

PA 19041

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET  
11000 BEOGRAD

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

# Interakcija inicijacionog proteina ORC sa replikatorom regiona lamin B2

DOKTORSKI RAD



Jelena Kušić

Beograd, 2005

ПРОСТОЈАР МАРКОВИЋ БЕОГРАД  
И. Бр. 141613

UNIVERSITETSKA BIBLIOTEKA  
BEOGRAD

UNIVERSITETSKA BIBLIOTEKA  
BEOGRAD



Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, pod rukovodstvom dr Dragane Stefanović.

Najtoplije se zahvaljujem dr Dragani Stefanović, koja me je uvela u svet replikacije, na ukazanom poverenju i velikoj pomoći prilikom rešavanja teorijskih i eksperimentalnih problema, kao i na savetima i strpljenju tokom pisanja ovog rada.

Profesorki dr Ani Savić se zahvaljujem na interesovanju, korisnim sugestijama i kritičkoj oceni rada, kao i za sve savete i ohrabrenja tokom proteklih godina.

Dr Snežani Kojić, koja je započela rad na hemijskim esejima, zahvaljujem se za antitelo na HsOrc4, pomoć tokom eksperimentalnog rada i podršku pri pisanju teze.

Mr Aleksandri Divac hvala za nesebičnu pomoć u eksperimentalnom radu.

Kolegama iz laboratorije - Dadi, Ljilji, Alex, Vanji, Maki, Branku, Jeleni i Mili puno hvala za ustupanje kompijutera, pipeta, rastvora i gelova, na prijateljstvu i razumevanju koje mi je mnogo značilo.

Zahvaljujem se biljkašima na pomoći prilikom savladavanja rada sa bakterijama, kao i ostalim članovima IMGGI koji su mi, na bilo koji način, pomogli da se ovaj rad realizuje.

Dr Gordani Matić i dr Stanki Romac se zahvaljujem na kritičkoj oceni ovog rada.

## SKRAČENICE

ACE - Amplification Control Element  
ACS - ARS Consensus Sequence  
AER - Amplification Enhancing Region  
ARS - Autonomously Replicating Sequence  
CDC - Cell Division Cycle  
CDK - Cyclin Dependent Kinase  
DEPC - Diethylpyrocarbonate  
DHFR - Dihydrofolate reductase  
DMS - Dimethylsulfate  
DUE - DNA Unwinding Element  
GRI - Glide Reflection Images  
lboI - Lamin B2 Origin (3813-4052)  
lboII - Lamin B2 Origin (3871-4187)  
MCM - Mini Chromosome Maintenance  
MRI - Mirror Reflection Images  
ORC - Origin Recognition Complex  
OsO<sub>4</sub> - Osmium Tetraoxide  
PBS - Phosphate Buffer Saline  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
preRC - preReplication Complex  
Pu - Purine  
Py - Pyrimidine

## ABSTRACT

In complex eukaryotes DNA replication is initiated by binding of origin recognition complexes (ORCs) to specific genomic sites called origins of replication. Consensus sequence required for this event and the mechanism by which ORC is localized to origins of replication remain poorly understood. General features of genomic regions involved in initiator protein binding are AT-richness and frequent occurrence of short (dA)·(dT) runs. Such distribution of A and T residues opens a possibility that origins of replication build mutually equivalent unorthodox structures which are recognised by initiation protein.

In order to test this hypothesis, a study of structure and shape of the human lamin B2 origin was performed. DNA binding activity of protein HsOrc4, one of ORC's subunits that exhibited similar DNA binding properties as the whole complex, was also tested. It was shown that, at neutral pH, low or moderate ionic strength and in presence of  $Mg^{2+}$  ions, lamin B2 origin adopted alternative helical form, characterized by a single unpaired region and faster migration in native polyacrylamide gels. It was proposed that these properties reflected the ability of origin DNA to form double stranded loop with intramolecular triplex in its base. Triplex was kept together by Hoogsteen hydrogen bonding between central pyrimidines of unpaired region and complementary double stranded sequence. Since intramolecular noncanonical structure formed in origin sequences protected by ORC *in vivo* and *in vitro*, it could represent the element responsible for site-specific ORC binding. In order to test this notion, binding specificity of HsOrc4 was tested in direct and competition DNA binding experiments. The protein did not recognize (dA) or (dA)·(dT), but it exhibited very low affinity for (dT) and a very high affinity for TAT triplex. Consistent with that, triple stranded DNA competed very well with origin DNA for HsOrc4 binding, whereas single or double stranded DNA exhibited much less significant competitive effect. As judged by its competitive efficiency, triple stranded DNA was very similar to naturally occurring DNA binding sites of HsOrc4.

In conclusion, formation of intramolecular triplex within origin DNA and its specific recognition by HsOrc4 suggest that triple stranded structure might play a role in selection of eukaryotic origins of replication.

## APSTRAKT

Inicijacija replikacije DNK kod eukariota započinje vezivanjem proteinskog kompleksa ORC za diskretna mesta u genomu nazvana ori-sekvence ili *ori*. Specifične sekvence odgovorne za prepoznavanje i vezivanje kompleksa ORC, kao i mehanizam kojim ORC selektuje ori-sekvence još uvek nisu poznati. Jedna od malobrojnih zajedničkih karakteristika mesta uključenih u vezivanje inicijacionog proteina jeste visok sadržaj AT bp i kratkih nizova (dA)·(dT) što ukazuje na mogućnost da ori-sekvence obrazuju sinonimne strukture koje određuju specifičnost vezivanja inicijacionog proteina.

Radi testiranja ove pretpostavke, analizirana je struktura i oblik humane ori-sekvence lamin B2 i detaljno ispitana DNK vezivna specifičnost proteina HsOrc4. Ovaj protein predstavlja jednu od subjedinica kompleksa ORC i pokazuje istu DNK-vezivnu aktivnost kao i kompleks ORC. Utvrđeno je da ori-sekvencija, pod uslovima neutralnog pH, niske ili umerene jonske jačine i u prisustvu jona  $Mg^{2+}$  zauzima alternativnu formu koju karakteriše prisustvo denaturisanog regiona, okceta, i povećana elektroforetska pokretljivost u nativnoj PAGE. Stabilno prisustvo denaturisanog regiona u okviru fragmenta DNK omogućeno je formiranjem Hoogsteen-ovih vodoničnih veza između centralnih pirimidina okceta i adenina jednog od kratkih nizova (dA)·(dT). Kao rezultat ove interakcije nastaje dvolančana petlja koja u osnovi sadrži intramolekulski tripleks. Struktura intramolekulskog tripleksa formira se u regionu koji interaguje sa inicijacionim proteinom i može predstavljati jedan od elemenata odgovornih za prepoznavanje i vezivanje ovog proteina. U eksperimentima direktnog vezivanja proteina HsOrc4 utvrđeno je da on ne prepoznaje kratke nizove (dA)·(dT) i (dA), dok se za (dT) slabo vezuje. Najveći afinitet protein je pokazivao za trolančane strukture tipa TAT. Kompeticija jedno-, dvo- i trolančanih molekula DNK vezivanju HsOrc4 za ori-sekvencu pokazala je da protein razlikuje trolančanu strukturu od jedno- i dvolančane i specifično se vezuje za nju. Sudeći po efikasnosti kompeticije, trolančana DNK bila je veoma slična prirodnim vezivnim mestima proteina HsOrc4.

Svojstvo ori-sekvence da formira intramolekulski tripleks i specifično vezivanje proteina HsOrc4 za tripleks sugerira da trolančana struktura može predstavljati deo mehanizma kojim inicijacioni protein prepoznaje i selektuje mesta inicijacije replikacije.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Mehanizam i regulacija inicijacije replikacije DNK eukariota.....	1
1.1.1. Inicijacija replikacije kod eukariota .....	3
1.1.2. Regulacija inicijacije replikacije I: sprečavanje reinicijacije u toku jedne S faze.....	4
1.1.3. Regulacija inicijacije replikacije II: selekcija ori-sekvenci .....	6
1.2. Protein-DNK interakcije uključene u selekciju <i>ori</i> .....	9
1.2.1. Struktura i funkcija kompleksa ORC .....	9
1.2.1.1. DNK vezivna svojstva kompleksa ORC .....	12
1.2.2. Struktura i funkcija ori-sekvenci eukariota.....	14
1.2.2.1. Ori-sekvence jednoćelijskih eukariota .....	14
1.2.2.2. Ori-sekvence metazoa .....	16
1.2.2.2.1. Ori-sekvence sisara .....	17
1.2.2.2.1.1. Ori-sekvencija lamin B2 .....	19
1.3. Alternativne strukture DNK.....	21
1.3.1. Trolančana DNK .....	22
1.3.2. Intramolekulske trolančane strukture <i>in vivo</i> i njihova biološka uloga.....	25
2. CILJ RADA .....	27
3. MATERIJAL I METODE .....	29
3.1. Izolovanje genomske DNK.....	29
3.2. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR).....	29
3.3. Elektroforeza DNK u poliakrilamidnom gelu .....	30
3.4. Izolovanje fragmenata DNK iz poliakrilamidnog gela .....	30
3.5. Obeležavanje DNK radioaktivnim izotopom <sup>32</sup> P.....	30
3.6. Reakcije sa hemijskim agensima specifičnim za neortodoksne strukture DNK..	31
3.6.1. Modifikacija DNK dietilpirokarbonatom (DEPC).....	31
3.6.2. Modifikacija DNK osmijumtetraoksidom (OsO <sub>4</sub> ) .....	32
3.6.3. Sekvenciranje DNK metodom Maxam-Gilbert-a .....	32
3.6.4. Tretman DNK piperidinom.....	32
3.7. Hidroliza DNK Dezoksiribonukleazom I (DNaza I).....	33
3.8. Analiza pokretljivosti DNK fragmenata u nativnom poliakrilamidnom gelu .....	33
3.9. Hibridizacija fragmenta IboI sa jednolančanim oligonukleotidima .....	34

3.9.1. Hibridizacija sa oligonukleotidima Hy.....	34
3.9.2. Hibridizacija sa poli(dT) <sub>40</sub> oligonukleotidom .....	35
3.10. Formiranje trolančanih molekula DNK .....	35
3.10.1. Formiranje kratkih trolančanih molekula DNK .....	35
3.10.2. Formiranje dugih trolančanih molekula DNK .....	36
3.11. Izolovanje rekombinantnog proteina HsOrc4 .....	37
3.11.1. Indukcija ekspresije rekombinantnog proteina HsOrc4 .....	37
3.11.2. Prečišćavanje rekombinantnog proteina HsOrc4 .....	38
3.12. Elektroforeza proteina .....	39
3.13. Prenos proteina na membranu .....	39
3.14. Western blot analiza .....	39
3.15. Ispitivanje interakcije proteina i DNK.....	40
3.15.1. Vezivanje proteina HsOrc4 za DNK .....	40
3.15.2. Vezivanje antitela na protein HsOrc4 za DNK .....	42
3.16. "Supershift" esej .....	42
4. REZULTATI.....	44
4.1. Ispitivanje strukture i oblika ori-sekvence lamin B2 .....	44
4.1.1. Detekcija alternativnih struktura DEPC-om, OsO <sub>4</sub> -om i DNazom I .....	45
4.1.2. Analiza pokretljivosti u poliakrilamidnom gelu .....	51
4.1.3. Ispitivanje pretpostavljenih modela strukture <i>ori</i> lamin B2 .....	53
4.2. Interakcija proteina HsOrc4 sa trolančanom DNK .....	59
4.2.1. Izolovanje proteina HsOrc4 .....	59
4.2.2. Formiranje trolančanih struktura.....	60
4.2.3. DNK vezivna aktivnost proteina HsOrc4.....	62
4.3. Analiza vezivne specifičnosti antitela na protein HsOrc4.....	65
4.3.1. Interakcija antitela sa proteinom HsOrc4 .....	65
4.3.2. Interakcija antitela sa DNK.....	67
5. DISKUSIJA .....	72
6. ZAKLJUČCI.....	79
7. LITERATURA.....	80



## 1. UVOD

Replikacija DNK je proces kojim ćelije prenose genetičku informaciju iz generacije u generaciju. Osnovne karakteristike ovog procesa zajedničke su za sva živa bića. Udvajanje DNK započinje delimičnom denaturacijom dvolančane zavojnice na određenim mestima u genomu. Sinteza novih lanaca DNK je semikonzervativna i odvija se u oba smera počevši od specifičnih struktura nazvanih replikaciona okca (replication bubbles) od kojih polaze suprotno orijentisane replikacione viljuške (replication forks). DNK polimeraza ugrađuje nove nukleotide u 5'→ 3' smeru, tako da sinteza DNK na jednom lancu napreduje na kontinuirani način (vodeći lanac) dok se na njemu komplementarnom lancu odvija na diskontinuirani način (zaostajući lanac).

Celokupan genom mora biti replikovano tačno i samo jednom tokom ćelijskog ciklusa (Harland and Laskey, 1980). DNK se ne replikuje ukoliko je ćelija u stanju mirovanja ili nije spremna za deobu, a posle replikacije ćelija mora proći kroz mitozu kako bi se održala plovidija organizma. Ovi primeri pokazuju da je svaka etapa replikacije DNK, od inicijacije do terminacije, usklađena sa drugim procesima u okviru ćelijskog ciklusa i regulisana istim osnovnim mehanizmom kao i rast i deoba ćelije. Iako je precizna kontrola celokupnog procesa replikacije od vitalnog značaja za ćeliju, najznačajniji regulatorni mehanizmi operišu na nivou inicijacije sinteze DNK.

### 1.1. Mehanizam i regulacija inicijacije replikacije DNK eukariota

Inicijacija replikacije prokariotske DNK odvija se po modelu replikona (Jacob et al., 1963). Po ovom modelu, replikacija započinje kada poseban protein, nazvan inicijator, prepozna i veže genetički definisanu sekvencu DNK, nazvanu replikator. Jedinica DNK koja se replikuje nakon vezivanja inicijatora za replikator nazvana je replikon.

Model replikona još uvek nije potvrđen kod eukariota. Veliki eukariotski genomi organizovani su u linearne hromozome duž kojih sinteza DNK započinje na velikom broju mesta (*ori*-sekvence ili *ori*) i u različitim momentima tokom jedne S faze (Rivin and Fangman, 1980). Aktivacija *ori*-sekvenci precizno je regulisana i dešava se po tačno određenom redosledu. Kod višćelijskih organizama trajanje ćelijskog ciklusa, a



samim tim i S faze, značajno varira u zavisnosti od razvojnog stupnja organizma. Uprkos tome, DNK se tačno i efikasno replikuje, zahvaljujući aktivaciji većeg ili manjeg broja ori-sekvenci (Edenberg and Huberman, 1975). Lokalizacija *ori* nije nasumična već je zajednički određuju sekvenca DNK, hromatinska struktura i lokalna hromozomska arhitektura uspostavljajući vezivno mesto za inicijacioni proteinski kompleks koji označava *ori*. Na ovaj kompleks se potom regrutuje replizom, multienzimska struktura odgovorna za sintezu DNK.

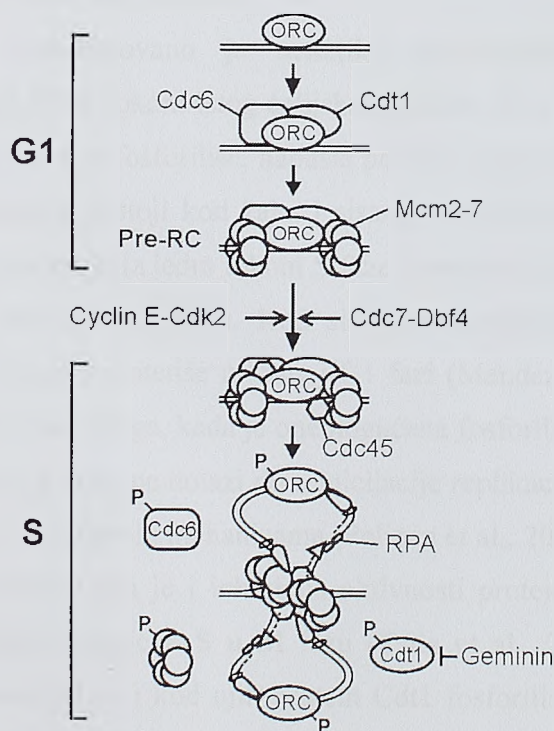
Proteini replizoma visoko su konzervisani od kvasaca do sisara. Da bi replikacija započela, neophodno je da se za DNK veže šestočlani proteinski kompleks ORC (Origin Recognition Complex) čiji su homologoni detektovani kod svih do sada ispitivanih eukariota. Molekuli ORC-a vezuju se za ori-sekvence i predstavljaju temelj replizoma. Budući da direktno interaguje sa DNK i dovodi polimerazu DNK na mesta inicijacije, ORC se smatra univerzalnim eukariotskim inicijatorom (Bell and Dutta, 2002).

Paralelno sa izučavanjem inicijacionog kompleksa sprovedene su i studije elemenata DNK odgovornih za inicijaciju replikacije kod eukariota. Ovi elementi, detektovani fizičkim mapiranjem hromozomskih mesta na kojima otpočinje sinteza DNK, nazvani su ori-sekvence ili *ori* (origins of replication). Termin *ori* označava kako mesto gde replikacija započinje tako i okolne sekvence koje stimulišu inicijaciju replikacije, ali se u praksi odnosi na region DNK izolovan određenom metodom mapiranja ori-sekvenci. Zavisno od rezolucije konkretne metode ovaj region sadrži, osim funkcionalno relevantnih elemenata, i dobar deo DNK irelevantne za inicijaciju replikacije. Detaljnom analizom identifikovanih *ori* ustanovljeno je da njihova veličina i sekvenca značajno variraju između različitih eukariotskih organizama i da ne poseduju očigledne konsenzusne elemente koji bi bili odgovorni za istovetnu funkciju.

Naizgled paradoksalna situacija u kojoj evolutivno konzervisani inicijacioni kompleks interaguje sa mnoštvom različitih sekvenci nije u skladu sa modelom replikona po kome specifična interakcija između inicijacionog proteina i genetički definisanog elementa DNK obezbeđuje selektivnost i naslednost procesa inicijacije. Priroda interakcije inicijacionog proteina i DNK, kao i mehanizam odgovoran za selekciju ori-sekvenci eukariota predmet su intenzivnih studija na različitim model sistemima, a jednu od njih čini i ovaj rad.

### 1.1.1. Inicijacija replikacije kod eukariota

Inicijaciji replikacije DNK prethodi formiranje specifičnih proteinskih kompleksa na ori-sekvencama. Ovaj proces se sastoji iz dva koraka – formiranja prereplikativnog kompleksa (preRC) kojim su označene sve potencijalno aktivne ori-sekvence (licensing of origins) i određivanja samo onih ori-sekvenci koje će biti aktivirane u nastupajućoj S fazi (origin specification) (Mendez and Stillman, 2003). Formiranje preRC odigrava se tokom kasne M ili rane G1 faze i započinje vezivanjem kompleksa ORC za ori sekvence, a nastavlja se urednim vezivanjem brojnih replikacionih faktora (slika 1.1.). Prvi u nizu, proteini Cdc6 i Cdt1, vezuju se za *ori* na ORC zavisan način, a potom kooperativno regrutuju proteinski kompleks MCM, čime je formiranje preRC završeno. Šestočlani proteinski kompleks MCM (Mcm2-Mcm7) ima helikaznu funkciju i odvija parentalne lance DNK. Verovatno postoji jedan kompleks MCM po replikacionoj viljušci, mada je moguće da ih ima i više.



Slika 1.1. Formiranje i aktivacija prereplikacionog kompleksa

Kada se jednom formira pre-replikativni kompleks, ori-sekvence su označene i spremne da se aktiviraju. Aktivacija ori-sekvenci vrši se u različitim momentima tokom S faze i zahteva funkciju proteinskih kinaza zavisnih od ciklina, kao i

proteinske kinaze Cdc7, zavisne od proteina Dbf4. Aktivacija preRC započinje otpuštanjem proteina Cdc6 iz kompleksa koji biva zamenjen proteinom Cdc45. Zamena se dešava uz pomoć proteinske kinaze Cdc7, zavisne od Dbf4, i proteinske kinaze zavisne od ciklina E (Zou and Stillman, 1998). Smatra se da kompleks ciklin-Cdk funkcioniše kao globalni aktivator S faze, dok kompleks Dbf4-Cdc7 predstavlja aktivator inicijacije na individualnim ori-sekvencama. Po vezivanju proteina Cdc45 za preRC, na *ori* se regrutuju proteini RPA i polimeraza  $\alpha$  čiji je integralni deo i primaza koja započinje sintezu DNK (DePamphilis, 2003a).

#### 1.1.2. Regulacija inicijacije replikacije I: sprečavanje reinicijacije u toku jedne S faze

Svaka ori-sequenca može biti aktivirana samo jednom po ćelijskom ciklusu. Ponovna aktivacija iste ori-sekvence bez deobe ćelije prouzrokovala bi nesrazmerno umnožavanje nekih sekvenci u odnosu na druge ili prisustvo replikacione viljuške u mitozu, što bi ugrozilo stabilnost genoma.

Kod eukariota identifikovano je nekoliko mehanizama koji sprečavaju reinicijaciju replikacije DNK tokom istog ćelijskog ciklusa. Kod kvasaca, kada ćelije uđu u S fazu, protein Cdc6 se fosforiliše, napušta preRC i degraduje se (Weinreich et al., 2001). Isti mehanizam postoji kod žaba i sisara, sa razlikom što se kod sisara fosforilisani Cdc6 transportuje iz jedra tokom S faze i ostaje u citoplazmi tokom G2 i M faze (Delmolino and Dutta, 2001). Kod sisara na prelasku iz M u G1 fazu degraduje se Cdc6 i *de novo* sintetiše u kasnoj G1 fazi (Mendez and Stillman 2000, Petersen et al., 2000). I pored toga, kada je onemogućena fosforilacija proteina Cdc6 i on ostaje u jedru tokom S faze, ne dolazi do reinicijacije replikacije DNK što ukazuje na postojanje i drugih regulatornih mehanizama (Pelizon et al., 2000).

Jedan od ovih mehanizama je i inhibicija aktivnosti proteina Cdt1 gemininom koji se proizvodi tokom tranzicije S u M fazu (Tada et al., 2001). Geminin nije detektovan kod kvasaca, ali se i kod njih protein Cdt1 fosforiliše i napušta nukleus tokom S faze (Tanaka and Diffley, 2002). Inaktivacija proteina Cdc6 i Cdt1 sprečava ponovno vezivanje kompleksa MCM za ORC na hromatinu. Kompleks MCM napušta hromatin tokom S faze, a smatra se da je ovaj mehanizam indukovano terminacijom, na mestu na kome se susreću replikacione viljuške susednih replikona. Kod pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) fosforilisani proteini Mcm se eksportuju iz jedra tokom prelaska G2 u M fazu, što obezbeđuje dodatnu barijeru reinicijaciji (Nguyen et

al., 2000). Kod pivskog kvasca (*Schizosaccharomyces pombe*), kao i kod metazoa, proteini Mcm ostaju u jedru ali se njihov afinitet za hromatin značajno smanjuje (Lei and Tye, 2001).

