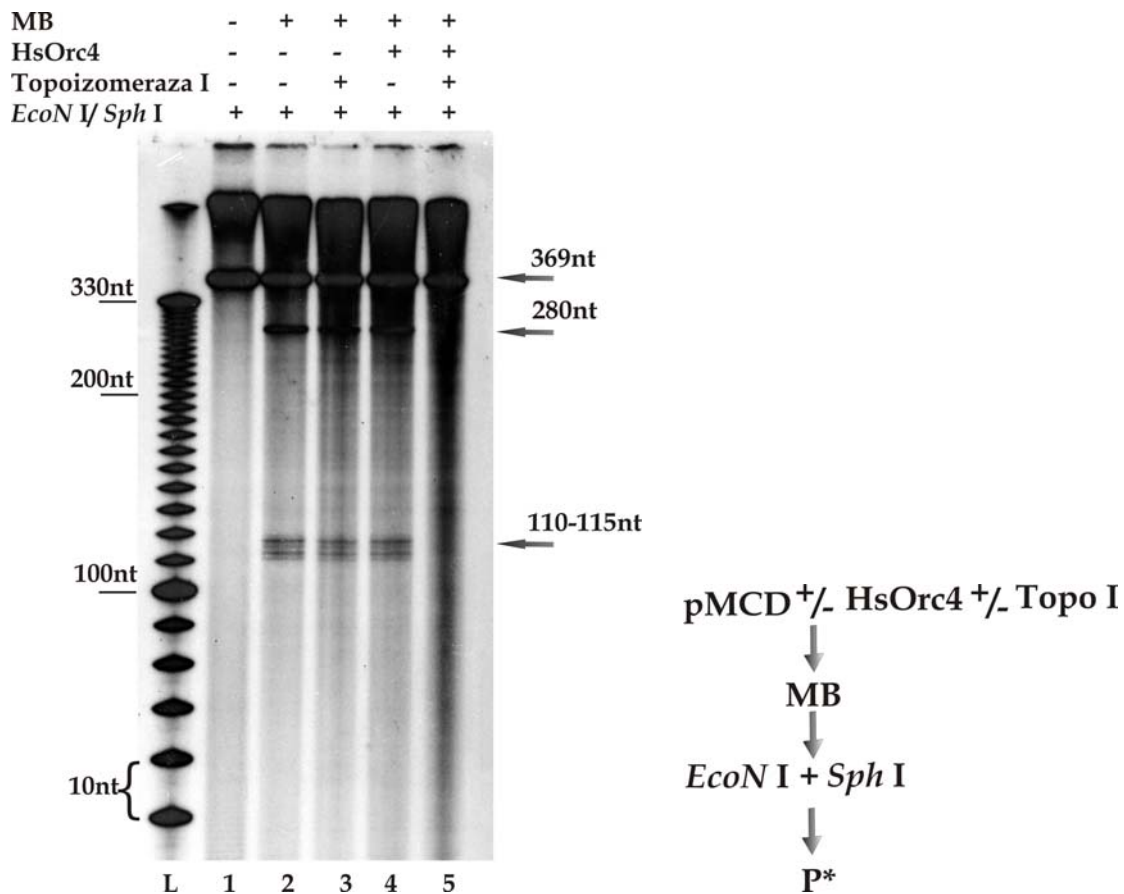
Slika 30. Za potpuni efekat relaksacije plazmida potrebno je istovremeno prisustvo proteina HsOrc4 i Topoizomeraze I. Plazmid pMCD (1) tretiran Topoizomerazom I (2, 4-6) u prisustvu proteina HsOrc4 (6). Plazmid pMCD inkubiran sa proteinom HsOrc4 (3, 4) i tretiran proteinazom K pre inkubacije sa Topoizomerazom I (4). Plazmid pMCD tretiran Topoizomerazom I, pa proteinazom K i inkubiran sa proteinom HsOrc4 (5). Svi uzorci su pre nanošenja na gel deproteinisani proteinazom K. Kontrolni uzorci: netretiran (1) i linearizovan (7), i standard dužine (L). Strelicom obeležene forme plazmida: relaksirana [83], linearizovana (Lin) i superspiralizovana (SC).