U sprečavanju ponovne inicijacije replikacije, pored onemogućavanja proteina Cdc6, Cdt1 i Mcm da formiraju prereplikativni kompleks, smatra se da ulogu ima i regulacija aktivnosti kompleksa ORC. Promene u asocijaciji subjedinica kompleksa ORC tokom ćelijskog ciklusa i vezanost pojedinačnih subjedinica za hromatin nazivaju se ORC ciklus. Ovaj ciklus se menja tokom razvića i razlikuje se između organizama. ORC ciklus prvi put je primećen u sisarskoj ćeliji gde se subjedinica Orc1 uklanja sa hromatina tokom S faze i ponovo vezuje pri prelasku ćelije iz M u G1 fazu (Li and DePamphilis 2002). Pošto je svih 6 subjedinica potrebno za aktivnost kompleksa ORC, napuštanje subjedinice Orc1 sprečava funkcionisanje kompleksa. U prilog ovom ide i činjenica da kod sisara hromatin u metafazi ne sadrži funkcionalni kompleks ORC (Natale et al., 2000). U eksperimentima sa ekstraktima jajnih ćelija žabe (*Xenopus laevis*) pokazano je da ciklus asocijacije kompleksa XIORC sa hromatinom zavisi od strukture hromatina. Kada se ekstraktima doda hromatin sisarske somatske ćelije, XIORC se vezuje za njega i regrutuje ostale proteine potrebne u inicijaciji replikacije, ali po otpočinjanju samog procesa sinteze ne ostaje vezan za hromatin. Sa druge strane, prilikom inkubacije hromatina sperme žabe u istim ekstraktima, kompleks XIORC ostaje vezan za hromatin tokom replikacije DNK (Rowles et al., 1999). Kod *S. cerevisiae*, kod koga svih 6 subjedinica kompleksa ORC ostaje stabilno vezano za hromatin tokom ćelijskog ciklusa funkcionalnost kompleksa regulisana je fosforilacijom subjedinica (Nguyen et al., 2001).

Po formiranju aktivnog preRC, izostanak pojedinih subjedinica iz kompleksa ORC ne ometa dalje procese u replikaciji DNK. Iz ovog razloga, regulacija asocijacije kompleksa ORC sa hromatinom je mogući mehanizam sprečavanja reinicijacije replikacije tokom S faze, bez uticaja na samu sintezu DNK. Da li se subkompleks ili kompletan kompleks ORC vezuje za novosintetisane ori-sekvence tokom S faze nije poznato, ali u ekstraktima jaja žabe kompleks ORC ne može ponovno da se veže za hromatin dok ne započne naredni ćelijski ciklus (DePamphilis, 2003b).

Iz podataka navedenih u ovom odeljku očigledno je da prolazak replikacione viljuške pokreće višestruke mehanizme koji obezbeđuju da se svaka ori-sekvencija koristi samo jednom tokom iste S faze. Da bi duplikacija genoma bila korektna i verna, potrebno je da opisanoj grupi mehanizama prethode drugi koji obezbeđuju da

razmak između aktivnih ori-sekvenci bude takav da se svaki deo genoma replikuje u toku iste S faze.

### 1.1.3. Regulacija inicijacije replikacije II: selekcija ori-sekvenci

Mesta inicijacije replikacije DNK prostiru se duž celog eukariotskog genoma. Aktivacija većeg ili manjeg broja ori-sekvenci obezbeđuje da se isti genom replikuje za nekoliko minuta (rani embrioni *Xenopus*-a i *Drosophila*-e) ili nekoliko časova (kasniji stupnjevi razvića), bez promene osnovnog mehanizma sinteze DNK. Ori-sekvence aktivne u somatskim ćelijama nalaze se u fiksnim hromozomskim regionima i nasleđuju se iz generacije u generaciju. Takođe zadržavaju aktivnost i na ektopičnim hromozomskim lokacijama i imaju modularnu strukturu koja dopušta razmenu strukturnih elemenata između različitih *ori*. Ovi podaci pokazuju da su mesta inicijacije aktivna u somatskim ćelijama eukariota genetički determinisana. Međutim, iako je jasno da neka mesta stalno funkcionišu kao ori-sekvence u većini eukariotskih ćelija, mehanizam koji selektuje ova mesta i sekvence koje uslovljavaju njihovu funkcionalnost nisu poznati.

Mehanizam selekcije ori-sekvenci uspostavlja se tokom razvića. U ranim embrionima *Xenopus*-a i *Drosophila*-e, za koje je karakteristična veoma kratka S faza, replikacija DNK započinje nasumično, na mestima čije međusobno rastojanje u proseku iznosi 5-10 kb. U kasnijim fazama razvića, i otprilike istovremeno sa početkom ekspresije zigotnih gena i drastičnom promenom strukture hromatina, broj mesta inicijacije se smanjuje i uspostavlja se obrazac karakterističan za somatsku ćeliju.

Kao što je već pomenuto, samo sekvence na kojima je formiran preRC mogu biti aktivne u inicijaciji. Prvi korak u formiranju preRC jeste vezivanje kompleksa ORC za DNK iz čega sledi da od specifičnosti ove interakcije zavisi i izbor mesta na kojima će započeti replikacija DNK. U skladu s tim, nasumična inicijacija replikacije u ranim embrionima može biti posledica visoke koncentracije, i otud, smanjene vezivne specifičnosti kompleksa ORC (Walter and Newport 1997) ili neke biohemijske modifikacije istog kompleksa, karakteristične za rani stupanj embrionalnih razvića. U oba slučaja rezultat bi bila relaksirana DNK vezivna specifičnost ORC-a i nasumična inicijacija. Poznato je da se tokom razvića količina ORC-a po ćeliji smanjuje, pa je, shodno tome pretpostavljeno, da u kasnijim fazama razvića ima dovoljno molekula

ORC-a da zasiti samo najspecifičnija vezivna mesta, usled čega se uspostavlja obrazac inicijacije karakterističan za somatsku ćeliju. Iako je ovo objašnjenje, kao i brojni drugi podaci u skladu sa modelom replikona (Depamphilis, 1999; Altman and Fanning, 2001; Lu et al., 2001; Bell and Dutta, 2002; Kong and DePamphilis, 2002), osim kratke ori-sekvence (~0,1 kb) pekarskog kvasca, nije identifikovana nijedna konsenzusna sekvenca odgovorna za vezivanje ORC-a i neophodna za replikaciju. Budući da su kod pekarskog kvasca sve faze inicijacije dobro proučene, on je iskorišćen i za izučavanje dodatnih mehanizama koji utiču na selekciju ori-sekvenci u živoj ćeliji.

U *S. cerevisiae* ori-sekvence prvobitno su detektovane kao elementi koji omogućavaju autonomnu replikaciju plazmida u koje su ugrađene (ARS – Autonomously Replicating Sequences), a potom je pokazano da iste sekvence interaguju sa ORC-om u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Analizom elemenata ARS u genomu pekarskog kvasca ustanovljeno je da svi elementi aktivni na plazmidima nisu aktivni u svom hromozomskom okruženju. Mapiranjem nascentne DNK detektovano je 322 aktivnih *ori* (Raughaman et al., 2001), dok je tehnikom imunoprecipitacije hromatina selektovano 429 pretpostavljenih ori-sekvenci za koje su istovremeno vezani kompleks ORC i proteini kompleksa MCM (Wyrick et al., 2001). Ovi podaci ukazuju da na oko 25% mesta na hromatinu za koje je vezan ORC ne započinje replikacija i da sama interakcija kompleksa ORC i ori-sekvence ne podrazumeva da će data *ori* biti aktivna u replikaciji.

U slučaju blisko postavljenih ori-sekvenci aktivacija jedne sprečava aktivaciju okolnih. Ova pojava, poznata kao *ori* interferencija, verovatno je posledica destrukcije prereplikativnog kompleksa na neaktiviranim ori-sekvencama usled prolaska replikacione viljuške poreklom sa prethodno aktivirane *ori*. Izbor između blisko postavljenih ori-sekvenci može biti stohastički, međutim sekvenca i hromatinska struktura igraju ulogu u donošenju odluke. *Ori* interferencija verovatno je prisutna i u širokim zonama inicijacije kod metazoa, kao na primer kod *ori* lokusa DHFR hrčka gde su, pored preferiranih mesta započinjanja replikacije, detektovana i brojna manje korišćena mesta (Dijkwel et al., 2002). Zajedno, ovi podaci ukazuju da broj mogućih *ori* prevazilazi broj označenih (licensing), a da broj označenih *ori* prevazilazi broj specifikovanih (specification), zato što i između ori-sekvenci na kojima je formiran preRC, bivaju aktivirane samo neke. Finalni izbor i aktivacija *ori* zavise od



efikasnosti formiranja i korišćenja preRC-a, na šta osim inicijator-DNK interakcija imaju uticaja i struktura hromatina, metilacije DNK, pozicija *ori* unutar jedra i vezivanje transkripcionih faktora (DePamphilis, 1999).

Neki podaci ukazuju da transkripcioni faktori imaju uticaj na inicijaciju replikacije sa obližnje *ori*-sekvence (Beall et al., 2002; Saitoh et al., 2002). Kod vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) je pokazano da mutacije u transkripcionim faktorima E2F i dDP utiču na inicijaciju replikacije u okviru *ori*-sekvence horionskog lokusa (Bosco et al., 2001). Međutim, izgleda da sam proces transkripcije nije neophodan. Ubacivanjem plazmida sa vezivnim mestom za transkripcioni faktor u jajne ćelije žabe uočeno je da samo vezivanje transkripcionih faktora, bez transkripcije, utiče da replikacija započinje na obližnjim sekvencama, dok je u odsustvu ovih faktora inicijacija nasumična (Danis et al., 2004). Delecije u promotorskom regionu gena za DHFR koje smanjuju ekspresiju gena, takođe smanjuju i delokalizuju inicijaciju na nizvodnoj *ori*-sekvenci (Saha et al., 2004).

Efikasnost inicijacije na pojedinim *ori*-sekvencama zavisi i od globalne ili lokalne promene u strukturi hromatina. Za formiranje prereplikativnog kompleksa potrebno je pravilno pozicioniranje nukleozoma na *ori*-sekvenci (Lipford and Bell, 2001). U kulturi humanih ćelija takođe je utvrđeno da promena u nivou acetilacije histona H4 menja učestalost kojom se neko mesto inicijacije koristi, kao i da povećan nivo acetilacije dovodi do ranije aktivacije "kasnih" *ori*-sekvenci (Kemp et al., 2005).

Iako, osim proteina direktno uključenih u formiranje preRC i regrutovanje polimeraze DNK, lokalna struktura hromatina, status transkripcije i drugi faktori utiču na izbor *ori*-sekvenci koje će biti aktivirane u jednoj S fazi, kao i na redosled kojim će biti aktivirane, dostupni podaci sugerišu izvesnu hijerahiju uticaja u ukupnom mehanizmu selekcije. Može se reći da svaki genom poseduje veliki broj potencijalnih *ori*-sekvenci koje mogu, ali ne moraju biti dostupne inicijacionom proteinu. Prvi stupan selekcije nametnut je dostupnošću vezivnih mesta prilikom formiranja preRC i dešava se u procesu nazvanom licensing. Drugi stupanj selekcije ili specifikacija (origin specification), odnosi se na izbor između već formiranih ili delimično formiranih preRC. Biohemijska osnova ovog stupnja selekcije nije poznata i može biti povezana sa ciklusom ORC-a ili sa nekim još uvek nepoznatim događajima. U svakom slučaju, sagledavanje celokupnog mehanizma selekcije nije moguće bez intimnog poznavanja prirode i specifičnosti interakcije između ORC-a i *ori*-sekvenci, o čemu će biti više reči u narednom poglavlju.



## 1.2. Protein-DNK interakcije uključene u selekciju *ori*

Proteinski kompleks ORC prvobitno je identifikovan u pekarskom kvascu kao faktor koji se specifično vezuje za konsenzusne elemente kvašćevih *ori* (Bell and Stillman, 1992), a zatim su njegovi homologoni detektovani i u svim izučavanim eukariotama. Naknadnim eksperimentima ustanovljena je njegova evolutivna konzervisanost i potvrđena uloga u inicijaciji replikacije metazoa (Bielinsky and Gerbi, 2001). Nakon brojnih studija na različitim model sistemima, jedino DNK elementi identifikovani u pekarskom kvascu mogu biti smatrani specifičnim vezivnim mestima. ORC-ovi izolovani iz drugih eukariotskih vrsta takođe interaguju sa DNK, ali, bar u *in vitro* uslovima, nedovoljno specifično. Značajno je da su *ori* replikacije pivskog kvasca i metazoa 5-20 puta veći nego kod pekarskog kvasca i često sadrže velike regione bogate AT baznim parovima. Ovi regioni sadrže DNK elemente potrebne za funkciju u replikaciji, ali njihova detaljna struktura još uvek nije poznata. Studije *in vivo* potvrđuju da kompleks ORC prepoznaje DNK sekvence eukariotskih replikatora (Bell and Dutta, 2002), u okviru kojih se vezuje za specifična mesta (Kong and DePamphilis, 2001; Lee et al., 2001; Abdurashidova et al., 2003; Kong and DePamphilis, 2002) kao i da su vezivna mesta za kompleks ORC potrebna za *ori* aktivnost (Kim and Huberman, 1998; Paixao et al., 2004).

### 1.2.1. Struktura i funkcija kompleksa ORC

Proteinski kompleks ORC sastavljen je od šest subjedinica označenih kao Orc1-Orc6 čije je zajedničko prisustvo u kompleksu neophodno za replikaciju. Iako je kompleks ORC DNK vezivni protein, ORC-ovi izolovani iz različitih vrsta nemaju zajednički vezivni domen, a u najvećem broju slučajeva DNK vezivni domen nije ni definisan. Kompleks ORC neophodan je za replikaciju, jer ekstrakti jajnih ćelija kojima nedostaje ORC ne mogu da podrže replikaciju a dodavanjem purifikovanog ili rekombinantnog kompleksa obnavlja se ova sposobnost (Vashee et al., 2003, Chesnokov et al., 2001).

Kod svih do sada proučavanih organizama ORC sadrži konzervisane domene za vezivanje ATP-a. Tri subjedinice (Orc1, Orc4 i Orc5) pripadaju AAA<sup>+</sup> familiji ATP-aza koje po vezivanju ATP-a prolaze kroz ili indukuju konformacione promene u proteinima sa kojima interaguju (Bell, 2002). Vezivanje i hidroliza ATP-a ima

značajnog uticaja na funkcionisanje samog kompleksa. Ispitivanja ORC-a kod *S. cerevisiae* i *D. melanogaster* ukazuju da je vezivanje ATP-a za kompleks, ali ne i njegova hidroliza, neophodno za interakciju kompleksa i DNK (Klemm et al., 1997; Chesnokov et al., 2001). Sa druge strane, vezivanje SpORC za *ori* je nezavisno od prisustva ATP-a (Kong et al., 2003). Vezivanje HsORC za DNK, takođe je nezavisno od ATP-a (Stefanović et al., 2003), ali je ATP-vezujući motiv neophodan za replikacionu aktivnost (Giordano-Coltart et al., 2005).

Osim za dvolančanu DNK, kompleks ORC pokazuje afinitet i za jednolančanu DNK. Njegov afinitet je tri puta manji od afiniteta proteina RPA (osnovnog eukariotskog faktora koji vezuje jednolančanu DNK) i zavisi od dužine, ali ne i od sekvence jednolančanog fragmenta (Lee et al., 2000). Zanimljivo je da za razliku od dvolančane, interakcija sa jednolančanom DNK stimuliše hidrolizu ATP-a vezanog za kompleks ORC. Elektronskim mikroskopom pokazano je da ORC postoji u dve alternativne konformacije - izduženoj konformaciji koja je stabilisana *ori* DNK i savijenoj konformaciji koja je stabilisana jednolančanom DNK (Lee et al., 2000). Ovi podaci ukazuju da događaji koji slede po vezivanju kompleksa ORC za *ori*-sekvencu i dovode do odvijanje DNK stimulišu hidrolizu ATP-a. Na ovaj način sama hidroliza ATP-a rezervisana je za korake u daljem procesu inicijacije replikacije i može da predstavlja jedan vid regulacije aktivacije kompleksa ORC.

Po vezivanju za DNK, ORC igra glavnu ulogu u regrutovanju ostalih faktora koji učestvuju u inicijaciji replikacije, jer ćelije ili ćelijski ekstrakti kojima nedostaje ORC ne formiraju prereplikacioni kompleks na *ori*-sekvenci. Međutim, iako je jasno da ORC igra ključnu ulogu u okupljanju proteina potrebnih za započinjanje replikacije, direktna interakcija sa ORC-om pokazana je za mali broj proteina. U *in vitro* studijama utvrđeno je da ORC direktno interaguje sa proteinom Cdc6 i da je ova interakcija uslovljena vezanošću kompleksa ORC za *ori*-sekvencu (Mizushima et al., 2000). Direktna interakcija pokazana je između subjedinice Orc1 i proteina Cdc6, a nekoliko podataka ukazuje da je za ovu interakciju potrebno da subjedinica Orc1 veže ATP (Seki and Diffley, 2000). Pored biohemijske uočena je i genetička interakcija proteina Cdc6 sa ORC-om, jer povećana ekspresija Cdc6 može da suprimuje letalne mutacije u pojedinim Orc subjedinicama (Liang et al., 1995). Podaci o interakciji ORC-a sa ostalim inicijacionim proteinima su uglavnom posredni. Na primer, studije sa ekstraktima jajnih ćelija i kvascima ukazuju da se proteini Cdc6 i Cdt1 međusobno nezavisno vezuju za hromatin kao i da je za ovo vezivanje neophodno prisustvo ORC-

a (Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000), što ukazuje na direktnu interakciju ORC-a sa proteinom Cdt1. Takođe, uzimajući u obzir relativnu veličinu kompleksa MCM i ORC verovatno je da oni interaguju u okviru prereplikacionog kompleksa. Tek po korišćenju purifikovanih proteina za formiranje preRC-a biće omogućeno bolje razumevanje interakcija ORC-a sa ostalim proteinima preRC-a.

Postoji jasna razlika između kvasaca i metazoa u pogledu svojstava individualnih ORC subjedinica. Za razliku od viših eukriota, kod kvasaca Orc6 je stabilno vezan u kompleksu ORC. Kod *Drosophila*-e, iako je DmOrc6 potreban za replikaciju DNK, izvesna količina ovog proteina nije povezana sa hromatinom i asociirana je sa ćelijskom membranom (Chesnokov et al., 2001; Chesnokov et al., 2003). Podaci ukazuju da je C-kraj ovog proteina neophodan za citokinezu ali ne i za replikaciju DNK. Slična stvar je primećena i kod humanih ćelija gde HsOrc6 kolokalizuje sa kinetohorama tokom mitoze (Prasanth et al., 2002), a inaktivacija ovog proteina prouzrokuje defekt u deobi ćelije. Jedno moguće objašnjenje je da kod metazoa Orc6 ima ulogu u mitozu koja nije povezana sa njegovom ulogom u replikaciji, dok bi druga pretpostavka bila da zapravo baš ovaj protein predstavlja deo mehanizma koji spaja procese replikacije i deobe ćelije.

Protein-protein interakcije takođe su odgovorne za vezivanje ORC-a za heterohromatin. Heterohromatin karakteriše nizak nivo ekspresije gena, nedostupnost za proteine koji se vezuju za DNK, dezacetilacija histona i prisustvo kompleksa proteina hromatina (HP1/Swi6 kod *S. pombe* i metazoa ili proteina Sir1-Sir4 kod *S. Cerevisiae*). Povezanost kompleksa ORC i heterohromatina prvi put je uočena kod *S. Cerevisiae* kada je programirano utišavanje transkripcije bilo narušeno mutacijama u subjedinicama ORC-a (Micklem et al., 1993). Kasnije je pokazano da subjedinica ScOrc1 amino krajem vezuje protein Sir1 (Triolo and Sternglanz, 1996). Mutacije u subjedinici DmOrc2 kod *D. melanogaster* suprimuju efekat mutacija u elementima koji sprečavaju širenje heterohromatina na susedni euhromatin (Pak et al., 1997). U *Xenopus*-u i *Drosophila*-i utvrđeno je da protein Orc1 interaguje svojim amino krajem sa proteinom HP1 (Shareef et al., 2001).

Još uvek je nejasno da li je prisustvo kompleksa ORC neophodno za formiranje heterohromatina ili proteini heterohromatina regrutuju ORC. Kod transkripciono prigušenog lokusa HML, vezivanje kompleksa ORC za element ACS je potrebno da bi se regrutovali proteini Sir koji potom dovode do prigušavanja transkripcije u ovom lokusu (Vujcic et al., 1999). Sa druge strane smatra se da proteini heterohromatina

regrutuju kompleks ORC kako bi povećali koncentraciju ovog inicijacionog proteina u regionima koji se "teško" replikuju, i da je efekat ORC-a na uspostavljanje heterohromatina samo posledica njegove interakcije sa proteinima HPI ili Sir1 (Leatherwood and Vas, 2003). Činjenica da su uloga kompleksa ORC u replikaciji i njegova interakcija sa heterohromatinom evolutivno konzervisane ukazuje na mogućnost da kompleks ORC ima ulogu u koordinaciji replikacije DNK sa organizacijom hromatina i procesom transkripcije u genomu.

#### 1.2.1.1. DNK vezivna svojstva kompleksa ORC

Kao što je već pomenuto, ORC fizički povezuje supstrat i enzime uključene u replikaciju DNK čime omogućava da replikacija započne u neposrednoj blizini mesta ORC-DNK interakcije. Kod mnogih organizama je pokazano da se ORC vezuje za ori-sekvence (Bell and Dutta, 2002), a u humanim ćelijama i kod *S. pombe* identifikovano je vezivanje na specifičnim mestima u okviru nekih ori-sekvenci (Kong and DePamphilis, 2001; Abdurashidova et al., 2003). Vezivanje ORC-a za ori-sekvence neophodan je preduslov inicijacije replikacije, jer ukidanjem vezivnog mesta za ORC u ori-sekvenci izostaje njena aktivnost (Kong and DePamphilis, 2002; Paixao et al., 2004).