4.2.4 Analiza strukture AT bogatog regiona topoizomera

Nakon što smo pokazali da protein HsOrc4 dovodi do konformacionih promena plazmida, hteli smo da vidimo kako se te promene ogledaju na strukturu funkcionalnih regiona u DHFR *ori* β sekvenci. Pošto smo na početku rada utvrdili da u ovoj *ori* sekvenci postoji nekanonska struktura u AT bogatom regionu, želeli smo da ispitamo da li protein HsOrc4 utiče na nju. Nakon tretmana plazmida Topoizomerazom I u prisustvu HsOrc4 i potomje deproteinizacije, struktura je analizirana nukleazom MB kao što je opisano u Materijalu i metodama. Ukratko, plazmid je tretiran nukleazom MB, digeriran enzimima *EcoN* I i *Sph* I, radioaktivno obeležen i analiziran PAGE na denaturišućem gelu i autoradiografijom.

Analizom AT bogatog regiona detektovana je promena u strukturi. Analizom strukture AT bogatog regiona nukleazom MB pokazano je da ovaj region gubi nekanonsku strukturu u interakciji proteina HsOrc4 i plazmida pMCD, a nakon tretmana Topoizomerazom I (Slika 31, kolona 5). Obrazac traka odgovara traci kod netratiranog uzorka (kolona 1), dok se obrazac traka kod uzoraka prethodno inkubiranih sa HsOrc4 (kolona 4) ili sa Topoizomerazom I (kolona 3) ne razlikuje od uzorka tretiranog samo nukleazom MB (kolona 2).

Ovaj rezultat ukazuje da konformacione promene u plazmidu uslovljenje interakcijom sa inicijacionim proteinom pogađaju funkcionalno značajne elemente *ori* sekvence.



Slika 31. Protein HsOrc4 u interakciji sa plazmidom pMCD, a nakon tretmana Topoizomerazom I, dovodi do specifičnog ukidanja nekanonske strukture kod AT bogatog regiona DHFR *ori* β sekvence. Plazmid pMCD je inkubiran sa proteinom HsOrc4 (4,5), i zatim tretiran Topoizomerazom I (3,5). Nakon deproteinizacije, uzorci su tretirani nukleazom MB (2-5), a potom sečeni restrikcionim parom enzima *EcoN I* i *Sph I*, i obeležavani radioaktivno. Kontrolni uzorak: netretirani uzorak je sečen enzimima i radioaktivno obeležen (1). L- standard dužine od 10 bp (10-330 bp). Strelicama su obeleženi fragmetni na gelu. Pored slike gela je shematski predstavljen eksperiment. P*-defosforilacija, a zatim fosforilacija radioaktivnim izotopom fosfora

5. DISKUSIJA

U našim dosadašnjim istraživanjima pratili smo funkcije proteina HsOrc4 u interakciji sa linearnim fragmentima i pokazali da se ova subjednica kompleksa ORC čoveka vezuje za AT bogate regione i utiče na formiranje intramolekulskih nekanonskih struktura DNK [72, 76, 77]. Ovim radom hteli smo da *in vitro* sistem u kome ispitujemo strukturne promene DNK nastalih u interakciji sa ovim inicijacionim proteinom približimo realnim uslovima koji vladaju u ćeliji. Da bismo ovo postigli bilo je potrebno izabrati odgovarajuće pristupe i uspostaviti optimalne uslove reakcija.

Model sistem cirkularne DNK, tj. plazmida već je ranije pokazao svoje prednosti za izučavanje protein-DNK interakcija [75, 85]. Zbog topološki zatvorene, superspiralizovane strukture, plazmid predstavlja dobar supstrat za izučavanje funkcija DNK vezivnih proteina. Takođe, plazmid oponaša topološki zatvorene domene kondenzovane u jedru ćelije. Svaka lokalna promena stukture izazvana delovanjem proteina se ispoljava kao promena u navojima DNK što može dovesti i do većih promena u topologiji čitavog plazmida.

Sa ciljem da ispitamo lokalne promene strukture plazmida, koristili smo i modifikovali nukleazani esej. Esej se zasniva na prepoznavanju i sečenju jednolančanih regiona DNK nukleazom MB. Nukleaza optimalnu aktivnost pokazuje pri kiselim uslovima, pa je bila potrebna standardizacija eseja na neutralnoj pH (Slika 9). Naime, jednolačani regioni u plazmidu postoje upravo usled postojanja torzionog napona čija se energija koristi za razdvajanje lanaca DNK. Sečenjem jednog lanca u takvom regionu, dolazi do relaksacije, gubljenje torzionog napona i nestajanja eventulanih drugih jednolančanih regiona unutar plazmida, a samim tim i potencijalnih mesta sečenja nukleaze MB.