Najviše proučena funkcija kompleksa ORC je njegova sposobnost da se vezuje za DNK. Za vezivanje ScORC sa DNK potrebno je prisustvo 5 subjedinica, ScOrc1-ScOrc5, od kojih samo subjedinice ScOrc1, ScOrc2, ScOrc4 i ScOrc5 interaguju sa ori-sekvencom. ScOrc6 nije potreban za vezivanje sa DNK, ali je neophodan za replikaciju i preživljavanje ćelije (Li and Herskowitz, 1993). Za razliku od kompleksa ORC ostalih organizama, SpORC poseduje DNK vezivni domen, smešten na N kraju subjedinice SpOrc4. Domen se sastoji od 9 ponovljenih "AT-hook" motiva (Chuang and Kelly, 1999), a studije drugih proteina sa istim motivom ukazuju da ovi proteini prepoznaju ili indukuju strukturne promene u vezanoj DNK. Biohemijske studije su pokazale da SpOrc4 i SpORC prepoznaju iste specifične regione u ori-sekvencama pivskog kvasca, kao i da je SpOrc4 isključivo odgovoran za vezivanje celog kompleksa *in vivo* (Moon et al., 1999). Ostalih 5 subjedinica ne pokazuje specifično vezivanje za DNK niti menja interakciju već vezanog SpOrc4 sa *ori*. Za razliku od prethodnih primera, izgleda da je kod vinske mušice za vezivanje sa DNK neophodno svih 6 subjedinica kompleksa ORC (Chesnokov et al., 2001). Što se tiče humanog

ORC-a situacija nije sasvim jasna, ali podaci ukazuju da se vezivna svojstva kompleksa poklapaju sa vezivnim svojstvima subjedinice HsOrc4 (Stefanović et al., 2003).

Usled postojanja dobro definisane sekvence *ori* kod *S. cerevisiae*, karakterizacija vezivanja ScORC-a za DNK najbolje je ispitana. ScORC specifično interaguje sa A i B1 elementima u kvaščevoj *ori*-sekvenci, obuhvatajući region oko 30bp (Rowley et al., 1995). Detaljnije studije ukazuju da ScORC primarno interaguje sa adeninima bogatim lancem ovog regiona (Lee and Bell, 1997). Vezivna mesta drugih kompleksa ORC su manje jasna. Kod *S. pombe* pokazano je da se SpORC vezuje za regione bogate nizovima AT *in vivo* (Kong and DePamphilis 2002). Ova interakcija nije jednostavno povezana sa AT bogatim sekvencama, jer druge sekvence koje uključuju AT nizove nisu vezivale ORC. Imunoprecipitacijom hromatina pokazano je da se SpORC vezuje za dva niza adenina u *ori*-sekvenci *ori2004* koja su zajedno neophodna za inicijaciju replikacije u okviru ove sekvence (Takahashi et al., 2003).

Studije *in vivo* i *in vitro* ukazuju da se DmORC vezuje za ključne elemente u okviru regiona koji kontroliše amplifikaciju horionskog lokusa na hromozomu III. Kompleks DmORC vezuje se za fragment DNK koji sadrži element AER-d kao i za tri odvojena fragmenta u okviru elementa ACE3 (Austin et al., 1999). Kada se brojne tandemske kopije elementa ACE3 integrišu na ektopično mesto u hromozomu, one regrutuju dodatne komplekse DmORC na okolna mesta u hromatinu koja inače nisu okupirana DmORC-om. Vezivanje DmORC-a u širokoj zoni hromatina pod uticajem elementa ACE3 sugerise da se u velikim *ori*-sekvencama metazoa sekvence koje uslovljavaju početno vezivanje molekula ORC mogu nalaziti udaljene od mesta započinjanja same sinteze DNK. Kod mušice *Sciara coprophilia* u *ori*-sekvenci II/9A vezivanje ORC-a detektovano je u neposrednoj blizini mesta otpočinjanja sinteze DNK (Bielinsky et al., 2001).

ORC poreklom iz *X. laevis* se preferencijalno vezuje za asimetričnu AT bogatu sekvencu. Međutim, iako nije detektovan konzervisani AT vezujući domen kao kod SpOrc4, utvrđeno je da SpOrc4 inhibira replikaciju DNK u ekstraktima jajnih ćelija žabe, onemogućavajući vezivanje XIORC za *ori*-sekvence i formiranje prereplikacionih kompleksa (Kong et al., 2003). Ovo ukazuje da se XIORC i SpOrc4 vezuju za slična mesta bogata AT nukleotidima i da eukariotski kompleksi ORC, bez obzira na nedostatak konzervisanog DNK vezivnog domena, preferencijalno vezuju iste ili slične AT bogate sekvence. Činjenica da se humani i ORC poreklom iz

*Drosophila*-e takođe vezuju za AT bogate regione u ori-sekvenci ide u prilog ovoj hipotezi.

### 1.2.2. Struktura i funkcija ori-sekvenci eukariota

Virusni genomi, kao i bakterijski, imaju jedan replikon po molekulu DNK, a ori-sekvencija je precizno definisana. Situacija u eukariotskim genomima je mnogo kompleksnija. Genom jednoćelijskih eukariota se replikuje počevši od nekoliko stotina ori-sekvenci, dok kod viših eukariota broj ori-sekvenci potrebnih za replikaciju genoma dostiže cifru od nekoliko desetina hiljada. Pokazano je da je svaki linearni eukariotski hromozom sastavljen od mnoštva replikacionih jedinica, koje su duž hromozoma raspoređene u nepravilnim razmacima (10-330 kb), i aktivne su (svaka jednom i samo jednom) u različitim vremenskim tačkama tokom S faze ćelijskog ciklusa (Huberman and Riggs, 1968). Svaka od ovih replikacionih jedinica može se smatrati funkcionalnim analogonom bakterijskog replikona.

Hromozomi mogu biti kompletno replikovani čak iako izgube nekoliko ori-sekvenci jer njihovu funkciju preuzimaju ori-sekvence uzvodno i nizvodno od izbačenih regiona. Dakle, ori-sekvence obezbeđuju kompletnu i efikasnu replikaciju genoma dok u isto vreme dozvoljavaju i genetičku fleksibilnost.

#### 1.2.2.1. Ori-sekvence jednoćelijskih eukariota

Ori-sekvence *S. cerevisiae* najbolje su okarakterisane. Prvobitno su identifikovane kao sekvence koje obezbeđuju autonomnu replikaciju epizoma koji ih nosi, zbog čega su i nazvane elementi ARS (Autonomously Replicating Sequences) (Stinchcomb et al., 1979). Kasnijim istraživanjima pokazano je da bidirekciona replikacija DNK započinje unutar ovih sekvenci, bez obzira da li su prisutne u plazmidu (Brewer and Fangan, 1987) ili u svom prirodnom hromozomskom okruženju (Brewer and Fangan, 1991).

Sekvence ARS bogate su AT nizovima i duge u proseku 100-150bp (Marahrens and Stillman, 1992). Sačinjene su od nekoliko elemenata, pri čemu je niz od 11bp - (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T), označen kao ACS (ARS Consensus Sequence), neophodan ali ne i dovoljan za započinjanje replikacije. Ovaj niz nalazi se u elementu A (koji obuhvata još nekoliko susednih nukleotida), visoko je konzervisan u ori-sekvencama pekarskog kvasca i predstavlja osnovnu komponentu u vezivnom mestu

za proteinski kompleks ORC. Ostali elementi su manje konzervisani i označeni su kao elementi B (B1, B2 i B3). Kod *ori* ARS1, element B1 se nalazi u blizini elementa A i predstavlja drugu komponentu vezivnog mesta kompleksa ORC. Funkcija elementa B2 nije još uvek jasna, ali se smatra da predstavlja domen koji se lako denaturiše - DUE (DNA Unwinding Element). Element B3 sadrži vezivno mesto za transkripcioni faktor Abf1 koji stimuliše funkcionisanje *ori*-sekvence. Elementi B1 i B2 ne mogu se lako odrediti kod drugih *ori*-sekvenci na osnovu sličnosti u redosledu nukleotida, ali genetičkim studijama potvrđeno je prisustvo funkcionalno identičnih elemenata kod ostalih *ori*-sekvenci u *S. cerevisiae* (Rao et al., 1994).

Sekvenca sastavljena od mnogobrojnih kopija elementa A dovodi do uspostavljanja ARS aktivnosti (Zweifel and Fangman, 1990), dok uzastopno ponavljanje jednog istog elementa B (B1, B2 ili B3) povezano sa elementom A ne dovodi do stimulacije ARS aktivnosti (Rao et al., 1994). Ovo ukazuje da su elementi B funkcionalno različiti međusobno i da je svakom elementu A svojstvena vrlo niska inicijaciona aktivnost koja se ne može detektovati ukoliko nije prisutno više elemenata A. Generalno gledano, element A igra glavnu ulogu u označavanju sekvence kao *ori* replikacije, dok elementi B služe da povećaju efikasnost korišćenja date *ori*-sekvence .

Uspešna identifikacija *ori*-sekvenci kod pekarskog kvasca stimulisala je potragu za sekvencama iste funkcije kod ostalih eukariota. Međutim, istraživanje *ori* strukture već kod *S. pombe* dovelo je u pitanje mogućnost uopštavanja modela *ori*-sekvence kod *S. cerevisiae* na nivo eukariotskog modela. *ori*-sekvence pivskog kvasca se razlikuju od svojih analoga kod pekarskog kvasca na nekoliko načina (Clyne and Kelly, 1995; Dubey et al., 1996). Njihova minimalna dužina iznosi 500-1000bp i sadrže više elemenata dužine 20-50bp koji su važni za *ori* aktivnost. Ovi elementi pokazuju međusobnu sličnost i sastavljeni su od manjih asimetričnih nizova AT, ali ne sadrže zajedničku konsenzusnu sekvencu kao što je ACS pekarskog kvasca. Karakteristika *ori*-sekvenci *S. pombe* je i da su nizovi AT zastupljeni u većem broju od neophodnog jer se mogu pojedinačno ukloniti bez značajnog uticaja na *ori* aktivnost.

Ispitivanjem *ori*-sekvenci kod kvasaca ustanovljeno je da su one sastavljene od modularnih elemenata koji određuju mesta inicijacije replikacije u genomu. Međutim, struktura *ori*-sekvenci kod *S. pombe* se pokazala znatno kompleksnijom nego kod *S. cerevisiae*, da bi se kod višecelijskih organizama ovo usložnjavanje dalje nastavilo.

#### 1.2.2.2. Ori-sekvence metazoa

Identifikacija specifičnih sekvenci od kojih započinje replikacija na hromozomima metazoa se pokazala kao vrlo složen zadatak, usled znatno veće kompleksnosti u organizaciji njihovih genoma. Pokušaji da se u hromozomima sisara identifikuju sekvence slične elementima ARS kod kvasca dovela je do otkrića da bilo koji fragment DNK duži od 10 kb može da obezbedi autonomnu replikaciju vektora poreklom od Epstein Barr virusa (Heinzel et al., 1991). Takođe, bilo koja DNK dodata ekstraktu embriona vinske mušice ili žabe (Blow and Laskey, 1986), ili injecirana u oplodena jaja žabe uspešno se replikuje (Coverley and Laskey, 1994). Replikacija ubačene DNK započinje nasumično i odvija se striktno jednom u toku S faze (Mahbubani et al., 1992). Jedan od nedostataka ovih eksperimenata je da replikacija bilo koje sisarske sekvence u epizomalnoj formi ne predstavlja verno relikaciju iste sekvence u njenom hromozomskom okruženju. Sa druge strane, pokazano je da replikacija u ranim embrionim žabe započinje nasumično, prosečno na svakih 8 kb (Walter and Newport, 1997). Ćelijski ciklusi rane embriogeneze su vrlo kratki i sastavljeni samo iz faza S i M. Budući da je jajna ćelija bogato opskrbljena svim neophodnim proteinima i odgovarajućim iRNK za nesmetano i brzo smenjivanje faze replikacije i deobe ćelije, transkripcija je potpuno odsutna. U kasnijim stupnjevima embrionalnog razvića veličina replikona se menja i dostiže u proseku dužinu od 172 kb. Uspostavljanje faze G1 u ćelijskom ciklusu poklapa se sa ustanovljavanjem specifičnih sekvenci kao *ori* replikacije (Wu and Gilbert, 1996; Wu et al., 1998). Stoga, korišćenje ekstrakata dobijenih iz ranih embriona za replikacione eseje *in vitro* ili pak ubacivanje strane DNK u takve embrione, ima za posledicu nasumično otpočinjanje sinteze DNK reportera.

Drugi model sistem za izučavanje replikacije DNK višćelijskih organizama jeste horionski lokus vinske mušice koji se amplifikuje tokom razvića. Iako proces umnožavanja ovih gena uključuje višestruku replikaciju jednog te istog segmenta DNK u toku jednog ćelijskog ciklusa, u inicijaciji učestvuju isti proteini kao i kod normalne hromozomske replikacije (Spradling, 1999). U okviru horionskog lokusa dugog 7,7 kb identifikovan je element dužine 320bp označen kao ACE3 (Amplification Controlling Element) koji je neophodan za umnožavanje. Replikacija je stimulisana prisustvom nekoliko elemenata AER (Amplification Enhancing Element). Mapiranjem replikacionih intermedijera ustanovljeno je da sinteza DNK započinje



skoro isključivo u okviru elementa AER-d (ori- $\beta$ ) udaljenom oko 1,5 kb od elementa ACE3 (Lu et al., 2001). Kada se brojne tandemske kopije elementa ACE integrišu na ektopično mesto u hromozomu, one omogućavaju umnožavanje na ovim ektopičnim mestima, ali sama sinteza DNK izgleda da započinje u okolnim sekvencama (Carminati et al., 1992). Za razliku od ranih embriona gde je sekvenca nebitna za otpočinjanje replikacije, u slučaju amplifikacije horionskih gena *D. melanogaster* pokazano je da su za inicijaciju replikacije potrebni specifični genetički elementi.

#### 1.2.2.2.1. Ori-sekvence sisara

Dosad ispitivani *ori* replikacije kod sisara međusobno se znatno razlikuju po veličini, hromozomskoj lokaciji, vremenu aktivacije unutar S faze kao i tipu ćelije. Mnogi od njih su mapirani u intergenskim regionima (lamin B2, c-myc,  $\beta$ -globin), dok se neki nalaze unutar otvorenih okvira čitanja gena (ori-sekvence hrčka unutar CAD gena). U ćelijskim linijama koje ekspimiraju gene za IgH replikacija započinje u zoni koja obuhvata čitav skup ovih gena, dok u ćelijama gde ovi geni nisu aktivni ceo region biva pasivno replikovano jednom replikacionom viljuškom (Ermakova et al., 1999). Nasuprot tome, ori-sekvencu lociranu uzvodno od gena za  $\beta$  globin aktivna je u mnogim ćelijskim linijama čoveka bez obzira da li se ekspimiraju gen za  $\beta$  globin. Međutim, *ori* aktivnost se detektuje rano u toku S faze ukoliko ćelije ekspimiraju globinske gene, dok u ćelijama kod kojih ovaj region nije transkripciono aktivan replikacija započinje kasno u S fazi (Epner et al., 1988).

Ori-sekvence metazoa, detektovane tehnikom mapiranja aktivnih *ori*, mogu se podeliti u dve klase. U jednu spadaju ori-sekvence kod kojih se u okviru specifičnog lokusa dužine nekoliko kb nalazi jedno definisano mesto inicijacije replikacije. U drugu klasu spadaju ori-sekvence kod kojih se unutar regiona veličine 10-50 kb mogu identifikovati višestruka, raštrkana mesta otpočinjanja sinteze DNK i ovi regionii nazvani su zone inicijacije (Gilbert, 2001).

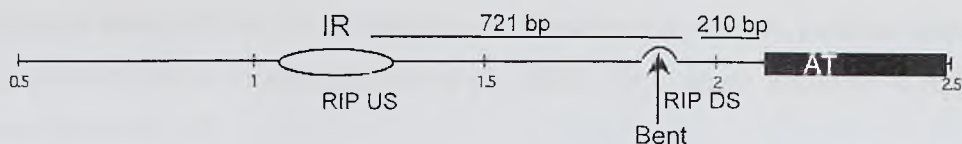
Analizom relativne zastupljenosti novosintetisane DNK u zoni inicijacije koja se nalazi iza gena za DHFR kod hrčka, ustanovljena su tri preferirana mesta otpočinjanja sinteze DNK: ori- $\beta$  oko 17 kb nizvodno od gena za DHFR, ori- $\beta'$  smešten u blizini ori- $\beta$  i 6 kb nizvodno lokalizovan ori- $\gamma$  (Leu and Himlin, 1989). Na osnovu ovih nalaza pretpostavlja se da su na izgled široke zone inicijacije sastavljene od većeg

broja bliskih mesta inicijacije replikacije od kojih se neka mogu koristiti sa većom, a neka sa manjom učestalošću.

Do sada je identifikovano nekoliko desetina *ori*-sekvenci sisara, međutim sekvence odgovorne za *ori* aktivnost nisu precizno definisane. Novi pristup ispitivanja genetičkih elemenata potrebnih za funkciju *ori*-sekvence predstavljaju eseji koji direktno testiraju lokalnu aktivnost fragmenta DNK u inicijaciji replikacije pošto se on integriše na ektopično mesto u hromozomu. Primenom ove tehnike za nekoliko fragmenata DNK, pokazano je da funkcionišu kao replikator na ektopičnim lokacijama u hromozomu. Tu spadaju: fragment od 5,8 kb koji sadrži *ori*- $\beta$  region genskog lokusa DHFR hrčka (Altman and Fanning, 2001), fragment od 2,4 kb koji se nalazi uzvodno od gena za *c-myc* kod čoveka (Trivedi et al., 1998), fragment od 8 kb poreklom iz humanog  $\beta$ -globinskog lokusa (Aladjem et al., 1998) i 1,2 kb dugačak fragment iz lamin B2 regiona humanih ćelija (Paixao et al., 2004).

Uzvodno od gena *c-myc* kod čoveka identifikovana je zona inicijacije replikacije DNK. Jezgro *ori*-sekvence čini fragment dužine 2,4 kb koji zadržava *ori* aktivnost na ektopičnom mestu u hromozomu. Sinteza DNK započinje na više mesta u okviru jezgra, kao i oko njega. Jezgo *ori*-sekvence sastoji se od nekoliko strukturnih elemenata među kojima su: promotor  $P_0$  i  $P_1$ , nekoliko mesta za vezivanje transkripcionih faktora, region koji se lako denaturiše (DUE) i u sebi sadrži tri sekvence koje se delimično preklapaju sa elementom ACS iz *S. cerevisiae*, region koji ima potencijal da formira neortodoksnu strukturu DNK, kao i nekoliko segmenata DNK koji zauzimaju savijenu ili vrlo fleksibilnu konformaciju *in vitro*. Delecija segmenata DNK u okviru regiona koji se lako denaturiše, regiona koji ima potencijal za formiranje alternativnih struktura kao i vezivnih mesta za transkripcione faktore dovodi do smanjene *ori* aktivnosti (Liu et al., 2003).

Mutaciona analiza *ori*-sekvenci  $\beta$ -globinskog lokusa čoveka i *ori*- $\beta$  hrčka na ektopičnim mestima u hromozomu takođe je ukazala na neke elemente koji su potrebni za njihovu aktivnost kao replikatora (Altman and Fanning, 2004). Kod *ori*- $\beta$  identifikovana su najmanje četiri elementa potrebna za *ori* aktivnost na ektopičnom mestu, a to su: 4bp unutar mesta otpočinjanja sinteze DNK, oko 1 kb nizvodno region bogat adeninima i timinima, između ova dva elementa region koji savija molekul DNK i neposredno do njega vezivno mesto za protein RIP60 (slika 1.2).



Slika 1.2. Šematski prikaz potencijalnih elemenata u ori- $\beta$  hrčka.

IR – region inicijacije; RIP – uzvodno (US) i nizvodno (DS) mesto vezivanja za protein RIP60; AT – region bogat AT bp; Bent – region koji savija molekul DNK.

Za fragment poreklom iz ori-sekvence humanog  $\beta$ -globinskog lokusa koji podržava *ori* aktivnost na ektopičnoj lokaciji utvrđeno je da se sastoji od dve nezavisne ori-sekvence. U okviru svake od njih identifikovani su regioni koji kooperativno doprinose *ori* aktivnosti. Između ovih regiona nije detektovana značajna homologija u sekvenci osim segmenta bogatog AT bp i nizova sa asimetrično raspoređenim purinima i pirimidinima za koje je utvrđeno da su neophodni ali ne i dovoljni za *ori* aktivnost (Wang et al., 2004).

#### 1.2.2.2.1.1. Ori-sekvencu lamin B2

Analizom biblioteke nascentne DNK sintetisane u ranoj S fazi identifikovana je ori-sekvencu nizvodno od humanog gena za lamin B2 (Tribioli et al., 1987) koji se nalazi na kraćem kraku hromozoma 19. Finim mapiranjem *ori* je lokalizovan u okviru fragmenta od oko 500bp, koji obuhvata 3' nekodirajući deo gena za lamin B2 i intergensku sekvencu koja razdvaja ovaj gen od gena *ppv1* (Giacca et al., 1994). Kada je ispitivana rezistencija ovog regiona na digestiju DNA-zom ili metilaciju DMS-om *in vivo*, uočena je markantna protekcija u okviru mapiranog regiona *ori*, koja nije detektovana kod ćelija koje se ne dele (Dimitrova 1996). Interakcije između proteina i ori-sekvence prolaze kroz značajne promene tokom ćelijskog ciklusa. Zaštićeni region se uspostavlja u G1 fazi i povećava se do granice G1 i S faze. Aktivacijom ori-sekvence u S fazi smanjuje se zaštićeni region da bi u potpunosti nestao tokom mitoze. U narednoj G1 fazi, ponovo se uspostavlja karakteristična zaštita ovog regiona proteinima (Abdurashidova et al., 1998). Primećene oscilacije u genomskom footprint-u tokom ćelijskog ciklusa su vrlo slične onima koje odgovaraju formiranju pre i postreplikativnih kompleksa opisanih kod kvašćevih i žabljih ćelija (Rowley et al., 1995). Koristeći vrlo osetljivu tehniku mapiranja ori-sekvence, u okviru regiona koji interaguje sa velikim proteinskim kompleksom, identifikovano je mesto inicijacije replikacije sa rezolucijom na nivou pojedinačnih nukleotida. Istraživani region je bio dug oko 1 kb i u njegovom okviru detektovano je samo jedno mesto

započinjanja sinteze DNK, sa razmakom od tri nukleotida između početka jednog i drugog vodećeg lanca (Abdurashidova et al., 2000). Ovo mesto nalazi se u regionu bogatom nizovima AT.