Pored formi sa prekidom u jednom lancu, nukleaza je proizvodila i linearizovane forme. Razlog ovakve pojave ne možemo sa sigurnošću utvrditi, ali ga možemo tražiti u strukturi plazmida. Upotrebom veće količine nukleaze MB, plazmid pMCD je sečen dvolančano uvek na definisanim mestima (nije prikazano). Moguće objašnjenje bi moglo biti da postoji stabilna struktura sa bliskim jednolančanim regionima u oba lanca koja, zahvaljujući Votson-Krikovim i Hugstinovim vodoničnim vezama ostaje i posle prekida u jednom lancu i na taj način dozvoljava i sledeći atak nukleaze MB i shodno tome i linearizaciju.

Nakon tretmana nukleazom MB, željeni domeni su sečeni izabranim restrikcionim enzimom uzorci su obeležavani radioaktivnim izotopom fosfora. U nuklaznom eseju ispitivana je struktura *ori* β sekvence DHFR unutar plazmida pMCD.

Ori β sekvenca lokusa DHFR je jedna od najbolje definisanih *ori* sekvenci. Funkcionalnom analizom definisani su domeni unutar ovog regiona koji su esencijalni za njenu replikativnu aktivnost [6]. Analizom strukture *ori* β DHFR unutar superspiralizovane forme plazmida, detektovali smo prisustvo neortodoksne strukture unutar AT bogatog regiona na poziciji oko 3293.

Ovim metodološkim pristupom, bili smo u mogućnosti da detektujemo jednolančane regione, ali ne i da definišemo strukturu ili da predložimo njen model. Pošto je DNK dvolančani molekul, jednolančani regioni su naspramni u oba lanca ili postoji tripleks. Naši rezultati pokazuju da u susedstvu pozicije 3923 nukleaza MB može da izazove prekid ili u donjem ili u gornjem lancu DNK, što je u skladu sa strukturom okca (mehura) kao što je ranije već sugerisano [14]. Moguća je i kompleksnija struktura. Jedno od mogućih rešenja strukture je i da jedan lanac otkriven zbog formiranja trolančane stukture sa nekim drugim domenom unutar plazmida. U strukturi ovog tipa delovanju nukleaze MB

podložan je lanac koji ne pripada tripleksu i deo tripleksa u kome je jedan lanac savijen da bi ostvario vodonične veze sa druga dva. Sličan model, predložen na osnovu rada na linearnim fragmentima, već je dat u prethodnim radovima [72] ili na modelu plazmida [33]. Ovakva struktura ne iznenađuje, s obzirom da je ovakav AT bogati region lako topljiv i sposoban za rasplitanje lanaca DNK i formiranje nekanonskih struktura dodatne reference [76].

Prisustvo jednolančanog regiona, međutim, nije primećeno kod ostalih ispitivanih regiona, kao što su DNR ili BEND RIP60. Ipak, ovi regioni su takođe značajni za inicijaciju replikacije, ali izgleda da je njihova uloga donekle drugačija. Moguća uloga ovih domena je da svojom dužinom i sekvencom obezbede funkcionalnost drugih domena. Zamenom sekvence BEND regiona, na primer, dolazi do promene stukture i gubljenje funkcionalnosti celokupne *ori* sekvence DHFR lokusa [6].

Zanimljiva je i analiza stukture DNR regiona pri sniženoj pH vednosti. Iako na nefiziološkim uslovima, pri pH 5 DNR region zauzima drugačiju strukturu od one na neutralnom pH (Slika 20). Analizom ovog regiona utvdili smo da je promenjena struktura domena koji se nalaze u relativnoj blizini DNR regiona. Tačnu poziciju ovih jednolančanih regiona, međutim, nismo utvrdili. Nekanonske strukture (intramolekulski tripleks) i različite forme DNK (Z i B) su već nađene u ovom regionu topološki zatvorenom u plazmid kao i njihovo menjanja na različitim pH [33]. Na postojanje nekanonskih struktura u naizmeničnim purinsko-pirimidinskim sekvencama unutar superspiralizovanih plazmida je već ranije ukazano [86]. Iako sa promenom pH dolazi do promene strukture unutar i oko DNR regiona, AT bogati region zadržava strukturu koju smo detektovali pri neutralnom pH (nije prikazano). Ovo sugerise da sve strukture DNK nisu podjednako osetljive na promenu pH sredine. Ovi nalazi ipak mogu biti značajni, ako se uzme u obzir da variranje pH unutar ćelije može da predstavlja značajan

sistem prenosa signala [87]. Već je ukazano da je DNR svojom specifičnom strukturom Z zavojnice odgovoran za regulisanje progresije replikativne viljuške. Ukoliko bi lokalno variranje pH bilo efikasno i unutar jedra, mehanizam kontrole ekspresije i replikacije pojedinih regiona bi mogao biti dodatno objašnjen strukturnim promenama DNK regiona osetljivih na promene pH sredine. Ipak, sama činjenica da ova sekvenca može da zauzme različite forme, dopušta da i neki drugi faktori, kao što su inicijacioni proteini, transkripciona mašinerija ili jonska jačina, dovedu do nastajanja sličnih formi DNK.

Prethodnim istraživanjima pratili smo uticaj proteina HsOrc4 na linearne fragmente replikatora Lamin B2 [77] i DHFR (neobjavljeni rezultati), utvrdili da se ovaj protein vezuje za njih, hteli smo da ispitamo funkciju proteina na topološki zatvorenoj *ori* β DHFR sekvenci.

Pokušali smo klasičnim EMSA testom na agaroznom gelu da ispitamo sposobnost vezivanja proteina HsOrc4 za plazmid pMCD (Slika 22). Kašnjenje u migraciji u agaroznom gelu izazvano proteinom bilo je umereno na neutralnom pH, a dramatično na kiselom. Takođe je primećeno da HsOrc4 preferencijalno vezuje superspiralizovanu DNK (Slika 26). Ovo svojstvo nije novo, jer je već napomenuto da DmORC preferencijalno vezuje superspiralizovanu DNK [58]. Primetili smo takođe, da se u interakciji sa proteinom HsOrc4 pojavljuje i linearna forma plazmida. Nije jasno da li je ovo posledica delovanja samog proteina HsOrc4 ili je rezultat kontaminacije nukleazom upotrebljenom u ranim stadijumima prečišćavanja proteina.

Variranjem uslova vezivanja proteina, primetili smo da je kašnjenje plazmida na pH 5 znatno izraženije nego na pH 6 ili 7,5 (Slika 25). Veličinu nastalih protein-DNK kompleksa ovom metodom ne možemo da utvrdimo, ali možemo primetiti da migriraju sporije od 10 kb fragmenata u lestvici. Zanimljivo je da se pri

vezivanju proteina HsOrc4 za plazmid pMCD na pH 5, formiraju kompleksi velikih molekulskih masa, koji zaostaju u ležištima 0.8% agaroznog gela. Utvrdili smo da je za ovaj efekat odovoran protein, ali na koji način se formiraju kompleksi tih dimenzija ne možemo da objasnimo. Slična funkcija proteina HsOrc4 nije ranije primećena. Ako uporedimo molarni odnos vezanog proteina i plazmida (Tabele 5 i 6), primetićemo da je za vidljivi efekat kašnjenja plazmida ovaj odnos 5:1 u korist proteina pri kiselom pH 5 (Slika 24), a 30:1 puta na pH 7,5 (Slika 22). Istakli smo da je promenom pH moguća i promena stukture DNK, pa je moguće je da pri kiseloj pH vezivanje proteina i plazmida bude intenzivnije. Već smo pokazali da HsOrc4 vezuje trolančane strukture [77], pa je moguće da protein prepoznaje strukture plazmida nastale pri pH 5.

Činjenica da se protein HsOrc4, pod određenim uslovima, preferencijalno vezivao za superspiralizovanu DNK, navela nas je da ispitamo uticaj ovog proteina na superspiralizaciju plazmida koji je u sebi sadržao ukloniranu *ori* β sekvencu DHFR. Pošto su efekti proteina na topologiju plazmida reverzibilne prirode, upotrebili smo Topoizomerazu I. Ovaj enzim relaksira plazmid i čini da promene u topologiji plazmida budu zapamćene i nakon disocijacije proteina HsOrc4 sa plazmida. Uslovi pri kojima je vršena reakcija nisu bili optimalni za dejstvo Topoizomeraze I, jer smo hteli da istaknemo efekte dejstva proteina HsOrc4. Pokazali smo da je za efekat relaksacije potrebno istovremeno dejstvo, HsOrc4 i Topoizomeraze I (Slike 28, 30, 31). Naše pretpostavke su da protein HsOrc4 nakon vezivanja za superspiralizovanu formu, obavija oko sebe DNK, što pod dejstvom Topoizomeraze I rezultuje promenom distribucije topoizomera.