Pokazano je da fragment dužine 1,2 kb iz regiona ori-sekvence lamin B2 zadržava *ori* aktivnost kada promeni položaj na hromozomu (Paixao et al., 2004). Ovaj fragment obuhvata mesto inicijacije sinteze DNK, region zaštićen proteinima i deo obližnjeg CpG ostrvca. Mutacionom analizom ustanovljeno je da je za *ori* aktivnost neophodan segment od 290 bp koji sadrži start sinteze DNK i proteinima zaštićen region, dok CpG ostrvce utiče na stepen *ori* aktivnosti. Analiza footprint-a *in vivo* mutirane i izvorne ori-sekvence lamin B2 ukazala je na povezanost između *ori* aktivnosti i formiranja proteinskog kompleksa na ori-sekvenci. Nedavno je pokazano da AT bogati fragment, koji obuhvata start sinteze DNK, može da zameni funkciju AT elementa u ori-sekvence DHFR iz hrčka (Altman and Fanning, 2004).

Ovi podaci ukazuju da i kod viših eukariota ori-sekvence imaju modularnu strukturu. Međutim, elementi koji je čine, kao i njihova funkcija nisu tako precizno definisani kao kod *S. cerevisiae*. Karakteristika svih do sada ispitivanih ori-sekvenci metazoa, pa čak i kod pivskog kvasca, je očigledan nedostatak konsenzusne sekvence slične onima kod pekarskog kvasca. Kao jedini zajednički motiv pojavljuje se izuzetna zastupljenost nizovima AT u regionima oko mesta započinjanja sinteze DNK. Takođe, u okviru ovih sekvenci primećen je asimetričan raspored adenina i timina. Kod *S. pombe* ovi nizovi su od suštinske važnosti za *ori* funkciju. Ipak još uvek nije jasno kako ove sekvence sa timinom u jednom i adeninom u drugom lancu DNK određuju mesta inicijacije replikacije kod eukariota.

Mogućnost razmene elemenata između ori-sekvenci ukazuje da oni, iako ne sadrže zajedničku sekvencu obavljaju istu ili sličnu funkciju. Sa druge strane, struktura DNK je uslovljena sekvencom, pri čemu različite sekvence mogu da obrazuju funkcionalno istu strukturu. Strukture koje odstupaju od klasične, dvolančane B-forme DNK detektovane su u humanoj ori-sekvenci c-myc kao i kod hrčka u *ori* DHFR lokusa. Kako su regioni koji učestvuju u formiranju ovih struktura važni za aktivnost ori-sekvence, u narednom poglavlju biće više reči o alternativnim strukturama u molekulu DNK i zahtevima u sekvenci koji omogućavaju njihovo formiranje.

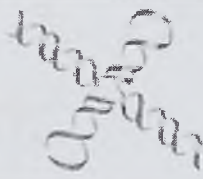
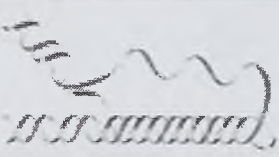
### 1.3. Alternativne strukture DNK

Razumevanje strukture DNK ori-sekvenci važno je za identifikaciju elemenata ključnih za njihovu funkciju, kao i za određivanje specifičnosti protein-DNK interakcije na njima. Ori-sekvence eukariota sadrže AT bogate regione sa asimetričnim rasporedom adenina i timina komplementarnih lanaca. Zavisno od redosleda nukleotida, ovakve sekvence mogu da imaju različit potencijal za formiranje alternativnih struktura.

DNK je dinamičan molekul koji može da zauzme različite oblike i ova pojava naziva se strukturnim polimorfizmom. Klasična desnogira dvolančana forma (B-forma) DNK u kojoj su dva lanca antiparalelno orijentisana i povezana vodoničnim vezama po Watson-Crick-ovom principu (A-T, G-C) je najčešće prisutna forma DNK, ali svaki segment DNK može da zauzima nekoliko alternativnih strukturnih oblika u zavisnosti od baznog sastava, okolnih sekvenci i komponenti sredine u kojoj se nalazi (Sinden, 1994). Do sada je otkriven veliki broj alternativnih struktura DNK: A-, C-, D-, Z- i T-forma, heteronomna DNK, tripleks, kvadrupleks, paralelna DNK i dr.

Kod nekih alternativnih struktura, kao što su krstaste strukture i Z-DNK, sparivanje baza je po Watson-Crick-ovom principu, dok se kod drugih, tro- ili četvorolančanih formi, vodonične veze između nukleotida delimično ili isključivo formiraju na drugi način. Krstaste strukture formiraju se u regionima sa invertovanim ponovcima (slika 1.3) kada se svaki od lanaca molekula DNK savije u centru simetrije i intralančano rekonstituiše B-formu DNK sa jednolančanom petljom na vrhu. Ova konformacija liči na Holliday-eve strukture tokom rekombinacije (Palecek, 1991). Levogira dvolančana zavojnica ili Z-DNK javlja se u regionima sa naizmeničnim rasporedom purinskih i pirimidinskih baza (PyPu·PyPu)<sub>n</sub> (Rich et al., 1984). Promena B-forme u Z-formu postiže se rotacijom purinske baze za 180° oko glikozidne veze, odnosno prelaskom iz *anti* u *syn* konformaciju. Smenjivanje nukleotida u *anti* i *syn* konformaciji prouzrokuje cik-cak oblik fosfodiestarske okosnice, a veliki žljeb se pretvara u praktično ravnu površinu, dok je mali žljeb dubok i uzan (Basham et al., 1998). Četvorolančana DNK (tetraplex ili G-quadruplex) se formira u sekvencama sa 4 grupe od po 3 ili više guanina (Neidle and Parkinson, 2003). Ova konformacija pokazuje veliku raznovrsnost u pogledu polarnosti lanaca, veličine žljebova i petlji između grupa nukleotida povezanih u tetrapleksu (slika 1.3). Homopurinski-homopirimidinski regioni imaju sposobnost formiranja trolančane DNK (triplex). U

ovoj strukturi treći lanac je smešten u velikom žljebu klasične B-forme DNK i vezuje se Hoogsteen-ovim vodoničnim vezama za lanac bogat purinima (Soyfer and Potaman, 1996). Jedna od malobrojnih zajedničkih karakteristika ori-sekvenci eukariota jeste prisustvo kratkih AT homopurinskih-homopirimidinskih regiona koji imaju potencijal da formiraju trolančane strukture, pa će ove alternativne forme DNK biti pobliže opisane.

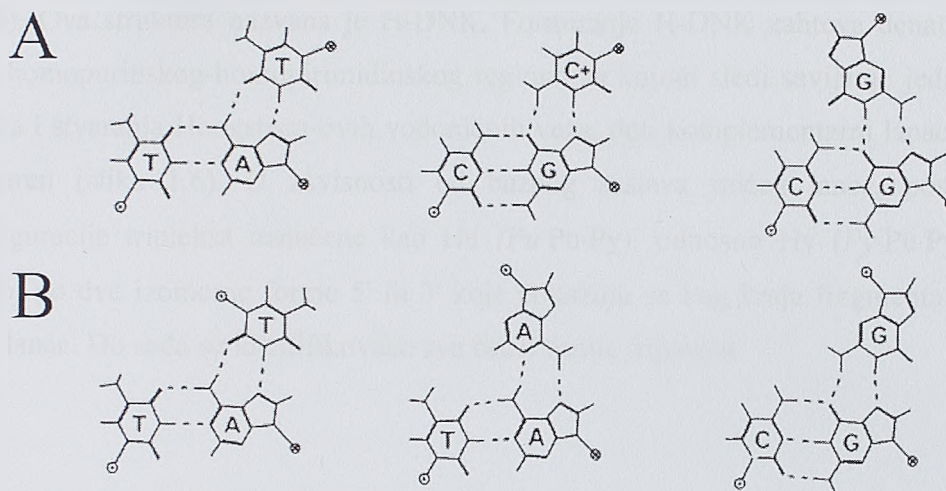
IME	KONFORMACIJA	ZAHTEVI U SEKVENCI	SEKVENCA
Krstaste strukture		invertovani ponovci	$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{TCGGTACCGA}} \\ \overleftarrow{\text{AGCCATGGCT}} \end{array}$
Tripleks		(Pu·Py) <sub>n</sub> ponovci tipa refleksija	$\begin{array}{c} \text{AAGAGG} \text{---} \text{GGAGAA} \\ \text{TTCTCC} \text{---} \text{CCTCTT} \end{array}$
Tetrapleks		oligo (dG) <sub>n</sub>	AG <sub>3</sub> (T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Z-DNK		(PyPu·PyPu) <sub>n</sub>	$\begin{array}{c} \text{CGCGTGCGTGTG} \\ \text{GCGCACGCACAC} \end{array}$

Slika 1.3 Neortodoksne strukture DNK

### 1.3.1. Trolančana DNK

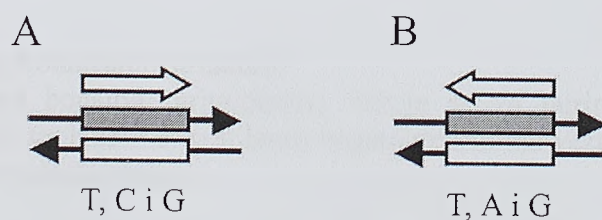
Trolančana struktura nastaje usled specifičnog prepoznavanja homopirimidinske-homopurinske sekvence dvolančane DNK od strane trećeg lanca koji može da pripada drugom (intermolekulski tripleks) ili istom molekulu DNK (intramolekulski tripleks). Ovaj lanac se nalazi u velikom žljebu i obavija oko dvolančane zavojnice formirajući Hoogsteen-ove ili reverzne Hoogsteen-ove vodonične veze. Na ovaj način, formiraju se trijade baza koje u isto vreme ostvaruju Watson-Crick-ove i Hoogsteen-ove vodonične veze. U tripleksu centralni lanac mora biti bogat purinima koji imaju dve

površine sposobne da formiraju više od jedne vodonične veze. Sposobnost samo određenih baznih parova da formiraju vodonične veze po Hoogsteen-ovom principu određuje specifičnost vezivanja trećeg lanca (slika 1.4).



Slika 1.4. Trijade baznih parova. Klasične (A) i reverzne (B) Hoogsteen-ove vodonične veze.

U zavisnosti da li se formiraju klasične ili reverzne Hoogsteen-ove veze treći lanac je paralelan, odnosno antiparalelan sa centralnim purinskim lancem (slika 1.5). Iz ovog sledi da se u trećem lancu istovremeno mogu nalaziti nukleotidi C, T i G ukoliko je on paralelno orijentisan ili nukleotidi G, A i T ukoliko je antiparalelno orijentisan (Giovannangeli and Helene 2000).

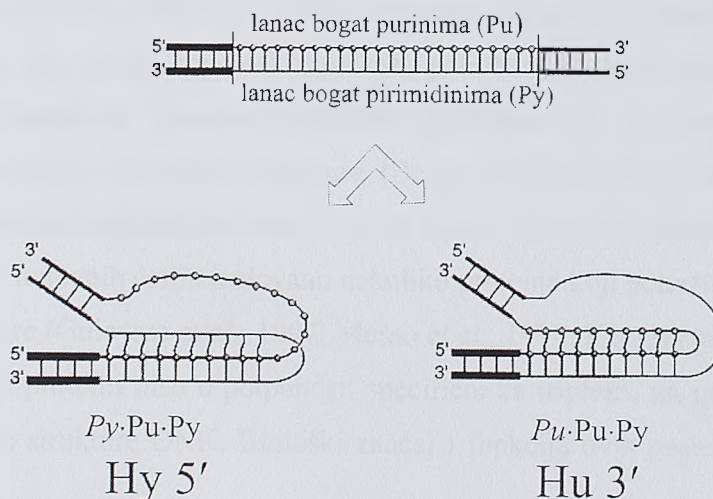


Slika 1.5. U zavisnosti od nukleotida koji ga čine, treći lanac može biti paralelno (A) ili antiparalelno (B) orijentisan.

Postoje dva osnovna uslova koje sekvenca mora da ispunjava kako bi mogla da formira trolančanu strukturu. Jedan je prisustvo homopurinskog-homopirimidinskog regiona koji obezbeđuje purinima bogat centralni lanac, a drugi je da ovaj region

sadrži simetrične ponovke tipa refleksije ili klizajuće refleksije koji obezbeđuju komplementarno sparivanje baza po Hoogsteen-ovom principu.

Intramolekulski tripleksi prvi put su otkriveni pod uslovima *in vitro*. Otkriveni su u plazmidima na mestu ponovaka sa refleksnim tipom simetrije, u homopurinskim-homopirimidinskim regionima i na niskom pH (Mirkin and Frank-Kamenetskii, 1994). Ova struktura nazvana je H-DNK. Formiranje H-DNK zahteva denaturaciju dela homopurinskog-homopirimidinskog regiona za kojom sledi savijanje jednog od lanaca i stvaranja Hoogsteen-ovih vodoničnih veza, dok komplementarni lanac ostaje nesparen (slika 1.6). U zavisnosti od baznog sastava trećeg lanca, postoje 2 konfiguracije tripleksa označene kao Hu (*Pu*·*Pu*·*Py*), odnosno Hy (*Py*·*Pu*·*Py*), i u svakoj po dve izomerne forme 5' ili 3' koje pokazuju sa kog kraja fragmenta potiče treći lanac. Do sada su identifikovane sve četiri forme tripleksa.



Slika 1.6. Formiranje trolančanih struktura.

Hy5' - 5' kraj lanca bogatog pirimidinima vezuje se za purinima bogat lanac nenedenaturisanog regiona. Hu3' - 3' kraj lanca bogatog purinima vezuje se za purinima bogat lanac nenedenaturisanog regiona.

Pokazano je da negativna superspiralizacija plazmida obezbeđuje energiju (topološki pritisak) potrebnu za delimičnu denaturaciju, početni korak formiranja tripleksa (Htun and Dahlberg, 1988; 1989). Osim u plazmidima trolančane forme detektovane su i u linearnim molekulima gde dva niza udaljena nekoliko kilobaza mogu da interaguju formirajući tripleks. U ovom slučaju sam molekul zauzima oblik



kruga ili petlje slične slovu  $\Omega$ . Pokazano je da su ovako stvoreni tripleksi stabilni i pri promeni uslova sredine u kojima su formirani (Hampel et al., 1993; 1994), što ukazuje da je na neki način data struktura topološki zaključana.

Stvaranje određene izomerne forme tripleksa i njegova stabilnost zavise od sekvence, stepena negativne superspiralizacije, pH sredine i prisustva dvovalentnih katjona ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ).

### 1.3.2. Intramolekulske trolančane strukture *in vivo* i njihova biološka uloga

Formiranje trolančanih formi na specifičnim mestima u genomu veoma je značajno usled sposobnosti ovakvih struktura da modifikuju regulaciju transkripcije gena, indukuju mutagenezu specifičnu za mesto ili homolognu rekombinaciju.

U živoj ćeliji DNK je organizovana u topološke domene koji su ekvivalentni zatvorenim cirkularnim molekulima. Procesi koji se odvijaju na molekulu DNK (replikacija, transkripcija) imaju za posledicu promenu u superspiralizaciji određenog domena i mogu da stvore topološki pritisak potreban za formiranje tripleksa. Kompjuterskom analizom genoma eukariota potvrđeno je prisustvo sekvenci sposobnih da formiraju trolančane strukture (Behe, 1995). Da li se ove sekvence zaista nalaze u strukturi tripleksa *in vivo*, još uvek nije sa sigurnošću potvrđeno.

Do sada je iz humanih ćelija izolovano nekoliko proteina koji pokazuju afinitet za trolančane strukture (Guieysse et al., 1997; Musso et al., 1998; Kiyama and Camerini-Otero, 1991). Ovi proteini nisu u potpunosti specifični za tripleks, pa pokazuju mali afinitet i za druge strukture DNK. Biološki značaj i funkcija ovih proteina još uvek nisu rasvetljeni.

Ubacivanjem sekvenci pogodnih za formiranje tripleksa u plazmide kojima su zatim transformisane *E. coli*, i potonjom strukturnom analizom, potvrđeno je da u bakterijskoj ćeliji postoje uslovi za formiranje trolančanih struktura (Kohwi et al., 1992). Nakon imunizacije miševa trolančanom DNK, izolovana su antitela specifična za tripleks i pokazana je njihova interakcija sa hromozomima. Ova interakcija je izostajala kada je sa antitelima dodata i kompetitorska trolančana DNK (Agazie et al., 1996). Procenjeno je da antitela na tripleks za 20% smanjuju replikaciju i transkripciju u izolovanim intaktnim jedrima. U drugoj studiji trolančane DNK detektovane su antitelima specifičnim za tripleks i fluorescentnim oligonukleotidima, komplementarnim jednolančanim regionima potencijalnih tripleksa. Signali poreklom

od oba agensa su ili bili preklapljeni ili veoma bliski, što je potvrdilo da je u oba slučaja detektovana ista struktura (Ohno et al., 2002).

Biološka funkcija trolančanih struktura ispitivana je po transformaciji bakterijskih ćelija plazmidima koji nose reporterski gen i sekvence sposobne da formiraju triplekse. Kada se trolančana struktura nalazila u okviru kodirajućeg regiona gena za *lacZ* ekspresija gena bila je smanjena. Sa druge strane, ubacivanje tripleksa uzvodno od promotora prouzrokovalo je povećanu ekspresiju gena, dok je prisustvo tripleksa između promotora i gena imalo suprotan efekat (Sarkar and Brahmachari, 1992; Brahmachari et al., 1997). Ovi podaci ukazuju na moguću ulogu trolančanih struktura u regulaciji ekspresije gena.

Smatra se da trolančane forme imaju uticaj i na pozicioniranje nukleozoma, kao i na stvaranje uređenih struktura hromatina. Formiranjem tripleksa smanjuje se negativna superspiralizacija u datom topološkom domenu. Takođe, formiranje nukleozoma je onemogućeno u regionu tripleksa što za posledicu ima alternativno pozicioniranje nukleozoma i održavanje otvorene forme hromatina. Međutim, mehanizam formiranja trolančanih struktura *in vivo* i njihov biološki značaj još uvek nije poznat.

## 2. CILJ RADA

Dosadašnja istraživanja pokazuju da su proteini uključeni u replikaciju DNK konzervisani od kvasaca do sisara. Inicijacija replikacije započinje vezivanjem šestočlanog proteinskog kompleksa ORC za ori-sekvence, a ORC-DNK kompleks potom regrutuje seriju drugih proteina, formirajući pre-replikativni kompleks. Na početku S faze ćelijskog ciklusa protein kinaze zavisne od ciklina aktiviraju formirane pre-replikativne komplekse i počinje proces udvajanja genetičkog materijala.

Mehanizam kojim proteinski kompleks ORC prepoznaje ori-sekvence nije precizno utvrđen. Kod jednoćelijskih eukariota distribuciju ovog kompleksa regulišu genetički elementi analogni bakterijskom replikatoru, dok kod metazoa nisu identifikovane specifične sekvence odgovorne za vezivanje kompleksa ORC. Uprkos izostanku konzenusnih elemenata, kompleks ORC se ne vezuje nasumično, već za diskretna mesta unutar hromozoma na kojima otpočinje replikacija, a hromozomski regioni koji vezuju ORC i u okviru kojih započinje sinteza DNK *in vivo*, funkcionišu kao replikatori na ektopičnim hromozomskim lokacijama.

U živoj ćeliji, kao i pod uslovima *in vitro*, kompleks ORC prepoznaje duge regione DNK i unutar njih višestruka mesta za koja se vezuje na kooperativan način. Zajednička karakteristika ovih mesta jeste visok sadržaj AT baznih parova i izvesna pravilnost u rasporedu homopurinskih-homopirimidinskih regiona. Ovakva strukturna svojstva, kao i izostanak konsenzusne sekvence, ukazuje na mogućnost da ishodišta replikacije obrazuju sinonimne strukture koje određuju specifičnost vezivanja proteinskog kompleksa ORC.

Cilj ovog rada jeste ispitivanje mogućih strukturnih svojstava izabrane ori-sekvence i njenih interakcija sa inicijacionim proteinom. U skladu sa tim rad će se sastojati iz:

- 1) analize strukture fragmenata DNK izolovanih iz regiona *ori* lamin B2 koji sadrži mesta interakcije sa kompleksom ORC kao i mesta inicijacije DNK sinteze,
- 2) utvrđivanja detaljne DNK vezivne specifičnosti proteina HsOrc4 koji predstavlja jednu od subjedinica proteinskog kompleksa ORC,
- 3) karakterizacije strukturnih elemenata DNK odgovornih za vezivanje proteina HsOrc4.

Protein HsOrc4 izabran je za analizu zato što podaci iz literature pokazuju da se njegova DNK vezivna aktivnost ne razlikuje od odgovarajuće aktivnosti kompleksa

ORC. Utvrđivanje prirode interakcije ovog proteina sa ori-sekvencom doprineće dedukciji opštih svojstava ishodišta replikacije metazoa koja određuju specifičnost vezivanja proteinskog kompleksa ORC i rasvetljavanju mehanizma kojim je regulisana inicijacija replikacije u ćelijama složenih višćelijskih organizama.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Izolovanje genomske DNK

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

#### 3.2. Reakcija lančanog umnožavanja segmenata DNK (PCR)

Fragmenti DNK iz regiona *ori* lamin B2 i B13 dobijani su reakcijom lančanog umnožavanja. Sekvence korišćenih graničnika date su u tabeli 3.1. Reakciona smeša, zapremine 50  $\mu$ l, sadržavala je PCR pufer (10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 800  $\mu$ M smešu dNTP-a, 0,5  $\mu$ M svakog graničnika, 2 U Taq polimeraze i humanu DNK kao matricu (150-300 ng). DNK je umnožavana u 35-45 identičnih ciklusa, uz početnu denaturaciju od 5 min na 94°C i završnu sintezu od 10 min na 72°C. Profil svakog ciklusa umnožavanja je bio sledeći: denaturacija 45 s na 94°C, renaturaciju 30 s na odgovarajućoj temperaturi (tabela 3.1) i sinteza DNK 1 min na 72°C.

Fragment	Graničnik	Sekvenca	Dužina genomske matrice (bp)	Temperatura renaturacije (°C)
lboI	D	CAAAAACGGAGCTGGGCTGCAGCTG (3813-3837)*	240	70
	E	GACATCCGCTTCATTAGGGCAGAGGCC (4052-4026)*		
lboII	Hy51	TTTTTAAGAAGATGCATGCCTAGCGTGTTC (3871-3900)*	317	60
	T	AGAGTCAGCTTGTGCAACAGCGTCG (4187-4163)*		
B13	B13dx	CCTCAGAACCCAGCTGTGGA	164	64
	B13sx	GCCAGCTGGGTGGTGATAGA		

Tabela 3.1. Pregled graničnika korišćenih za umnožavanje DNK.

\*Brojevi odgovaraju poziciji nukleotida u sekvenci deponovanoj u *GenBank*: M94363

Produkti reakcije lančanog umnožavanja su prečišćavani na nativnom poliakrilamidnom gelu i korišćeni u daljem radu.