Ranije je uz pomoć AFM (eng. *Atomic force microscopy*) pokazano da Orc4 subjedinica *S. pombe* obavija DNK i na taj način uvodi topološke promene u plazmid [75], pa možemo pretpostaviti da se slično i ponaša subjedinica ljudskog ORC kompleksa. Kao i u slučaju naših eksperimenata, SpOrc4 nije bila u mogućnosti da samostalno, bez prisustva Topoizomeraze, uvede topološke

promene. Iako HsOrc4 pokazuje strukturnu homologiju sa SpOrc4 [74], očigledno je da funkcionalno liči na njega. Izvesno je da protein vezuje plazmid pMCD i učestvuje u remodelovanju njegove strukture, a nju je moguće detektovati upotrebom Topoizomeraze I. Sličnog stanovišta su i Gaczynska i saradnici, koji tvrde da SpORC ne raspliće strukturu DNK, već je za tu funkciju potrebna koordinacija sa drugim proteinima [75]. Čak je subjedinica 4 SpOrc pokazala veću sposobnost promene Lk broja u odnosu na celokupan kompleks.

Analizom na dvodimenzionalnoj elektroforezi uspeali smo u potpunosti da razdvojimo nastale topoizomere (Slika 29). Pokazali smo da su topoizomeri nastali zajedničkim dejstvom HsOrc4 i Topoizomeraze I blago pozitivno superspiralizovani, odnosno da je reč o veoma velikim strukturnim promenama, za čiju će kvantifikaciju, odnosno određivanje Lk broja, biti potrebna finija analiza.

Nakon što smo potvrdili da se HsOrc4 vezuje za plazmid i izaziva topološke promene u njemu, hteli smo da utvrdimo kako se te promene ispoljavaju na nivou funkcionalnih regiona. Za eksperimente smo izabrali AT bogati region koji pri neutralnom pH, ima alternativnu strukturu. Plazmid smo tretirali nukleazom MB, u prisustvu vezanog HsOrc4.

Kao što je prikazano na Slici 23, protein HsOrc4 ili prepoznaje AT bogati region i vezavši se za njega blokira pristup nukleaze MB, ili menja strukturu tog regiona i na taj način „uništava“ supstrat za nukleazu MB. Ako se plazmid tretira Topoizomerazom I u prisustvu HsOrc4, a zatim deproteinizuje i nakon toga tretira nukleazom MB, nekanonska struktura nestaje, što pokazuje da HsOrc4 menja strukturu ovog regiona.

Budući da HsOrc4 ima izražen afinitet za AT bogate sekvence veoma je verovatno da je njihovo delovanje lokalno, što ne možemo dokazati jer se u

cirkularnom plazmidu lokalne promene lako prenose na ceo molekul. Bez obzira na mehanizam delovanja, naši eksperimenti potvrđuju da HsOrc4 menja strukturu bar jednog funkcionalno značajnog regiona *ori* β DHFR.

6. ZAKLJUČCI

1. Detektovana je alternativna struktura u AT bogatom regionu unutar *ori* β sekvence DHFR na poziciji oko 3923 unutar plazmida pMCD. U okviru ove sekvence detektovani su jednolančani regioni na oba lanca DNK.
2. Analizom regiona DNR, BEND i RIP60 *ori* β sekvence DHFR unutar plazmida pMCD nisu detektovane alternativne strukture.
3. Analizom regiona DNR pri pH 5, detektovane su alternativne strukture koje nisu prisutne pri pH 7,5.
4. Utvrđeno je da se protein HsOrc4 preferencijalno vezuje za superspiralizovanu formu plazmida pMCD.
5. Protein HsOrc4 pokazuje veći afinitet vezivanja za plazmid pMCD pri pH 5 u odnosu na pH 6 ili 7,5.
6. Topološke promene u plazmidu pMCD od strane Topoizomeraze I zavise od prisustva proteina HsOrc4 i za posledicu imaju remodelovanje strukture u okviru AT bogatog regiona *ori* β sekvence DHFR.
7. Protein HsOrc4 u interakciji sa plazmidom pMCD ukida jednolačanu strukturu u AT bogatom regionu direktno se vezujući za njega ili to čini indirektno vezujući se za neki udaljeni region u okviru *ori* β sekvence DHFR.

7. LITERATURA

1. Bell, S.P. and A. Dutta, *DNA replication in eukaryotic cells*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 333-74.
2. Sasaki, T., et al., *Specification of regions of DNA replication initiation during embryogenesis in the 65-kilobase DNA α -dE2F locus of *Drosophila melanogaster**. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 547-55.
3. Jacob, F. and S. Brenner, [*On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon*]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 1963. **256**: p. 298-300.
4. Gilbert, D.M., *In search of the holy replicator*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(10): p. 848-55.
5. Aladjem, M.I., *Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans*. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(8): p. 588-600.
6. Altman, A.L. and E. Fanning, *Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4138-50.
7. Newlon, C.S. and J.F. Theis, *The structure and function of yeast ARS elements*. *Curr Opin Genet Dev*, 1993. **3**(5): p. 752-8.
8. Diffley, J.F. and J.H. Cocker, *Protein-DNA interactions at a yeast replication origin*. *Nature*, 1992. **357**(6374): p. 169-72.
9. Okuno, Y., et al., *Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6699-709.
10. Berezney, R., D.D. Dubey, and J.A. Huberman, *Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci*. *Chromosoma*, 2000. **108**(8): p. 471-84.
11. Lu, L., H. Zhang, and J. Tower, *Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for *Drosophila* chorion gene amplification*. *Genes Dev*, 2001. **15**(2): p. 134-46.

12. Aladjem, M.I., et al., *Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus*. *Science*, 1998. **281**(5379): p. 1005-9.
13. Paixao, S., et al., *Modular structure of the human lamin B2 replicator*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(7): p. 2958-67.
14. Dijkwel, P.A., S. Wang, and J.L. Hamlin, *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): p. 3053-65.
15. Dijkwel, P.A., et al., *Dispersive initiation of replication in the Chinese hamster rhodopsin locus*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 150-7.
16. Aladjem, M.I. and E. Fanning, *The replicon revisited: an old model learns new tricks in metazoan chromosomes*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(7): p. 686-91.
17. Machida, Y.J. and A. Dutta, *Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6253-6.
18. Mesner, L.D., et al., *The dihydrofolate reductase origin of replication does not contain any nonredundant genetic elements required for origin activity*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(3): p. 804-14.
19. Borowiec, J.A. and C.L. Schildkraut, *Open sesame: activating dormant replication origins in the mouse immunoglobulin heavy chain (Igh) locus*. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(3): p. 284-92.
20. Blow, J.J. and S. Tada, *Cell cycle. A new check on issuing the licence*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 560-1.
21. Delgado, S., et al., *Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes*. *EMBO J*, 1998. **17**(8): p. 2426-35.
22. Liu, J., et al., *Analysis of model replication origins in Drosophila reveals new aspects of the chromatin landscape and its relationship to origin activity and the prereplicative complex*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(1): p. 200-12.

23. Funanage, V.L. and T.T. Myoda, *Localization of Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to band p23 of chromosome 2*. *Somat Cell Mol Genet*, 1986. **12**(6): p. 649-55.
24. Ma, C., T.H. Leu, and J.L. Hamlin, *Multiple origins of replication in the dihydrofolate reductase amplicons of a methotrexate-resistant chinese hamster cell line*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(4): p. 1338-46.
25. Kobayashi, T., T. Rein, and M.L. DePamphilis, *Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(6): p. 3266-77.
26. Wang, S., P.A. Dijkwel, and J.L. Hamlin, *Lagging-strand, early-labelling, and two-dimensional gel assays suggest multiple potential initiation sites in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(1): p. 39-50.
27. Altman, A.L. and E. Fanning, *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): p. 1098-110.
28. Kalejta, R.F., et al., *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): p. 797-806.
29. Mesner, L.D. and J.L. Hamlin, *Specific signals at the 3' end of the DHFR gene define one boundary of the downstream origin of replication*. *Genes Dev*, 2005. **19**(9): p. 1053-66.
30. Saha, S., et al., *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**(4): p. 397-410.
31. Mesner, L.D., J.L. Hamlin, and P.A. Dijkwel, *The matrix attachment region in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication may be required for local chromatid separation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(6): p. 3281-6.