### 3.3 Elektroforeza DNK u poliakrilamidnom gelu

Fragmenti DNK su razdvajani u 4-10% nativnim poliakrilamidnim gelovima pri konstantnoj voltaži od 10-15 V/cm gela. Za elektroforezu korišćeni su sledeći puferi: TBE (89 mM Tris baza, 89 mM borna kiselina i 2 mM EDTA pH 8,0), TBM<sup>0,1</sup> (89 mM Tris baza, 89 mM borna kiselina i 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>) i TBM (89 mM Tris baza, 89 mM borna kiselina i 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Uzorci su nanošeni na gelove u odgovarajućim puferima za uzorke. Za TBE PAGE korišćen je pufer za uzorak sastava: 50% glicerol u 1xTBE puferu, 0,25% boje xylene cyanole i 0,25% boje bromophenol blue, dok je za TBM<sup>0,1</sup> PAGE upotrebljavan pufer za uzorak sastava: 50% glicerol u dH<sub>2</sub>O, 0,25% boje xylene cyanole i 0,25% boje bromophenol blue.

### 3.4. Izolovanje fragmenata DNK iz poliakrilamidnog gela

Produkti reakcije lančane polimerizacije oslobođani su od nespecifičnih traka i neugrađenih graničnika elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu u 1xTBE puferu. Po završenoj elektroforezi, traka od interesa isecana je sa gela i homogenizovana u 300-450 µl dH<sub>2</sub>O. Dobijena smeša je inkubirana 1h na 37°C u termomikseru na 1400 rpm. Propuštanjem kroz kolonicu iz suspenzije su uklanjani parčići akrilamida, a DNK je potom taložena u etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2) i glikogena u svojstvu nosača. Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u dH<sub>2</sub>O.

### 3.5. Obeležavanje DNK radioaktivnim izotopom <sup>32</sup>P

DNK je obeležavana reakcijom fosforilacije u prisustvu [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP i T4 polinukleotid kinaze. Za obeležavanje graničnika (D, E, Hy51, T), Hy oligonukleotida i monotonih jednolančanih oligonukleotida (poli(dA)<sub>n</sub>, poli(dT)<sub>n</sub>, poli(dC)<sub>n</sub>) reakciona smeša, zapremine 25 µl, sadržavala je graničnik (12 pmol) ili monotoni oligonukleotid (10 pmol) ili Hy oligonukleotid (10 pmol), 1xpufer za fosforilaciju (USB), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (10 pmola) i 20-30 U T4 kinaze (USB).

Reakcija fosforilacije se odvijala 30 min na 37°C, a zaustavljanja je inkubacijom 10 min na 65°C. Neugrađeni radioaktivni nukleotidi uklanjani su iz reakcije metodom

molekulskog sejanja kroz G-25 sefadeks kolonice (Amersham Bioscience), po uputstvu proizvođača. Količina radioaktivnog izotopa inkorporiranog u fragment DNK merena je u scintilacionom brojaču za tečne uzorke.

Obeleženi graničnici korišćeni su za dobijanje radioaktivno obeleženih fragmenata genomske DNK reakcijom lančanog umnožavanja, a monotoni jednolančani oligonukleotidi za formiranje kratkih dvo- i trolančanih fragmenata.

Obeležavanje DNK lestvice od 10 bp i 20 bp vršeno je u reakcionoj smeši (25  $\mu$ l) koja je sadržavala DNK lestvicu (100 ng), 1xpufer za fosforilaciju (USB), [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (2 pmol) i 10 U T4 kinaze (USB). Po inkubaciji na 37°C u trajanju od 30 min, reakciona smeša je propuštana kroz G-25 kolonicu i precipitirana dodavanjem glikogena i Na-acetata (pH 5,2) u 95% etanolu. Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u sterilnoj dH<sub>2</sub>O. Ovako obeležena lestvica je korišćena na nativnim i denaturišućim poliakrilamidnim gelovima kao standard dužine fragmenata DNK.

### 3.6. Reakcije sa hemijskim agensima specifičnim za neortodoksne strukture DNK

U hemijskim esejima korišćeni su fragmenti IboI i IboII dobijeni reakcijom lančane polimerizacije u kojoj je samo jedan od graničnika bio radioaktivno obeležen. Nakon reakcije sa odgovarajućim hemijskim agensom, modifikovani produkti razdvajani su u 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu. Po završetku elektroforeze gel je sušen pod vakuumom 45min na 80°C i autoradiografisan.

#### 3.6.1. Modifikacija DNK dietilpirokarbonatom (DEPC)

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

### 3.6.2. Modifikacija DNK osmijumtetraoksidom ( $\text{OsO}_4$ )

Reakcione smeše, tretirane  $\text{OsO}_4$ , sadržavale su radioaktivno obeležen fragment DNK (125 fmol), 10  $\mu\text{g}$  poli(dIdC)-poli(dIdC), 2  $\mu\text{l}$  piridina i pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,1 mM ATP; 10% glicerol) u zapremini od 24  $\mu\text{l}$ . Po dodavanju 2%  $\text{OsO}_4$  (30  $\mu\text{l}$ ), uzorci su inkubirani 25 min na ledu uz povremeno vorteksovanje. Reakcija je zaustavljena precipitacijom DNK u apsolutnom etanolu uz prisustvo Na-acetatog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran 70% etanolom, sušen pod vakuumom i tretiran piperidinom.

### 3.6.3. Sekvenciranje DNK metodom Maxam-Gilbert-a

Purinske baze u fragmentima DNK detektovane su sekvenciranjem po Maxam-Gilbert-ovom principu. Reakciona smeša, zapremine 10  $\mu\text{l}$ , sadržavala je radioaktivno obeležen DNK fragment (50-250 fmol) i 1  $\mu\text{g}$  poli(dIdC)-poli(dIdC). Dodavanjem 4% mravlje kiseline (1  $\mu\text{l}$ ) i inkubacijom 25 min na 37°C modifikovane su purinske baze, a zatim je modifikovana DNK depurinisana i isprekidana piperidinom.

### 3.6.4. Tretman DNK piperidinom

Uklanjanje modifikovanih baza i stvaranje jednolančanih prekida u molekulu DNK je vršeno dodavanjem 150  $\mu\text{l}$  1M piperidina po jednom uzorku. Reakciona smeša je inkubirana 30 min na 90°C, a potom hladena 5 min na ledu. Ovako fragmentisana DNK oslobađana je od piperidina uzastopnim ekstrakcijama *n*-butanolom. Prvo je dodavan 1 ml *n*-butanola, smeša je vorteksovana i centrifugirana, 10 min na 11400 g. Po uklanjanju supernatanta, u talog je dodavan *n*-butanol (1 ml) i 1% SDS (150  $\mu\text{l}$ ), a smeša je vorteksovana i centrifugirana 3 min na 11400 g, nakon čega je odstranjen supernatant. Uzorak je potom ispiran dva puta sa po 0,5 ml *n*-butanola, osušen pod vakuumom, i precipitiran u apsolutnom etanolu pomoću glikogena i Na-acetatnog pufera (pH 5,2). Talog je ispiran tri puta hladnim 70% etanolom, sušen pod vakuumom i rastvaran u puferu za nanošenje uzoraka na denaturišići gel (95% dejonizovan formamid; 0,37%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  pH 7,0; 0,3% boja xylene cyanole i 0,3% boja bromophenol blue). Kod produkata reakcije sekvenciranja



tretiranih piperidinom korak precipitacije je izostajao. Pre nanošenja na gel, uzorci su denaturisani 5 min na 95°C.

### 3.7. Hidroliza DNK Dezoksiribonukleazom I (DNaza I)

Fragmenti lboI korišćeni za digestiju enzimom DNaza I su dobijani reakcijom lančane polimerizacije u kojoj je samo jedan od graničnika bio radioaktivno obeležen. Pre enzimske reakcije, uzorci su inkubirani u puferu za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), 2h na 25°C. Parcijalna hidroliza vršena je u smeši zapremine 4-6 µl. 300-400 fmola probe je tretirano sa 0,3 U DNaze I (Amersham Bioscience) u prisustvu 1 µg nespecifične DNK (poli(dGdC)-poli(dGdC)), a enzim je razblaživan u dilucionom puferu (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol). Do dodavanja endonukleaze reakcione smeše su držane na ledu, a sama reakcija odvijala se na sobnoj temperaturi. Uvek je rađena kinetika reakcije u 3 ili 4 tačke, a vremenski intervali su varirali od uzorka do uzorka (1-2 min). Reakcije su zaustavljane dodavanjem iste zapremine stop pufera (200 µg/ml proteinaze K; 10 mM EGTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) i inkubiranjem 1h na 55°C. Uzorci su pripremani za elektroforezu dodavanjem iste zapremine pufera za nanošenje uzoraka (95% dejonizovan formamid; 0,37% Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,0; 0,3% boja xylene cyanole i 0,3% boja bromophenol blue) i potonjim denaturisanjem 5 min na 95°C. Produkti sečenja DNazom I su razdvajani u 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu.

### 3.8. Analiza pokretljivosti DNK fragmenata u nativnom poliakrilamidnom gelu

Promene u konformaciji fragmenata lboI i lboII ispitivane su na 8% nativnim poliakrilamidnim gelovima pripremljenim sa TBE ili TBM puferom. Pre elektroforeze, vršeno je inkubiranje obeleženih uzoraka DNK preko noći u različitim puferima i na 25°C. Standardna inkubaciona smeša zapremine 10 µl, sadržavala je 10-50 fmola probe, a puferi korišćeni u ovom eseju bili su: pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), pufer za vezivanje sa sperminom (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol, 50 µM spermin), pufer sa

glicerolom (25 mM Hepes pH 7,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% glicerol) i pufer sa etilen glikolom (25 mM Hepes pH 7,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10% etilen glikol).

Uzorci su analizirani elektroforezom u gelovima dužine 24 cm na 4°C. Putovanje fragmenata određivano je u odnosu na standard DNK od 10 ili 20 bp.

### 3.9. Hibridizacija fragmenta lboI sa jednolančanim oligonukleotidima

#### 3.9.1. Hibridizacija sa oligonukleotidima Hy

Fragment lboI korišćen u reakciji hibridizacije sintetisan je reakcijom lančanog umnožavanja kao što je već opisano (videti 3.2), jedina je razlika što su korišćeni graničnici na 5' kraju imali vezan biotin. Pre reakcije hibridizacije fragment je inkubiran 5 min na 65°C u puferu b (20 mM Hepes pH 7,9; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) i propuštan kroz sefadesks G-25 kolonicu (Amersham Bioscience), prethodno ekvilibrisanu istim puferom. Za hibridizaciju su korišćeni radioaktivno obeleženi jednolančani tridesetomeri Hy51, Hy52, Hy31 i Hy32 čija je sekvenca prikazana u tabeli 3.2.

oligonukleotid	sekvenca	
Hy52	CTGGCATGGACTTTCATTTCAGAGATTCGG	(3841-3870)*
Hy51	TTTTTAAGAAGATGCATGCCTAGCGTGTTTC	(3871-3900)*
Hy31	CCAATGATTTGTAATATACATTTTATGACT	(3911-3940)*
Hy32	GGAAACTTTTTTGTACAACACTCCAATAAA	(3941-3970)*

Tabela 3.2. Sekvence oligonukleotida korišćenih u hibridizaciji sa fragmentom lboI.

\*Brojevi odgovaraju poziciji nukleotida u sekvenci deponovanoj u *GenBank*: M94363

Hibridizaciona smeša, zapremine 30 µl, sadržavala je 1x pufer b, biotinom obeležen fragment lboI (500 fmol) i oligonukleotid <sup>32</sup>P-Hy (0,8 - 1 pmol). Vezivanje je vršeno na 37°C dva sata. Za svaki oligonukleotid rađene su 2 identične reakcije i jedna kontrolna, u koju nije dodavana *ori* DNK. Po završetku hibridizacije u jednu reakciju je dodavan EDTA do finalne koncentracije od 10 mM, dok je u kontrolnu i drugu reakciju dodavana ista zapremina pufera b.

Smeše su oslobađane nehibridizovanih jednolančanih oligomera vezivanjem fragmenta lboI za streptavidinska magnetna zrnca (Roche) i potonjim ispiranjem

magnetnih zrnaca u rastvoru visoke jonske jačine. Korišćeno je 20  $\mu$ l magnetnih zrnaca po jednoj reakcionoj smeši. Pre upotrebe zrnca su najpre ispirana 3 puta sa duplo većom zapreminom TEN<sub>100</sub> pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl). Pri poslednjem ispiranju u pufer je dodat 1  $\mu$ g poli(dIdC)·poli(dIdC) i 1  $\mu$ g oligonukleotida Hy sa kojim je rađena hibridizacija. Vezivanje stvorenih hibrida za magnetna zrnca odvijalo se na sobnoj temperaturi jedan sat uz blagu agitaciju. Zrnca su potom 3 puta ispirana sa po 100  $\mu$ l TEN<sub>1000</sub> pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1000mM NaCl) i 2 puta sa po 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Talog je rastvaran u 10  $\mu$ l pufera za nanošenje uzoraka na denaturišuće gelove (95% dejonizovan formamid; 0,37% Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,0; 0,3% boja xylene cyanole i 0,3% boja bromophenol blue). Denaturacija hibrida lboI/Hy vršena je inkubacijom 5 min na 95°C. Zrnca sa vezanim fragmentom lboI skupljena su pomoću magnetnog stalka, a merenjem dobijenog supernatanta u scintilacionom brojaču određivana je količina oligonukleotida koji je hibridizovao sa fragmentom lboI.

### 3.9.2. Hibridizacija sa poli(dT)<sub>40</sub> oligonukleotidom

Vezivanje oligonukleotida poli(dT)<sub>40</sub> za fragment lboI odvijalo se u puferu za vezivanje sa sperminom (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol, 50  $\mu$ M spermin). Hibridizaciona smeša, zapremine 10-20  $\mu$ l, sadržavala je molekul lboI (500 fmol) i 2-5 puta veću količinu radioaktivno obeleženog četrdesetomera poli(dT). Reakciona smeša inkubirana je preko noći na 25°C. Produkti reakcije analizirani su u 8% poliakrilamidnim gelovima dužine 24 cm sa TBM puferom na 4°C.

### 3.10. Formiranje trolančanih molekula DNK

#### 3.10.1. Formiranje kratkih trolančanih molekula DNK

Kratki trolančani fragmenti su dobijani hibridizacijom jednolančanih oligonukleotida. Za formiranje tripleksa TAT i AAT korišćeni su oligonukleotidi poli(dA)<sub>n</sub> i poli(dT)<sub>n</sub> (n = 34 ili 40), a za formiranje tripleksa GGC oligonukleotidi poli(dC)<sub>34</sub> i poli(dG)<sub>34</sub>. Da bi odredili odnos jednolančanih konstituenata potreban za formiranje trolančanih molekula, radioaktivno obeleženi poli(dA)<sub>n</sub>, poli(dT)<sub>n</sub> ili

poli(dC)<sub>34</sub> inkubirani su sa neobebeženim komplementarnim lancima u rastućim količinama. Reakcione smeše, zapremine 5-10  $\mu$ l, sadržavale su pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), radioaktivno obeleženi oligonukleotid (5-12 fmol) i sledeće neobebežene nukleotide: poli(dT)<sub>n</sub>, u 1-100 puta molarnom višku ili poli(dG)<sub>34</sub>, u 1-20 puta molarnom višku, ili poli(dA)<sub>n</sub> u 1-50 puta molarnom višku u odnosu na obeleženi oligomer. Smeše su inkubirane 30 min na 37°C, a produkti reakcije su analizirani na 10% poliakrilamidnim gelovima. Nakon elektroforeze gelovi su sušeni pod vakuumom i autoradiografisani.

U eksperimentima kompeticije je korišćen 100-1000 puta molarni višak trolančane DNK u odnosu na radioaktivno obeleženu probu. Količina tripleksa odgovarala je količini upotrebljenog poli(dA)<sub>n</sub> za njegovo formiranje. Tripleksi su pripremani od neobebeženih jednolančanih fragmenata u ukupnoj zapremini od 3  $\mu$ l. Formiranje molekula TAT vršeno je u prisustvu 50 ili 100 puta molarnog viška poli(dT)<sub>n</sub> u odnosu na poli(dA)<sub>n</sub>, dok je za dobijanje GGC molekula korišćen 10 puta molarni višak poli(dG)<sub>34</sub> u odnosu na poli(dC)<sub>34</sub>. U kontrolnim reakcijama kompeticije korišćeni su neobebeženi jedno- i dvolančani kratki fragmenti DNK. Dvolančani kompetitori pripremani su od odgovarajućih komplementarnih lanaca, prisutnih u ekvimolarnim količinama i primenjeni u istoj količini kao i trolančani oligomeri. Jednolančani kompetitori, poli(dT)<sub>n</sub> ili poli(dG)<sub>34</sub>, primenjeni su u istoj količini kao i za formiranje trolančani oligomera.

### 3.10.2. Formiranje dugih trolančanih molekula DNK

Dugi trolančani molekuli su formirani inkubacijom monotonog kopolimera poli(dA)·poli(dT) (Amersham Bioscience) sa jednolančanim fragmentom poli(dT)<sub>n</sub> (n = 34 ili 40). Reakciona smeša, zapremine 10-23  $\mu$ l, sadržavala je pufer za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol), 2 ng polimera poli(dA)·poli(dT) i 300 fmol-a radioaktivno obebeženog fragmenta poli(dT)<sub>n</sub>. Hibridizacija se odvijala 30 min na 37°C. U smeše je dodavana 1/10 zapremine pufera za uzorak (50% glicerol i 0.05% boja Orange G) i produkti reakcije su analizirani dvodimenzionalnom elektroforezom u 1% agaroznom gelu sa TBM puferom pri temperaturi od 4°C. Nakon elektroforeze gelovi su sušeni pod vakuumom 2 sata na 60°C i autoradiografisani.

U eksperimentima kompeticije je korišćen 5-10 puta molarni višak dugih trolančanih molekula DNK u odnosu na radioaktivno obeleženu probu. Količina tripleksa odgovarala je količini dvolančanih kopolimera upotrebljenoj za njihovo formiranje. Dugi tripleksi formirani su u zapremini od 3  $\mu$ l sa 300 puta molarnim viškom neobebeženog fragmenta poli(dT)<sub>n</sub> u odnosu na kopolimer poli(dA)·poli(dT). Kontrolne reakcije kompeticije, sa dvo- ili jednonančanim molekulima, sadržavale su istu količinu molekula poli(dA)·poli(dT) ili poli(dT)<sub>n</sub> upotrebljenih za formiranje tripleksa.

### 3.11. Izolovanje rekombinantnog proteina HsOrc4

Za izučavanje protein-DNK interakcije korišćen je rekombinantni protein HsOrc4, kloniran u bakterijskom ekspresionom vektoru pQE-30 (Qiagen) i eksprimiran u bakterijskom soju M15(pREP4). Vektor pQE-30 sadrži kodirajuću sekvencu za 6 histidina na 5' kraju regiona za kloniranje koja se nalazi u fazi sa otvorenim okvirom čitanja gena HsOrc4, tako da eksprimirani rekombinantni protein sadrži histidinski epitop na N-terminalnom kraju.

#### 3.11.1. Indukcija ekspresije rekombinantnog proteina HsOrc4

Transkripcija rekombinantnog proteina HsOrc4 u vektoru pQE-30 regulisana je fagnim promotora T5 i dvema sekvencama *lac* operatora. Bakterijski soj M15 (pREP4) konstitutivno eksprimira *lac* represor protein sa plazmida pREP4 i na taj način reprimira ekspresiju gena HsOrc4. Indukcija ekspresija vrši se dodavanjem IPTG-a (izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid) koji se vezuje za *lac* represor protein i inaktivira ga.

Bakterijski klon proteina HsOrc4 zasejavan je sa sveže petri šolje ili iz glicerolskog stoka u 50 ml LB medijuma sa antibioticima (ampicilin 100  $\mu$ g/ml, kanamicin 25  $\mu$ g/ml). Kultura je inkubirana preko noći na 25°C uz lagano mućkanje. Sledećeg dana 10 ml prekončne kulture razblaživano je 40 puta LB medijumom sa antibioticima i inkubacija je nastavljena na 25°C uz lagano mućkanje. Kada su bakterije bile u logaritmskoj fazi rasta ( $OD_{600}$  0,5-0,7), indukovana je ekspresija rekombinantnog proteina dodavanjem IPTG-a (u finalnoj koncentraciji 0,2 mM) i

kultura je inkubirana još 2 sata pod istim uslovima. Nakon toga, bakterijske ćelije su taložene centrifugiranjem 20 min pri sili od 4000 g, na 4°C. Talози su zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -20°C.

### 3.11.2. Prečišćavanje rekombinantnog proteina HsOrc4

Za efikasno prečišćavanje proteina korišćen je sistem The QIAexpressionist (Qiagen) zasnovan na afinitetnoj hromatografiji. Histidinski repić rekombinantnog proteina vezuje se za metalni jon ( $\text{Ni}^{2+}$ ) imobilisan preko helatora metala za smolu. Elucija vezanih proteina vrši se visokim koncentracijama imidazola koji kompetira histidinima za vezivanje sa metalnim jonom na smoli.

Bakterijski talog iz 250 ml kulture je resuspendovan u 10 ml litičkog pufera (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.0; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; smeša proteinaznih inhibitora (Complete, EDTA free, Roche)). Ćelije su lizirane 30 min na ledu, u prisustvu lizozima (1 mg/ml). Kratkom sonikacijom (sonikator Sonic dismembrator model 300, Fisher), sa tri pulsa 70-80% maksimalne jačine u trajanju od 15 s na ledu, fragmentisana je genomska DNK bakterija. Sonikat je oslobađan ćelijskih ostataka centrifugiranjem 30 min na 7500 g na 4°C. U bistri supernatant je potom dodavano 250  $\mu\text{l}$  50% Ni-NTA agaroze prethodno dva puta oprane sa po 500  $\mu\text{l}$  litičkog pufera. Posle jednočasovne inkubacije proteinskog lizata i Ni-NTA agaroze na 4°C i uz blago mućkanje, matriks sa vezanim proteinima je obaran centrifugiranjem 5 min na 480 g. Nespecifično vezani proteini su odstranjivani sa Ni-NTA agaroze puferom za pranje (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol). Matriks je ispiran 3 puta sa po 2,5 ml pufera za pranje u trajanju od 10 min na 4°C. Proteini vezani za smolu su eluirani 3 puta u trajanju od pola sata sa po 500  $\mu\text{l}$  pufera za eluciju nativnih proteina (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.0; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol).

Ovako prečišćen protein HsOrc4 dijalizovan je preko noći na 4°C u puferu za dijalizu (20 mM Hepes pH 7,9; 30 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 6 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,1 mM ATP; 1 mM DTT; 50% glicerol; 0,1-1 mM PMSF). Koncentracija proteina je određivana metodom Bradforda (BioRad), po uputstvu proizvođača. Dijalizovani uzorci su alikvotirani i čuvani na -70°C do upotrebe.