32. Li, C.J., et al., *Selective activation of pre-replication complexes in vitro at specific sites in mammalian nuclei*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 5)**: p. 887-98.
33. Bianchi, A., et al., *Sequences near the origin of replication of the DHFR locus of Chinese hamster ovary cells adopt left-handed Z-DNA and triplex structures*. J Biol Chem, 1990. **265(35)**: p. 21789-96.
34. Abdurashidova, G., et al., *Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin*. EMBO J, 1998. **17(10)**: p. 2961-9.
35. Bell, S.P. and B. Stillman, *ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex*. Nature, 1992. **357(6374)**: p. 128-34.
36. Spingola, M., et al., *Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in Saccharomyces cerevisiae*. RNA, 1999. **5(2)**: p. 221-34.
37. Duncker, B.P., I.N. Chesnokov, and B.J. McConkey, *The origin recognition complex protein family*. Genome Biol, 2009. **10(3)**: p. 214.
38. Dueber, E.L., et al., *Replication origin recognition and deformation by a heterodimeric archaeal Orc1 complex*. Science, 2007. **317(5842)**: p. 1210-3.
39. Iyer, L.M., et al., *Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases*. J Struct Biol, 2004. **146(1-2)**: p. 11-31.
40. Dhar, S.K. and A. Dutta, *Identification and characterization of the human ORC6 homolog*. J Biol Chem, 2000. **275(45)**: p. 34983-8.
41. Tugal, T., et al., *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)**: p. 32421-9.
42. Arias, E.E. and J.C. Walter, *Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells*. Genes Dev, 2007. **21(5)**: p. 497-518.
43. Diffley, J.F., et al., *Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo*. Cell, 1994. **78(2)**: p. 303-16.
44. Lee, D.G. and S.P. Bell, *Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication*. Mol Cell Biol, 1997. **17(12)**: p. 7159-68.

45. Machida, Y.J., J.L. Hamlin, and A. Dutta, *Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans*. *Cell*, 2005. **123**(1): p. 13-24.
46. Machida, Y.J., J.K. Teer, and A. Dutta, *Acute reduction of an origin recognition complex (ORC) subunit in human cells reveals a requirement of ORC for Cdk2 activation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(30): p. 27624-30.
47. Randell, J.C., et al., *Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase*. *Mol Cell*, 2006. **21**(1): p. 29-39.
48. Natale, D.A., et al., *Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals*. *EMBO J*, 2000. **19**(11): p. 2728-38.
49. DePamphilis, M.L., *The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication*. *Gene*, 2003. **310**: p. 1-15.
50. DePamphilis, M.L., *Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex*. *Cell Cycle*, 2005. **4**(1): p. 70-9.
51. Prasanth, S.G., K.V. Prasanth, and B. Stillman, *Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis*. *Science*, 2002. **297**(5583): p. 1026-31.
52. Chesnokov, I., D. Remus, and M. Botchan, *Functional analysis of mutant and wild-type Drosophila origin recognition complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(21): p. 11997-2002.
53. Dutta, A. and S.P. Bell, *Initiation of DNA replication in eukaryotic cells*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1997. **13**: p. 293-332.
54. Chuang, R.Y. and T.J. Kelly, *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): p. 2656-61.
55. Kong, D. and M.L. DePamphilis, *Site-specific DNA binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(23): p. 8095-103.

56. Aladjem, M.I., *The mammalian beta globin origin of DNA replication*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2540-7.
57. Vashee, S., et al., *Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1894-908.
58. Remus, D., E.L. Beall, and M.R. Botchan, *DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for Drosophila ORC-DNA binding*. EMBO J, 2004. **23**(4): p. 897-907.
59. Pak, D.T., et al., *Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes*. Cell, 1997. **91**(3): p. 311-23.
60. Liu, S., et al., *Structural analysis of human Orc6 protein reveals a homology with transcription factor TFIIB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(18): p. 7373-8.
61. MacAlpine, H.K., et al., *Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading*. Genome Res, 2010. **20**(2): p. 201-11.
62. Dhar, S.K., L. Delmolino, and A. Dutta, *Architecture of the human origin recognition complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29067-71.
63. Siddiqui, K. and B. Stillman, *ATP-dependent assembly of the human origin recognition complex*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32370-83.
64. Ohta, S., et al., *The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41535-40.
65. Matheos, D., et al., *Ku antigen, an origin-specific binding protein that associates with replication proteins, is required for mammalian DNA replication*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1578**(1-3): p. 59-72.
66. Sibani, S., G.B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos, *Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex*. Biochemistry, 2005. **44**(21): p. 7885-96.
67. Lee, K.Y., et al., *Phosphorylation of ORC2 protein dissociates origin recognition complex from chromatin and replication origins*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11891-8.

68. Shen, Z., et al., *A WD-repeat protein stabilizes ORC binding to chromatin*. Mol Cell, 2010. **40**(1): p. 99-111.
69. Thomae, A.W., et al., *Different roles of the human Orc6 protein in the replication initiation process*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(22): p. 3741-56.
70. Balasov, M., R.P. Huijbregts, and I. Chesnokov, *Functional analysis of an Orc6 mutant in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(26): p. 10672-7.
71. Giordano-Coltart, J., et al., *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): p. 69-74.
72. Stefanovic, D., et al., *In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42737-43.
73. Lubelsky, Y., et al., *Pre-replication complex proteins assemble at regions of low nucleosome occupancy within the Chinese hamster dihydrofolate reductase initiation zone*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(8): p. 3141-55.
74. Quintana, D.G., et al., *Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28247-51.
75. Gaczynska, M., et al., *Atomic force microscopic analysis of the binding of the Schizosaccharomyces pombe origin recognition complex and the spOrc4 protein with origin DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 17952-7.
76. Stefanovic, D., et al., *Formation of noncanonical DNA structures mediated by human ORC4, a protein component of the origin recognition complex*. Biochemistry, 2008. **47**(33): p. 8760-7.
77. Kusic, J., et al., *Human initiation protein Orc4 prefers triple stranded DNA*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(5): p. 2317-22.
78. Guernsey, D.L., et al., *Mutations in origin recognition complex gene ORC4 cause Meier-Gorlin syndrome*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 360-4.
79. Bicknell, L.S., et al., *Mutations in the pre-replication complex cause Meier-Gorlin syndrome*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 356-9.
80. Andrew Bates, A.M., *DNA topology*. 2005.

81. Sambrook, J., Fritsch EF, Maniatis T. , *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989.
82. Grainge, I., et al., *Biochemical analysis of a DNA replication origin in the archaeon *Aeropyrum pernix**. J Mol Biol, 2006. **363**(2): p. 355-69.
83. Aris, S.M., et al., *Promotion of DNA strand breaks, interstrand cross-links and apoptotic cell death in A2780 human ovarian cancer cells by transplatinum planar amine complexes*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(11): p. 1749-57.
84. Lusser, A. and J.T. Kadonaga, *Strategies for the reconstitution of chromatin*. Nat Methods, 2004. **1**(1): p. 19-26.
85. Olavarrieta, L., et al., *Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(3): p. 656-66.
86. Shimizu, M., J.C. Hanvey, and R.D. Wells, *Intramolecular DNA triplexes in supercoiled plasmids. I. Effect of loop size on formation and stability*. J Biol Chem, 1989. **264**(10): p. 5944-9.
87. Orij, R., S. Brul, and G.J. Smits, *Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1810**(10): p. 933-44.

BIOGRAFIJA

Branko Tomić je rođen 21. oktobra 1980. godine u Beogradu. Diplomirao je na smeru Molekularna biologija i fiziologija, izborna oblast Eksperimentalna biomedicina Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2005. godine. Od 2005. godine je zaposlen u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu. Ima devet kongresnih saopštenja i objavljene sledeće radove:

1. Nikolic A, Divac A, Stankovic M, Dinic J, **Tomic B**, Lujic M (2006) Analysis of common CFTR polymorphisms 5T, M470V, and R75Q in healthy Serbian population *Russ J Genet* 42(7): 821-823
2. Stefanovic D, Kusic J, Divac A, **Tomic B** (2008) Formation of noncanonical DNA structures mediated by human ORC4, a protein component of the origin recognition complex *Biochemistry* 47(33):8760-8767
3. Radojkovic M, Ristic S, Divac A, **Tomic B**, Nestorovic A, Radojkovic D (2009) Novel ORC4L gene mutation in B-cell lymphoproliferative disorders – a report of 3 cases *Am J Med Sci* 338(6):527-529
4. Divac A, **Tomic B**, Kusic J (2010) The role of ATP in human ORC4 protein function *Journal of the Serbian Chemical Society* 75(3):317-322
5. Kusic J, **Tomic B**, Divac A, Kojic S. Human initiation protein Orc4 prefers triple stranded DNA. *Mol Biol Rep* (2010) 37: 2317-2322

Tokom svog rada bio je uključen u četiri nacionalna i tri međunarodna projekta.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бранко В. Томић

број индекса io 060037

Изјављујем

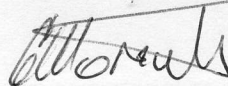
да је докторска дисертација под насловом

**Структура тополошки затворене *ori* секвенце
дихидрофолатредуктазног локуса у интеракцији са иницијационим
протеином ORC**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.06.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранко В. Томић

Број индекса io 060037

Студијски програм молекуларна биологија

Наслов рада **Структура тополошки затворене *ori* секвенце
дихидрофолатредуктазног локуса у интеракцији са иницијационим
протеином ORC**

Ментор др Јелена Кушић-Тишма и др Горан Брајушковић

Потписани Бранко В. Томић


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 26.06.2012.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структура тополошки затворене *ori* секвенце дихидрофолатредуктазног локуса у интеракцији са иницијационим протеином ORC

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.06.2012.