Efikasnost prečišćavanja analizirana je SDS elektroforezom u poliakrilamidnim gelovima.

### 3.12. Elektroforeza proteina

Uzorci proteina su razdvajani elektroforezom u 12% SDS poliakrilamidnim gelovima u puferu sastava: 25 mM Tris baza, 192 mM glicin i 0,1% SDS. Uzorcima je dodavana ista zapremina dva puta koncentrovanog pufera za uzorak (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 715 mM  $\beta$ -merkaptoetanol; 0,02% boja bromophenol blue), a pred nanošenje na gel proteini su denaturisani 2 min na 95°C. Posle elektroforeze, gelovi su bojani komasi plavim (0,4% comassie blue; 10% sirćetna kiselina; 40% metanol) i odbojavani u rastvoru 7% sirćetne kiseline i 25% metanola.

### 3.13. Prenos proteina na membranu

Proteini razdvojeni elektroforezom na SDS poliakrilamidnom gelu prenošeni su na membranu polusuvim transferom. Nakon završene elektroforeze gel je inkubiran 5 min u katodnom puferu (25 mM Tris-HCl pH 9,4; 40 mM glicin; 20% metanol). Membrana, na koju je vršen prenos proteina iz gela, pripremana je na sledeći način: najpre je potapana 10 s u metanol (jer je hidrofobna), zatim je dva puta prana destilovanom vodom (prvi put 5 s, drugi put 5 min i na kraju inkubirana 5 min u anodnom puferu II (25 mM Tris-HCl pH 10,4; 20% metanol).

Membrana i gel su slagani u sendvič između elektroda sledećim redosledom: anoda je pokvašena anodnim puferom I (300 mM Tris-HCl pH 10,4; 20% metanol) i na nju su stavljena 3 parčeta filter papira (Watman 3 MM) - donja dva natopljena u anodnom puferu I, a gornje u anodnom puferu II, potom je položena membrana, pa gel i na kraju opet 3 parčeta 3 MM papira natopljena u katodnom puferu. Aparatura je zatvarana postavljanjem katode na složeni sendvič. Transfer je vršen 1h pri snazi od 5 mA/cm<sup>2</sup> gela. Za prenos proteina korišćena je Immobilon-P membrana za transfer (Millipore) od polivinilden fluorida (PVDF).

### 3.14. Western blot analiza

Za detekciju proteina korišćene su dve vrste primarnih antitela – mišje monoklonsko antitelo na histidinski epitop (Qiagen) i mišje poliklonsko antitelo na

protein HsOrc4 koje je proizvela dr Snežana Kojić u Internacionalnom centru za genetički inženjering i biotehnologiju u Trstu. Sekundarna antitela bila su konjugovana sa alkalnom fosfatazom i prepoznavala su mišje proteina (Sigma).

Posle završenog prenosa proteina, membrana je inkubirana 1h na sobnoj temperaturi (ili preko noći na 4°C) u PBS puferu (50 mM K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2; 150 mM NaCl) kome je bilo dodato 10% obrano mleko u prahu i 0,05% Tween20. Pre inkubacije sa primarnim antitelom, membrana je ispirana nekoliko puta rastvorom PBS pufera sa 0,05% Tween20. Antitelo na histidinski epitop razblaživano je 750 puta, a antitelo na protein HsOrc4 400 puta u PBS puferu sa 5% posnim mlekom i 0,05% Tween20. Membrana je inkubirana u rastvoru razblaženog primarnog antitela jedan do dva sata na sobnoj temperaturi uz konstantno mućkanje. Nespecifično vezano primarno antitelo je uklanjano pranjem membrane 3 puta po 10 min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,05% Tween20. Membrana je zatim inkubirana sa sekundarnim antitelom (10000x razblaženim u rastvoru PBS puferu sa 5% bezmasnim mlekom i 0,05% Tween20) jedan sat na sobnoj temperaturi uz konstantno mućkanje. Pre detekcije, nespecifično vezano sekundarno antitelo je uklanjano pranjem membrane 3 puta po 10 min rastvorom 1x PBS pufera sa 0,05% Tween20. Signal je detektovan supstratima NBT (nitroblue tetrazolium chloride) finalne koncentracije 330 µg/ml i BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) finalne koncentracije 165 µg/ml koji su razblaženi u AP puferu (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Za vreme detekcije membrana je bila zaštićena od dejstva svetlosti. Bojena reakcija je prekidana pranjem membrane u destilovanoj vodi i sušenjem.

### 3.15. Ispitivanje interakcije proteina i DNK

Interakcije protein i DNK ispitivane su metodom kašnjenja kompleksa protein-DNK u poliakrilamidnom gelu (EMSA – Electrophoretic mobility shift assay). Nakon elektroforeze gelovi su sušeni pod vakuumom i autoradiografisani.

#### 3.15.1. Vezivanje proteina HsOrc4 za DNK

Kao izvor proteina korišćen je rekombinantni protein HsOrc4 eksprimiran u bakterijama i izolovan u nativnim uslovima (videti 3.11).



Vezivanje za radioaktivno obeležen fragment lboI odvijalo se u puferu za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9; 30 mM NaCl; 6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 10% glicerol; 1 mM DTT) sa ili bez 0,1 mM EDTA. Reakciona smeša, zapremine 10-15 µl, sadržavala je 50-500 ng proteina HsOrc4, 5-20 fmola probe i nespecifični kompetitor poli(dGdC)·(dGdC), prisutan u 100 puta težinskom višku u odnosu na probu. Nakon inkubacije od 30 min na sobnoj temperaturi dobijeni kompleksi su razdvajani u 4% nativnim poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom.

Kompetitivno vezivanje proteina HsOrc4 za <sup>32</sup>P-lboI vršeno je u prisustvu kratkih ili dugih trolančanih molekula DNK, ili njihovih dvolančanih i jednolančanih konstituenata (videti 3.10). Protein je prvo inkubiran sa kompetitorskom DNK 30 min na sobnoj temperaturi, a potom je u reakciju dodavan radioaktivno obeležen fragment lboI i inkubacija nastavljena još 30 min. Reakciona smeša, zapremine 10-15 µl, sadržavala je pufer za vezivanje bez EDTA, 100 puta težinski višak nespecifičnog kompetitora poli(dGdC)·(dGdC), 100-1000 puta molarni višak (kratkih) ili 5-10 puta molarni višak (dugih) trolančanih molekula, HsOrc4 protein (500 ng) i <sup>32</sup>P-lboI (5-10 fmola). Produkti reakcije analizirani su u 4% nativnim poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom.

Vezivanje proteina HsOrc4 za radioaktivno obeležene jednolančane (dA)<sub>40</sub>, dvolančane (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> i trolančane (dT)<sub>40</sub>·(dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> oligonukleotide vršeno je u puferu za vezivanje bez EDTA, 30 min na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša, zapremine 10-15 µl, sadržavala je 1-2 µg proteina HsOrc4, probu (10-50 fmol) i nespecifični kompetitor (poli(dGdC)·(dGdC)) u 100 puta težinskom višku u odnosu na probu. Dvolančana i trolančana proba bile su pripremljene od odgovarajućih jednolančanih oligonukleotida u puferu za vezivanje bez EDTA, 30 min na 37 °C. Za dobijanje fragmenta (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> korišćene su ekvimolarne količine radioaktivno obeleženog poli(dA)<sub>40</sub> i neobeleženog poli(dT)<sub>40</sub>, dok je za formiranje tripleksa korišćen 100 puta molarni višak neobeleženog poli(dT)<sub>40</sub> u odnosu na radioaktivno obeleženi poli(dA)<sub>40</sub>. Produkti reakcije vezivanja sa proteinom HsOrc4 analizirani su u 4% nativnim poliakrilamidnim gelovima sa TBM puferom. Elektroforeza je tekla na 4°C.

nastavljena još 30 min. Produkti reakcije razdvajani su u 4% nativnim poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom.

## 4. REZULTATI

Eksperimenti koji će biti opisani u ovom odeljku odnose se na problem selekcije ori-sekvenci višćelijskih eukariota i imaju za cilj utvrđivanje prirode protein-DNK interakcija na odabranoj ori-sekvenci humanog porekla. Studija je urađena u *in vitro* uslovima, na modelu koji je uključivao ori-sekvencu lamin B2 i rekombinantni protein HsOrc4. Prvim delom studije obuhvaćeno je ispitivanje karakterističnih strukturnih elemenata ori-sekvence, a drugim uticaj strukturnih elemenata na specifičnost interakcije između DNK i proteina HsOrc4. Za ispitivanje strukture korišćeni su hemijski agensi specifični za elemente koji odstupaju od kanonske, B-forme DNK i različiti elektroforetski eseji, a protein-DNK interakcije praćene su posredstvom elektroforetske pokretljivosti proteina u kompleksu sa različitim neortodoksnim DNK.

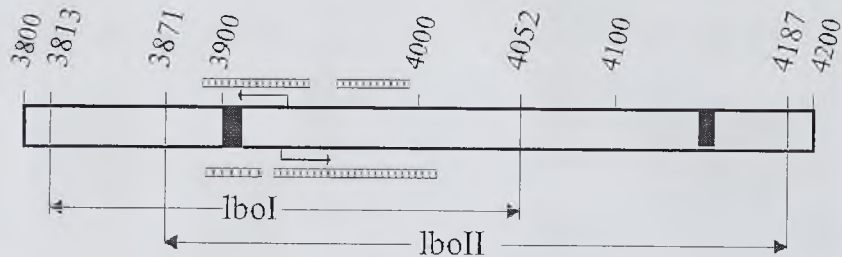
Na osnovu eksperimentalnih rezultata predložen je strukturni model humane ori-sekvence lamin B2 i utvrđeno na koji način neortodoksna struktura *ori* DNK utiče na vezivanje proteina HsOrc4.

### 4.1. Ispitivanje strukture i oblika ori-sekvence lamin B2

Ori-sekvencija lamin B2 mapira na hromozomu 19 u traci p13.3 i aktivna je u čitavom nizu humanih ćelija u kulturi. Dugačka je nekoliko stotina baznih parova i sadrži jedinstveno mesto inicijacije sinteze DNK (Giacca et al., 1994). U ćelijama koje se dele, *ori* lamin B2 vezuje univerzalni eukariotski inicijator, proteinski kompleks ORC, a celokupni obrazac vezanih proteina varira u skladu sa promenama faza ćelijskog ciklusa (Abdurashidova et al., 1998). U uslovima *in vitro*, *ori* lamin B2 vezuje kompleks ORC i to, po svoj prilici, preko svoje subjedinice HsOrc4 (Stefanović et al., 2003). Za eksperimente koji slede posebno je značajno da *ori* lamin B2 zadržava aktivnost na ektopičnim hromozomskim lokacijama (Paixao et al., 2004), što pokazuje da su elementi odgovorni za inicijaciju sadržani u sekvenci ili strukturi prenesene DNK.

Za potrebe ovih eksperimenata iz regiona *ori* lamin B2 izolovana su dva fragmenta - lboI (3813-4052) i lboII (3871-4187), koji se delimično prekrivaju (slika 4.1). Oba fragmenta u sebi sadrže mesto otpočinjanja bidirekcionog sinteze

DNK, kao i regione koji interaguju sa inicijacionim proteinom ORC. Fragmenti su generisani PCR-om, pri čemu je samo jedan od graničnika bio radioaktivno obeležen na 5' kraju. Na ovaj način posebno su detektovane promene u gornjem ili donjem lancu molekula DNK. Struktura ori-sekvence lamin B2 ispitivana je hemijskim agensima specifičnim za neortodoksne forme DNK i parcijalnom hidrolizom enzimom DNaza I.

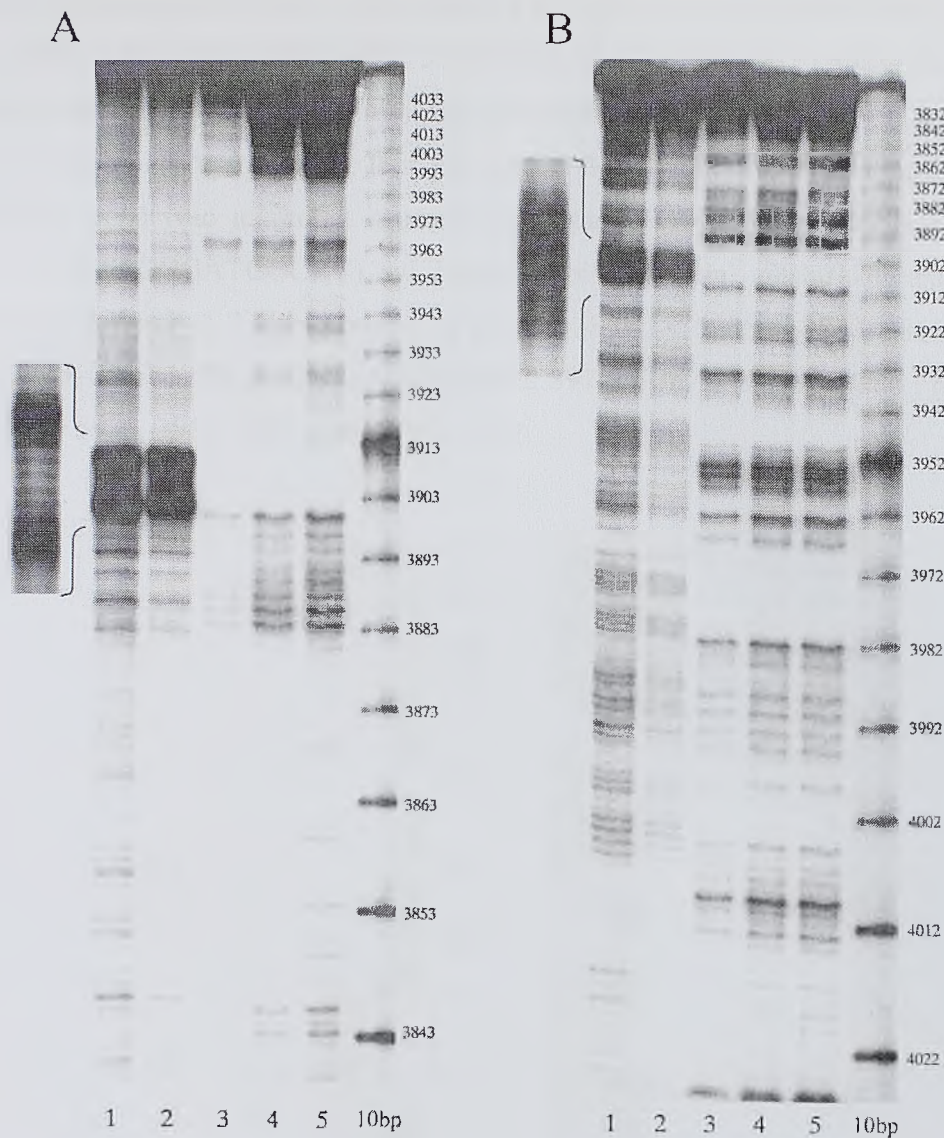


Slika 4.1. Šematski prikaz ispitivanog regiona ori-sekvence lamin B2.

Brojevi odgovaraju poziciji nukleotida u sekvenci deponovanoj u bazi podataka (*GenBank*: M94363).  $\leftarrow \square \rightarrow$  - mesto otpočinjanja bidirekcionne sinteze DNK,  $\blacksquare$  - pozicija dva najduža niza (dT)·(dA) u *ori* lamin B2,  $\square$  - proteinima zaštićen region u G1 fazi ćelijskog ciklusa.

#### 4.1.1. Detekcija alternativnih struktura DEPC-om, OsO<sub>4</sub>-om i DNazom I

Hemijski eseji korišćeni za utvrđivanje strukture DNK zasnivaju se na modifikaciji baza različitim hemijskim agensima i potonjem tretmanu piperidinom, što dovodi do isecanja modifikovane baze i stvaranja jednolančanog prekida u molekulu DNK. Specifičnost interakcije zavisi od tipa nukleotida i strukture DNK u kojoj se dati nukleotid nalazi. U ovom radu korišćena su dva hemijska agensa: osmijumtetraoksid (OsO<sub>4</sub>), koji u prisustvu piridina efikasno modifikuje timin (i u manjem stepenu citozin) kada se oni nalaze u formi jednolančane DNK, i dietilpirokarbonat (DEPC), koji reaguje sa purinskim bazama kada su one u *syn* konformaciji ili u nesparenim regionima molekula DNK. Pošto su regioni ori-sekvenci bogati kratkim nizovima T·A, u kojima su pirimidini pretežno prisutni u jednom od komplementarnih lanaca, svaki lanac tretiran je odgovarajućim agensom. Gornji lanac ori-sekvence lamin B2, bogat pirimidinima, tretiran je OsO<sub>4</sub>, dok je donji lanac, bogat purinima, analiziran DEPC-om. Na slici 4.2. prikazan je obrazac traka dobijen nakon tretmana fragmenta lboI.



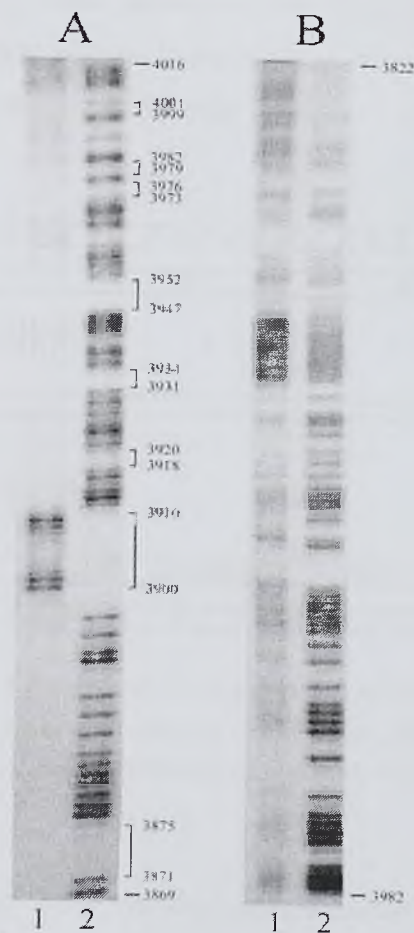
Slika 4.2 Modifikacija fragmenta lboI OsO<sub>4</sub>-om i DEPC-om.

A) Lanac bogat pirimidinima - modifikacija OsO<sub>4</sub>-om (1,2) i parcijalna hidroliza enzimom DNaza I (3,4,5). B) Lanac bogat purinima - modifikacija DEPC-om (1,2) i parcijalna hidroliza enzimom DNaza I (3,4,5). 10bp označava standardnu lestvicu DNK sačinjenu od rastućih fragmenata koji se međusobno razlikuju za deset baznih parova. Sa leve strane hemijskih eseja, u panelima A i B, prikazana je detaljna slika regiona 3898-3913.

U gornjem lancu fragmenta lboI izrazitu reaktivnost na OsO<sub>4</sub> pokazala je sekvenca CTTTTTTTTTCC koja obuhvata nukleotide na poziciji od 3900-3912 i predstavlja najduži niz timina u ispitivanom fragmentu. Intenzitet modifikacije bio je najslabiji u sredini sekvence, a povećavao se ka krajevima. Ostalih 9 nizova poli(dT)<sub>3-6</sub>, prisutnih u pirimidinskom lancu fragmenta lboI, nije pokazivalo reaktivnost.

Osetljivost na dejstvo  $\text{OsO}_4$ -a primećena je i kod pirimidina na poziciji 3883, 3887, 3891, 3894, 3896, 3922, 3925, 3927, 3940, 3952, 3954, 3962, 3967 i 4023-4024, dok su slabu reaktivnost pokazivali timini u regionu 3991-3995 i 4003-4007.

U donjem lancu fragmenta IboI niz purina GAAAAAAAAAAGG na poziciji 3900-3912 pokazivao je veoma izraženu modifikaciju DEPC-om. U regionu 3883-3897 (ACGTACGGATCGCAC) svi purini su bili reaktivni. Slabu interakciju sa DEPC-om pokazali su i nizovi purina na poziciji 3851-3855, 3857-3860, 3866-3868, 3871-3875, 3919-3920, 3932-3934, 3946-3952, 3974-3976, 3980-3982, kao i guanini na poziciji 3939, 3956, 3959, 3961, 3991-3912.



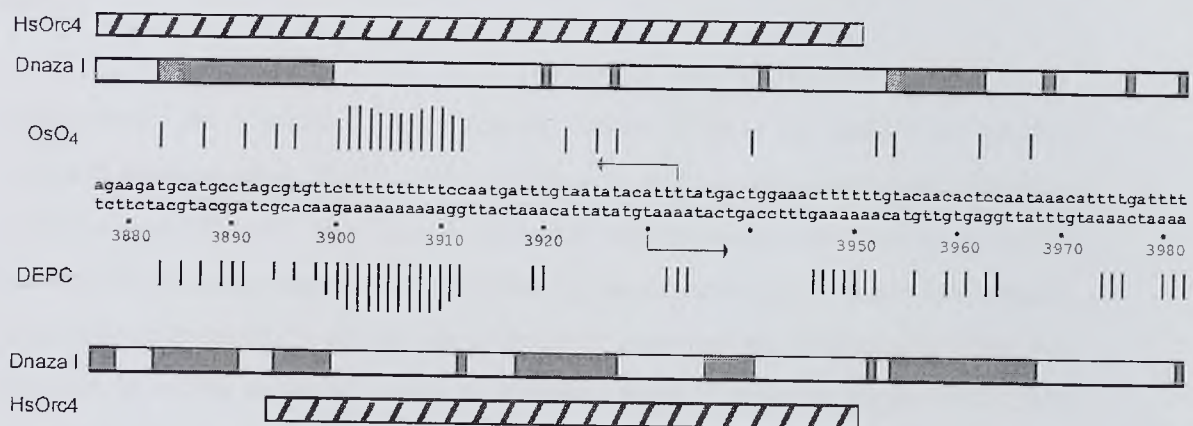
Slika 4.3. Hemijske reakcije fragmenta IboI sa agensima specifičnim za neortodoksnu DNK (kratka ekspozicija).

A) Lanac bogat pirimidinima tretiran  $\text{OsO}_4$ -om (1) i njegova G+A sekvenca određena po metodi Maksama i Gilberta (2). Sa desne strane označeni su položaji nizova poli(dT)<sub>3-10</sub>. B) Lanac bogat purinima tretiran DEPC-om (1) i njegova G+A sekvenca određena po metodi Maksama i Gilberta (2).

Nakon kraće ekspozicije odgovarajućih gelova, uočeno je da je, i u gornjem i u donjem lancu fragmenta lboI, najizraženija reaktivnost nukleotida u regionu 3900-3912 (slika 4.3).

Budući da upotrebljeni hemijski agensi prevashodno reaguju sa jednolančanim regionima DNK, fragment lboI takođe je tretiran i DNazom I koja najefikasnije hidrolizuje dvolančanu DNK, a neefikasna je prema jednolančanim ili trolančanim regionima. Nakon parcijalne digestije DNK ovim enzimom analizirana su mesta sečenja u gornjem i donjem lancu fragmenta lboI, a dobijeni obrazac traka prikazan je na slici 4.2. Primećuju se tri regiona neosetljiva na dejstvo DNaze I: 3900-3912, 3927-3935 i 3942-3950, kao i dva hipersenzitivna niza: 3883-3899 i 3951-3963. Ostali regioni bili su podložni hidrolizi u lancu bogatom purinima ili pirimidinima.

Zbirni rezultati hemijskih eseja i digestije DNazom I šematski su prikazani na slici 4.4.

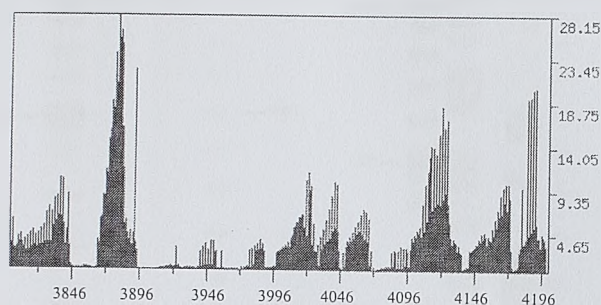


Slika 4.4. Prikaz mesta sečenja fragmenta lboI hemijskim agensima i DNazom I.

! - nukleotidi modifikovani OsO<sub>4</sub>-om, odnosno DEPC-om, ■ - osjetljivi i □ - rezistentni regioni na DNazu I, ▨ - mesta zaštite proteinom HsOrc4 *in vitro*, ← → - mesto inicijacije replikacije *in vivo*.

Strukturna analiza ukazuje da se bar dva regiona nalaze u neortodoksnoj formi DNK. Prvi region, od 3883-3897 nukleotida, sastoji se od naizmenično raspoređenih purinskih i pirimidinskih baza. Veoma je osjetljiv na dejstvo DNaze I što ukazuje da se nalazi u dvolančanoj formi. Pirimidini u gornjem lancu ovog regiona pokazuju umerenu modifikaciju agensom OsO<sub>4</sub>, dok guanini u donjem lancu izrazito reaguju sa DEPC-om. DEPC modifikuje N7 atome purinskog prstena koji je u dvolančanoj formi DNK dostupan za interakciju ako se baza nalazi u *syn* konformaciji. Ova konformacija karakteristična je za Z-formu DNK koja se javlja u sekvencama sa

naizmenično raspoređenim purinskim i pirimidinskim bazama iz čega se može pretpostaviti da se region od 3883.-3897. nukleotida nalazi u Z-formi. Ovakva interpretacija takođe je u skladu sa kompjuterskom predikcijom regiona sposobnih da zauzmu Z formu (slika 4.5).

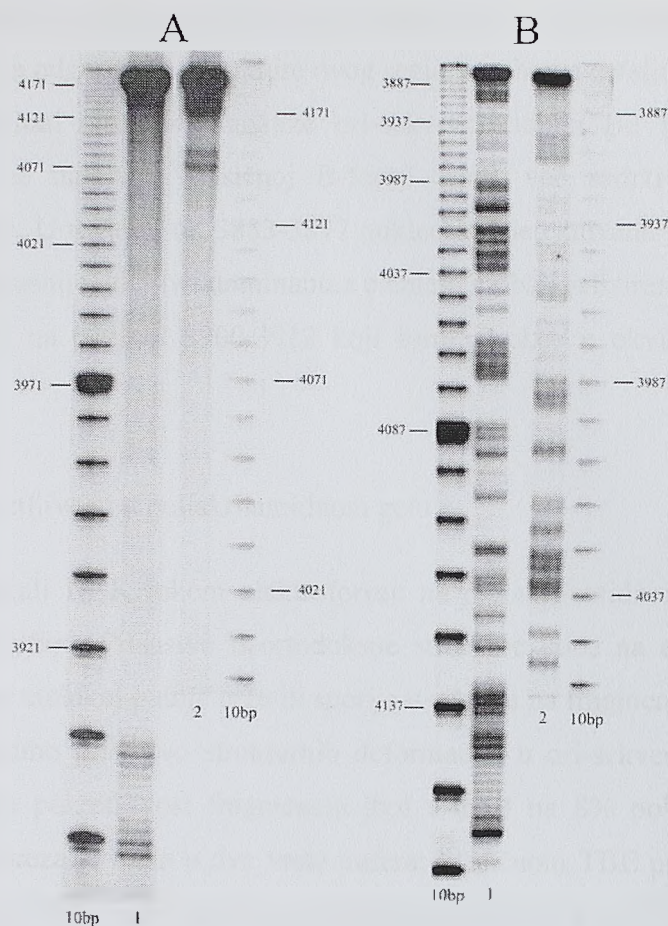


Slika 4.5. Kompjuterska predikcija Z-forme DNK u regionu od 3800 do 4200 nukleotida ori-sekvence lamin B2 (<http://gac-web.cgrb.oregonstate.edu:8080/zDNA/index>).

Drugi region, od 3900 do 3912 nukleotida, predstavlja homopirimidinski-homopurinski niz i sadrži 10 uzastopnih timina. Veoma je osetljiv na dejstvo hemijskih agenasa, kako DEPC-a tako i  $\text{OsO}_4$ -a, a pod uslovima parcijalne hidrolize, neosetljiv je na DNazu I. Ovo ukazuje da se dati region nalazi u denaturisanom obliku i formira okce unutar fragmenta lboI. Važno je napomenuti da se, posle kratkotrajne ekspozicije odgovarajućih gelova, samo signali iz ovog regiona detektuju na filmu, što pokazuje da većina testiranih molekula zauzima formu u kojoj je region 3900-3912 podložan modifikaciji i da dvolančana DNK sa okcem predstavlja dominantnu formu lboI.

Osim motiva na poziciji 3900-3912 (CTTTTTTTTTTCC) sličan motiv nalazi se i nizvodno od fragmenta lboI i obuhvata nukleotide 4141-4151 (CCTTTTTTTTC). Pošto oba spomenuta regiona predstavljaju dva najduža niza timina u okviru ori-sekvence lamin B2, zajedno su analizirana hemijskim esejima. U tu svrhu fragment lboII, prikazan na slici 4.1, generisan je reakcijom lančane polimerizacije u kojoj je samo jedan od graničnika bio radioaktivno obeležen. Rezultati hemijskih reakcija sa  $\text{OsO}_4$ -om i DEPC-om na fragmentu lboII prikazani su na slici 4.6.





Slika 4.6. Modifikacija fragmenta IboII OsO<sub>4</sub>-om i DEPC-om.

A) Lanac bogat pirimidinima modifikovan OsO<sub>4</sub>-om (1) i duža elektroforeza istog uzorka (2). B) Lanac bogat purinima modifikovan DEPC-om (1) i duža elektroforeza istog uzorka (2). 10bp – standard DNK.

Po tretmanu OsO<sub>4</sub>-om jedino su nizovi timina na mestu 3900-3912 i 4141-4151 bili modifikovani iako, u lancu bogatom pirimidinima fragmenta IboII, postoji još sedam poli(dT)<sub>3-6</sub> traktova. U purinskom lancu, analiziranom hemijskom reakcijom DEPC-om, region 3900-3912 pokazivao je reaktivnost, dok je u regionu 4141-4151 osetljivost detektovana na krajevima (nukleotidi na poziciji 4141-4143 i 4152) i prostirala se ka 3' kraju purinskog lanca obuhvatajući nukleotide na poziciji od 4136 do 4138. Slaba osetljivost bila je prisutna kod nukleotida na poziciji 4005-4006, 4017-4019, 4023-4024, 4028-4031, 4071-4074 i 4112. Ovim eksperimentom potvrđeno je da se motiv na mestu 3900-3912 nalazi u denaturisanoj formi. Sa druge strane, timini u sekvenci 4141-4151 bili su podložni modifikaciji hemijskim agensom što bi

ukazivalo da se nalaze u jednolančanoj formi, međutim njima komplementarni adenini nisu bili reaktivni pa odgonetanje strukture ovog regiona zahteva detaljniju analizu.

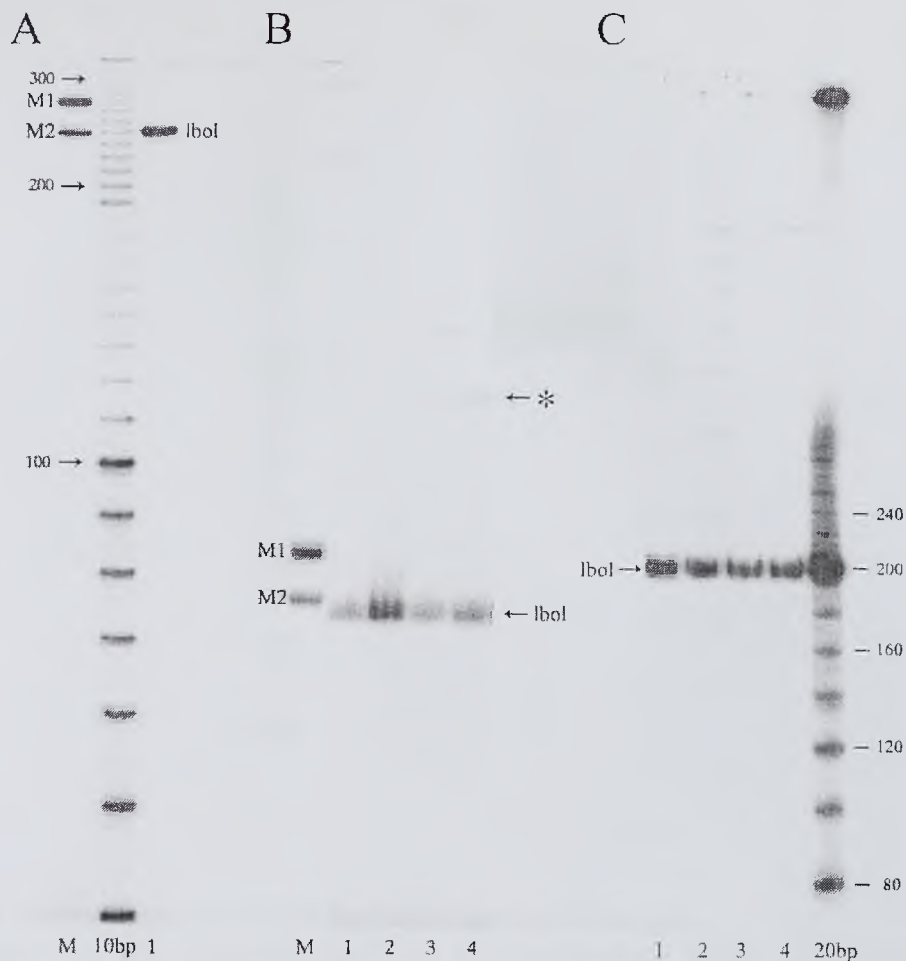
Prikazani rezultati strukturne analize ori-sekvence lamin B2 ukazuju da se ispitivani region ne nalazi u klasičnoj B-formi DNK već sadrži neortodoksne strukturne elemente. U regionu od 3883-3897 nukleotida detektovana je potencijalna Z-forma DNK. Najjasnije uočljiv i dominantan element u oba analizirana fragmenta je denaturisani region na poziciji 3900-3912 koji formira okce u okviru dvolančane DNK.

#### 4.1.2. Analiza pokretljivosti u poliakrilamidnom gelu

Linearni molekuli DNK tokom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu putuju srazmerno svojoj dužini. Prisustvo neortodoksne strukture utiče na elektroforetsku pokretljivost i takav molekul putuje brže ili sporije u odnosu na fragment iste dužine.

Želeći da ispitamo prisustvo strukturnih deformacija u ori-sekvenci, analizirali smo elektroforetsku pokretljivost fragmenata lboI i lboII na 8% poliakrilamidnim gelovima. Elektroforeza je tekla u dve vrste pufera: klasičnom TBE puferu ili TBM puferu koji umesto EDTA sadrži jone magnezijuma (2mM). Za  $Mg^{2+}$  je poznato da povećava stabilnost različitih oblika molekula DNK smanjujući elektrostatičko odbijanje među naelektrisanim grupama. Fragmenti su pre nanošenja na gel inkubirani preko noći u različitim puferima (videti 3.8.), a njihova celovitost po inkubaciji proveravana je na denaturišućem gelu. Kao što se i očekivalo, svaki fragment je putovao kao jedna traka dužine 240 bp (lboI), odnosno 317 bp (lboII).

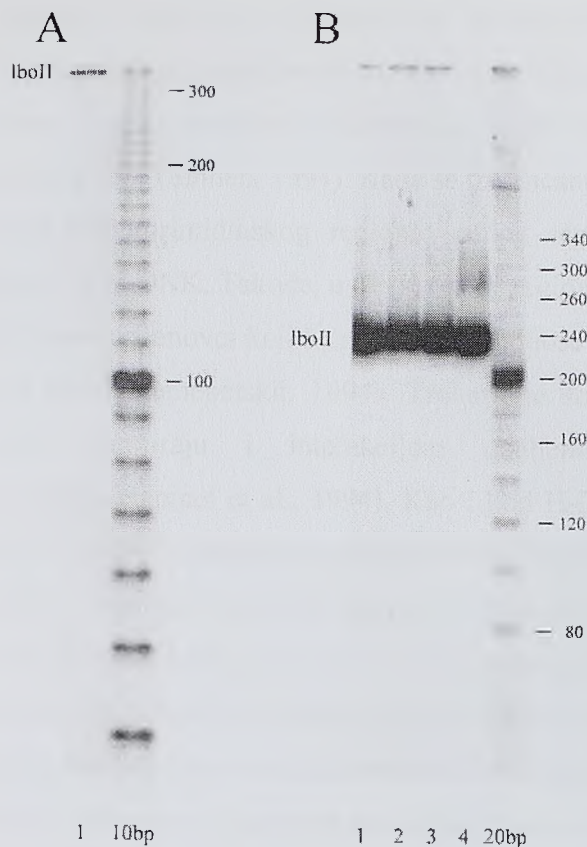
Na slici 4.7. prikazana je elektroforetska pokretljivost fragmenta lboI. Primećuje se da lboI putuje brže nego što bi se očekivalo na osnovu njegove linearne dužine. Ovaj efekat je izraženiji u gelovima koji sadrže  $Mg^{2+}$ , gde lboI putuje kao linearni fragment dužine 200 bp, dok u gelovima sa EDTA putuje tek nešto malo brže u odnosu na standard od 237 bp. Kod uzoraka inkubiranih u puferu sa glicerolom ili etilen glikolom (slika 4.7B) detektovana je jedna dodatna traka koja putuje znatno sporije od standarda dužine 267 bp.



Slika 4.7. Pokretljivost fragmenta lboI u poliakrilamidnom gelu.

A) Denaturišući gel: M1 i M2 - standard DNK dužine 267 bp i 237 bp (M), 10bp - standard DNK i lboI (1). B) 8% nativni poliakrilamidni gel u 1xTBE puferu: M1 i M2 standard DNK (M) isti kao pod A), fragment lboI inkubiran u puferu za vezivanje (20 mM HEPES pH 7,9, 30 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ATP, 10% glicerol) (1), u puferu za vezivanje sa sperminom (20 mM HEPES pH 7,9, 30 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ATP, 10% glicerol, 50 μM spermin) (2), u puferu b sa glicerolom (25mM Hepes pH 7,9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol) (3) i u puferu b sa etilen glikolom (25 mM Hepes pH 7,9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% etilen glikol) (4). C) 8% nativni poliakrilamidni gel u 1xTBM puferu: fragment lboI inkubiran u različitim puferima (1-4) istim kao pod B), 20bp - standard DNK. \* - usporena forma molekula lboI.

Na slici 4.8. prikazana je pokretljivost fragmenta lboII u poliakrilamidnom gelu sa TBM puferom. Efekat povećanja elektroforetske pokretljivosti je još izraženiji u odnosu na lboI, jer lboII (dužine 317 bp) putuje nešto malo brže od linearnog molekula dužine 240 bp.



Slika 4.8. Pokretljivost fragmenta lboII u poliakrilamidnom gelu. A) Denaturišući gel: fragment lboII (1) i 10bp standard DNK. B) 8% nativni poliakrilamidni gel u 1xTBM puferu: lboII inkubiran u različitim puferima (1-4), istim kao i lboI (slika 4.7), i 20bp - standard DNK.

Povećanje ili smanjenje dužine putovanja fragmenata poreklom iz ori-sekvence lamin B2 ukazuje da se oni ne nalaze u linearnoj formi i da su dati regioni ori-sekvence skloni formiranju neortodoksnih struktura. Prisustvo sporije trake varira među uzorcima inkubiranim u različitim puferima i ukazuje da formiranje i/ili stabilnost datog oblika molekula zavisi od komponenti prisutnih u puferu.

#### 4.1.3. Ispitivanje pretpostavljenih modela strukture *ori* lamin B2

Rezultati hemijskih esejia i pokretljivost u poliakrilamidnom gelu jasno ukazuju da ori-sekvencia lamin B2 sadrži alternativne strukture *in vitro*. Jedna od malobrojnih zajedničkih karateristika eukarioskih ori-sekvenci je visok sadržaj TA bp i prisustvo kratkih nizova  $(dT)_n \cdot (dA)_n$  ( $n=3-10$ ). U regionu *ori* lamin B2 obuhvaćenom fragmentom lboI, prisutno je 12 nizova  $(dT)_n \cdot (dA)_n$  od kojih 10 sadrži timine

koncentrisane u gornjem lancu. Iz literature je poznato da homopurinski-homopirimidinski regioni imaju sposobnost da formiraju trolančane strukture u kojima centralni lanac bogat purinima istovremeno gradi Watson-Crick-ove i Hoogsteen-ove vodonične veze (Sinden, 1994). Kada se trolančani regioni formiraju u okviru homopurinskog-homopirimidinskog regiona jednog molekula nazivaju se intramolekulski tripleksi ili H-DNK. Takođe, u okviru ovog regiona moraju da postoje simetrični ili kvazi simetrični ponovci koji se međusobno odnose kao predmet i lik u ogledalu (Mirkin and Frank-Kamenetskii, 1994). Trolančane strukture u molekulu DNK mogu da se formiraju i interakcijom udaljenih homopurinskih-homopirimidinskih regiona (Hampel et al., 1994). Kao i kod H-DNK ovi regioni su međusobno simetrični, a tipovi simetrije koji omogućavaju formiranje tripleksa ove vrste su refleksija (MRI – Mirror Reflection Images) ili klizajuća refleksija (GRI – Glide Reflection Images). MRI i GRI ponovci u okviru jednog molekula mogu biti povezani i komplementarnim polipirimidinskim oligonukleotidom koji služi kao most i sa svakim od ponovaka formira intermolekulski tripleks (Hampel et al., 1994).

Analizom sekvence ispitivanog segmenta *ori* lamin B2 utvrđeno je da postoje uslovi za formiranje trolančanih struktura, pa je pretpostavljeno da se on, barem delimično, nalazi u formi tripleksa. Na osnovu kombinovanih rezultata prikazanih u prethodna dva poglavlja, kao i na osnovu rasporeda nizova timina u fragmentu IboI, sačinjena su dva moguća strukturna modela. U jednom modelu u okviru fragmenta formira se tripleks tipa H-DNK, dok je u drugom pretpostavljeno da se trolančane strukture formiraju interakcijom udaljenih regiona.

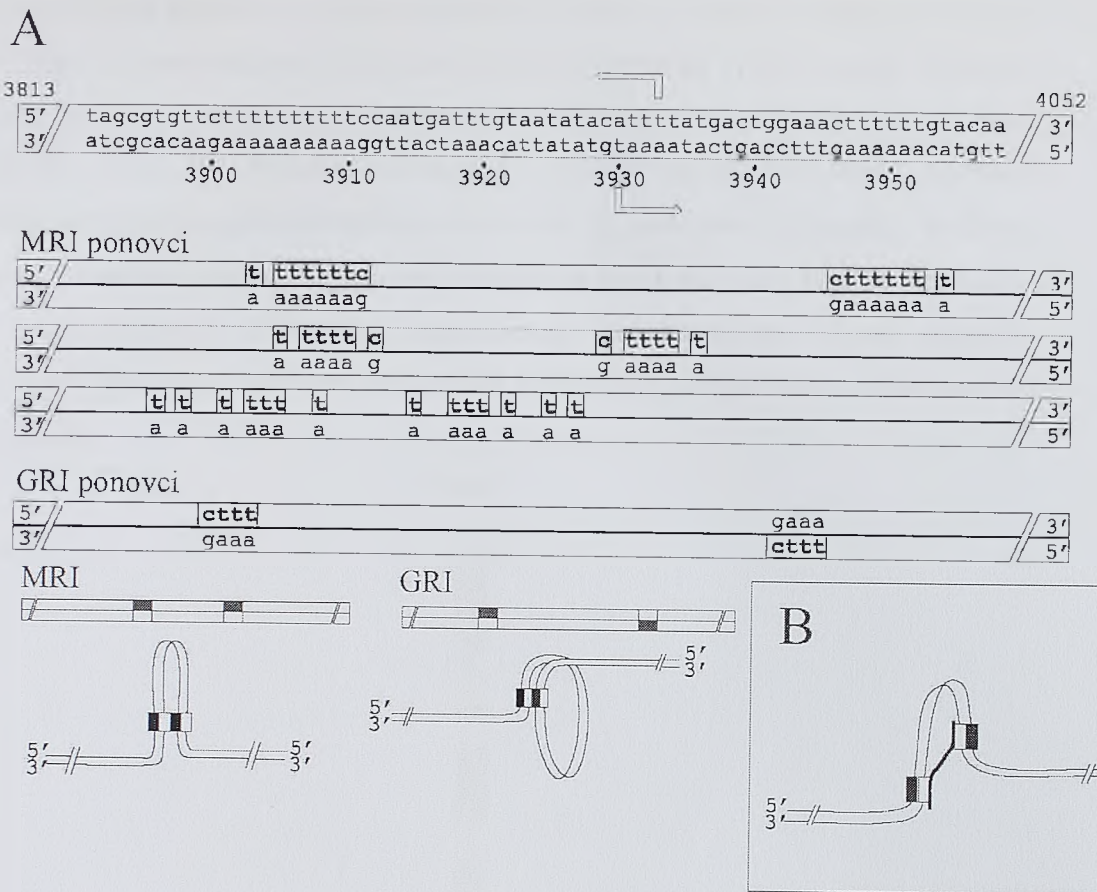
Na slici 4.9. prikazan je prvi model i simetrično raspoređeni ponovci T-A koji bi mogli da učestvuju u formiranju ove vrste tripleksa (slika 4.9A). Reaktivnost nukleotida oba lanca u regionu od 3900 do 3912 je u saglasnosti sa prisustvom petlje. Osetljivost na dejstvo DEPC-a duž celog purinskog lanca sugeriše da u populaciji analiziranih molekula postoje dve izomerne forme tripleksa Hy3, u kojoj je nizvodni deo lanca nezaštićen i Hy5, u kojoj uzvodni deo pokazuje reaktivnost (slika 4.9B). Prisustvo nekoliko reaktivnih timina van regiona petlje u gornjem lancu označavalo bi dupleks-tripleks spojeve što ukazuje na mešavinu tripleksa različite dužine (slika 4.9C).



pomoću graničnika koji su na 5' kraju nosili biotin. Za svaki od oligonukleotida (Hy31, Hy32, Hy51 i Hy52) rađene su paralelno tri reakcije – u dve reakcije radioaktivno obeleženi oligonukleotid je inkubiran sa biotiničanim fragmentom lboI, dok je treća reakcija sadržavala samo radioaktivno obeleženi oligonukleotid. Po inkubaciji u uzorke je dodavan pufer koji je sadržao ili magnezijum (pufer b) ili EDTA (videti 3.9.1). Hibridni molekuli DNK izolovani su pomoću magnetnih kuglica obloženih streptavidinom. Nakon odgovarajućih pranja, uzorci su kuvani u puferu za denaturaciju uzoraka, a biotiničana proba uklanjana je magnetom iz odgovarajućih reakcionih smeša. Količina oligonukleotida koji su hibridizovali sa lboI određivana je merenjem uzorka u scintilacionom brojaču.

Dobijeni rezultati nisu ukazivali na značajnije vezivanje oligonukleotida za fragment lboI (nisu prikazani). Izostanak hibridnih molekula je verovatno prouzrokovan odsustvom dužih jednolančanih regiona unutar purinskog lanca, što nije u skladu sa modelom predstavljenim na slici 4.9, pa je mogućnost da trolančani regioni *ori* lamin B2 imaju formu H-DNK odbačena.

Drugi model pretpostavlja da se u okviru ispitivanog segmenta *ori* lamin B2 tripleks formira interakcijom udaljenih homopurinskih-homopirimidinskih regiona i prikazan je na slici 4.10. U fragmentu lboI postoji više ponovaka MRI i GRI tipa pa je moguć i veći broj alternativnih struktura koje sve uključuju prisustvo dvolančane petlje.



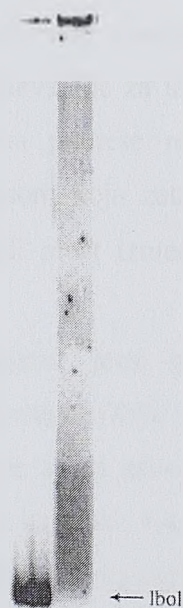
Slika 4.10. Hipotetička struktura ori-sekvence lamin B2 – model II.

A) Sekvenca dela fragmenta lboI sa simetrično raspoređenim nizovima nukleotida čijom se interakcijom formiraju različite dvolančane petlje koje u osnovi imaju intramolekulske triplekse. MRI (Mirror Reflection Images) i GRI (Glide Reflection Images) – simetrični parovi sekvenci. B) Dvolančana petlja formirana interakcijom jednolančanog polipirimidinskog fragmenta sa udaljenim nizovima purina u dvolančanom molekulu DNK. ■ - niz pirimidina, □ - niz purina, / - polipirimidinski oligonukleotid.

Imajući na umu da fragment lboI sadrži 12 poli(dA)<sub>3-10</sub> nizova, koji bi mogli da budu povezani pomoću poli(dT) oligonukleotida (slika 4.10B), želeli smo da testiramo mogućnost formiranja ovakvih struktura u ori-sekvenci. Radioaktivno obeležen poli(dT)<sub>40</sub> oligonukleotid inkubiran je sa neobebeženim fragmentom lboI, a produkti reakcije analizirani su na nativnim poliakrilamidnim gelovima u TBM puferu i upoređeni sa obrascem migracije obeleženog fragmenta lboI inkubiranog bez oligonukleotida (slika 4.11.). Produkti reakcije su na gelu putovali u vidu razmaza koji se prostirao od nivoa samog lboI fragmenta ka vrhu gela. Dobijeni rezultat je ukazao na interakciju poli(dT)<sub>40</sub> sa nizovima adenina koji potiču iz fragmenta lboI. Na



osnovu veličine hibridnih molekula prisutnih u razmazu moglo se pretpostaviti da on sadrži bar tri vrste hibridnih molekula. Neki od njih mogli bi biti linearni tripleksi u kojima obeleženi oligonukleotid interaguje sa komplementarnim regionom jednog molekula lboI ili tripleksi sastavljeni iz više molekula lboI povezanih intermolekulskim oligonukleotidnim mostovima. U prikazanoj populaciji, međutim, postoje i molekuli koji putuju isto kao i obeleženi lboI u odsustvu oligonukleotida, tj. kao molekuli manji od linearne dužine samog lboI fragmenta. Ovakva migracija ukazuje na postojanje strukture dvolančane petlje u lboI sličnih onima prikazanim na slici 4.10B.



Slika 4.11. Interakcija poli(dT)<sub>40</sub> oligonukleotida sa fragmentom lboI. Elektroforeza fragmenta  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) i produkata inkubacije  $^{32}\text{P}$ - poli(dT)<sub>40</sub> sa fragmentom lboI (2) u 8% nativnom poliakrilamidnom gelu sa TBM puferom.

Ovaj eksperiment sugerira da je ori-sekvencu lamin B2 dovoljno fleksibilna da formira strukturu dvolančane petlje a samim tim i intramolekulski tripleks prema modelu prikazanom na slici 4.10A. U prilog ovakvoj interpretaciji govori i činjenica da fragment lboI sadrži okce koje sa udaljenim komplementarnim sekvencama može da nagradi 9 MRI i 2 GRI para, a ovi parovi zadovoljavaju strukturne zahteve za formiranje Hoogsteen-ovih veza. Formiranjem Hoogsteen-ovih veza centralni

pirimidini okceta bili bi delimično zaštićeni od hemijskih agenasa što je i detektovano u prethodnim eksperimentima (slika 4.2). Smanjena reaktivnost ukazuje da ovi timini interaguju sa nekim elementima u *ori*-sekvenci, a pošto u ovoj sekvenci postoji samo jedan jednolančani region, protektivne interakcije ne mogu biti Watson-Crick-ovog tipa, što opet ukazuje na Hoogsteen-ove veze i formiranje tripleksa.

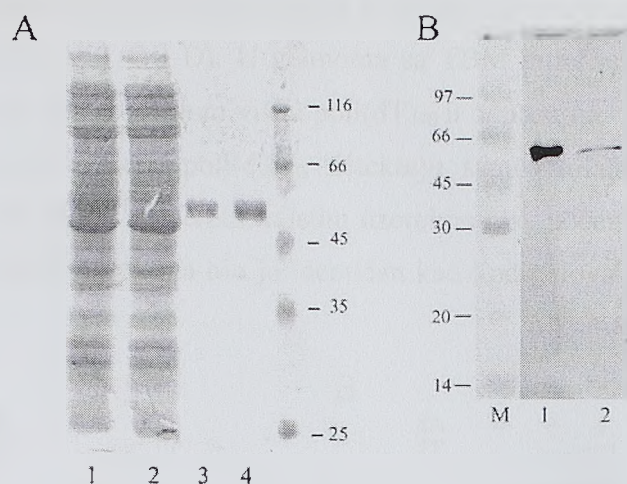
#### 4.2. Interakcija proteina HsOrc4 sa trolančanom DNK

Nekanonski strukturni elementi zaslužuju pažnju samo ako doprinose funkcijama vezanim za sintezu DNK i *ori*-sekvencama obezbeđuju svojstva koja će ih izdvojiti iz ogromne mase genomske DNK irelevantne za inicijaciju. Način da se informacija o specifičnim strukturnim svojstvima prenese replikacionoj mašineriji ćelije jeste interakcija sa inicijacionim proteinom koja zatim služi kao osnova za formiranje prereplikacionog kompleksa i gradi most između *ori* DNK i DNK polimeraze  $\alpha$  odgovorne za inicijaciju.

Univerzalni eukariotski inicijator jeste proteinski kompleks ORC, kome subjedinica 4, po svoj prilici, obezbeđuje DNK vezivnu aktivnost (Stefanović et al., 2003). Humani protein Orc4 vezuje se za *ori*-sekvencu lamin B2, a regioni DNK uključeni u interakciju (prikazani na slici 4.4.) obuhvataju regione uključene u formiranje pretpostavljenog intramolekulskog tripleksa. Ukoliko *ori* DNK zaista gradi trolančanu formu, protein HsOrc4 bi morao da prepoznaje strukturu tripleksa što je i ispitano *in vitro* studijom opisanom u ovom poglavlju.

##### 4.2.1. Izolovanje proteina HsOrc4

Kao što je opisano ranije, humani rekombinantni protein Orc4 eksprimiran je u bakterijama kao fuzioni protein sa histidinskim epitopom i prečišćen skoro do homogenosti (Stanojčić, 2003). Čistoća preparata proveravana je elektroforezom na SDS poliakrilamidnim gelovima (slika 4.12A).



Slika 4.12. Prečišćavanje i identifikacija rekombinantnog proteina HsOrc4.

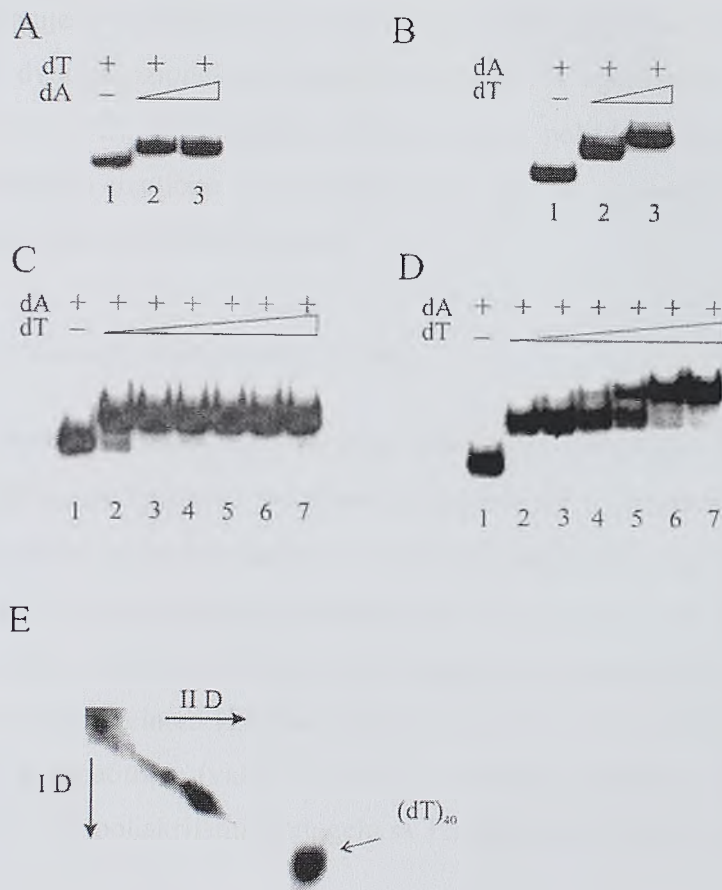
A) Analiza pojedinih koraka purifikacije proteina u 12% SDS poliakrilamidnom gelu. Lizat indukovanih (1) i neindukovanih (2) bakterijskih ćelija. Prva (3) i druga (4) elucija proteina HsOrc4. B) Western blot analiza 500ng (1) i 50ng (2) purifikovanog proteina HsOrc4 sa antitelom na histidinski epitop. M - standard molekulske mase.

Primenjenim postupkom prečišćen je protein molekulske mase 55 kDa, a Western blot analizom komercijalnim antitelom na histidinski epitop (Qiagen) u proteinskom preparatu detektovana je samo jedna traka od 55 kDa. Dobijeni signali odgovaraju rekombinantnom proteinu HsOrc4 koji sadrži His marker (slika 4.12B) i ukazuju da tokom izolacije ne dolazi do degradacije proteina. Ovako izolovan protein korišćen je u daljim eksperimentalnim postupcima.

#### 4.2.2. Formiranje trolančanih struktura

Trolančane strukture formirane su od jednolančanih oligonukleotida poli(dT)<sub>40</sub> i poli(dA)<sub>40</sub>. Da bismo odredili količinu komplementarnog lanca potrebnog za formiranje tripleksa, obeleženi poli(dT)<sub>40</sub> ili poli(dA)<sub>40</sub> inkubirani su u puferu za vezivanje sa neobeležanim četrdesetomerom u rastućim količinama. Produkti reakcije prikazani su na slici 4.13A i B. Prilikom inkubacije obeleženog poli(dT)<sub>40</sub> sa poli(dA)<sub>40</sub> u rastućim količinama formiraju se samo dvolančani molekuli, dok se u inverznoj reakciji sa povećanjem količine poli(dT)<sub>40</sub> svi dvolančani molekuli pomeraju ka većim molekulskim masama što ukazuje da se formira trolančana struktura.

Stabilnost tripleksa *TAT* tipa ispitivana je u gel sistemima sa TBE, TBM<sup>0.1</sup> i TBM puferom (slika 4.13 C i D). U gelovima sa TBM puferom trolančane forme primećuju se već pri 10x molarnom višku poli(dT)<sub>40</sub> u odnosu na <sup>32</sup>P- poli(dA)<sub>40</sub>, dok se sa 50x molarnim viškom poli(dT)<sub>40</sub> detektuju samo trolančane strukture. U gelovima sa TBE ili TBM<sup>0.1</sup> puferom, u istim uzorcima nisu uočeni tripleksi (obrazac traka dobijen u TBM<sup>0.1</sup> gelovima bio je identičan kao kod gelova sa TBE puferom i nije prikazan).



Slika 4.13. Formiranje trolančanih struktura.

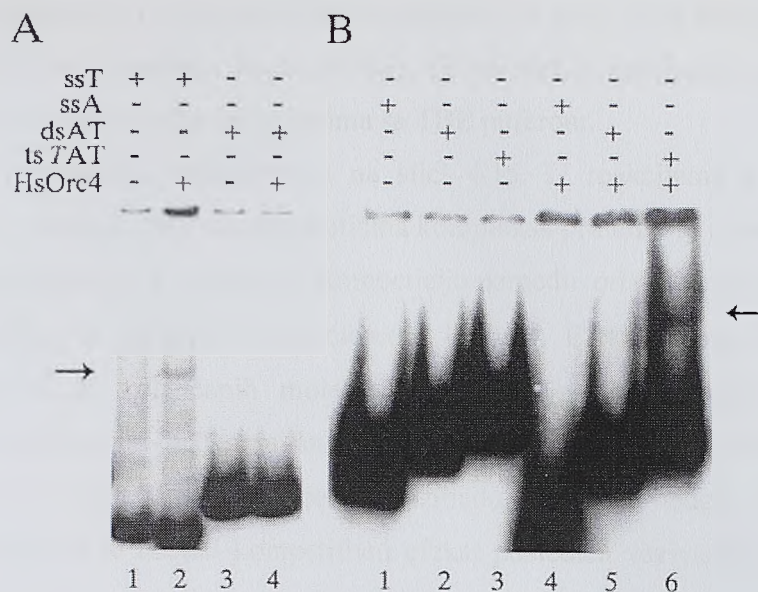
A) <sup>32</sup>P-poli(dT)<sub>40</sub> (1) inkubiran sa poli(dA)<sub>40</sub> u rastućim količinama (2,3). B) <sup>32</sup>P-poli(dA)<sub>40</sub> (1) inkubiran sa poli(dT)<sub>40</sub> u rastućim količinama (2,3). C) Elektroforeza u 10% poliakrilamidnom gelu sa TBE puferom. <sup>32</sup>P-poli(dA)<sub>40</sub> (1) inkubiran sa ekvimolarnom (2), 5x većom (3), 10x većom (4), 20x većom (5), 50x većom (6) i 100x većom (7) količinom poli(dT)<sub>40</sub>. D) Elektroforeza u 10% poliakrilamidnom gelu sa TBM puferom. Uzorci od 1-7 isti kao pod C. E) Dvodimenzionalna elektroforeza u 1% agaroznom gelu sa TBM puferom. Kopolimer poli(dA)·poly(dT) inkubiran sa 350x molarnim viškom <sup>32</sup>P-poli(dT)<sub>40</sub>. Strelice pokazuju pravac prve i druge dimenzije elektroforeze.

Rezultati ovih eksperimenata ukazuju da korišćeni uslovi ne omogućavaju formiranje tripleksa AAT tipa, kao i da tripleksi TAT tipa zavise od jona magnezijuma i da je za njihovu stabilnost potrebno konstantno prisustvo 2 mM Mg<sup>2+</sup>. Kratki tripleksi formirani su na isti način i sa oligonukleotidima dužine 34 bp.

Parcijalno trolančani molekuli TAT tipa formirani su od komercijalnog monotonog kopolimera poli(dA)·poli(dT) (Pharmacia) i radioaktivno obeleženog poli(dT)<sub>40</sub>. Korišćen je 350x molarni višak <sup>32</sup>P- poli(dT)<sub>40</sub> u odnosu na kopolimer, a uslovi hibridizacije bili su isti kao i pri formiranju kratkih tripleksa. Produkti reakcije analizirani su dvodimenzionalnom elektroforezom u 1% agaroznom gelu sa TBM puferom (slika 4.13 E). U komercijalnom kopolimeru poli(dA)·poli(dT) prisutna je populacija molekula različite molekulske mase, pa se vezivanje <sup>32</sup>P-poli(dT)<sub>40</sub> detektuje na gelu kao radioaktivni razmaz.

#### 4.2.3. DNK vezivna aktivnost proteina HsOrc4

Afinitet proteina HsOrc4 za fragmente poli(dA)<sub>40</sub>, poli(dT)<sub>40</sub>, (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> i (dT)<sub>40</sub>·(dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> analiziran je metodom zaostajanja DNK-proteinskog kompleksa na poliakrilamidnom gelu. Dvolančani i trolančani oligonukleotidi, (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> i (dT)<sub>40</sub>·(dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub>, pripremljeni su sa obeleženim <sup>32</sup>P-poli(dA)<sub>40</sub>, kao što je opisano u prethodnom odeljku. Obeleženi jedno-, dvo i trolančani fragmenti DNK inkubirani su sa rekombinantnim proteinom HsOrc4 u puferu za vezivanje bez EDTA i u prisustvu nespecifičnog kompetitora (videti 3.15.1), a produkti reakcije su analizirani elektroforezom u 4% poliakrilamidnom gelu sa TBM puferom (slika 4.14.).



Slika 4.14. Vezivanje rekombinantnog HsOrc4 za jedno-, dvo- i trolančane molekule DNK.

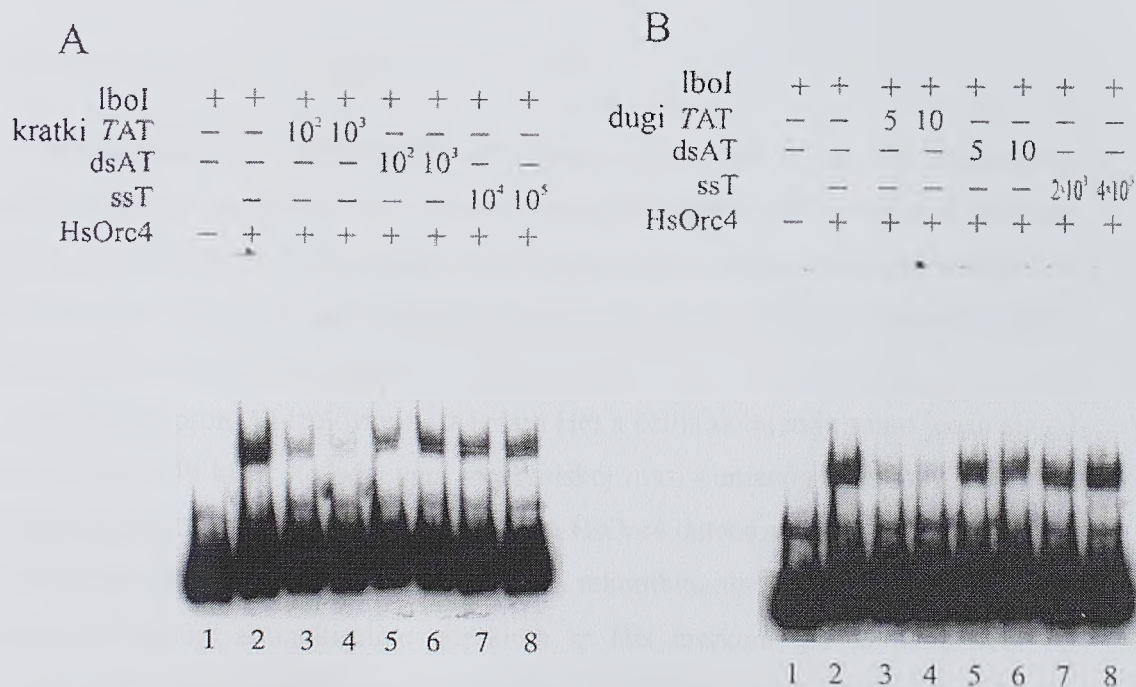
A) Jednolančani  $^{32}\text{P}$ -poli(dT)<sub>40</sub> (1,2) i dvolančani  $^{32}\text{P}$ -poli(dT)<sub>40</sub>·poli(dA)<sub>40</sub> (3,4) inkubirani sa proteinom HsOrc4 (2,4). B) Jednolančani  $^{32}\text{P}$ -poli(dA)<sub>40</sub> (1,4), dvolančani  $^{32}\text{P}$ -poli(dA)<sub>40</sub>·poli(dT)<sub>40</sub> (2,5) i trolančani  $^{32}\text{P}$ -poli(dA)<sub>40</sub>·poli(dT)<sub>40</sub> (3,6) inkubirani sa proteinom HsOrc4 (4,5,6) i analizirani u 10% poliakrilamidnom gelu sa TBM puferom. ss – jednolančana DNK, ds – dvolančana DNK i ts – trolančana DNK. Strelicama su naznačeni formirani protein-DNK kompleksi.

Uočava se da protein HsOrc4 ne prepoznaje jednolančane poli(dA) četrdesetomere, kao ni dvolančane fragmente (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> dok se za poli(dT)<sub>40</sub> slabo vezuje. Najveći afinitet HsOrc4 ima prema molekulu (dT)<sub>40</sub>·(dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> za koji se vezuje čak i u prisustvu velike količine slobodnog poli(dT)<sub>40</sub> koji ostaje u reakcionoj smeši po formiranju tripleksa. Takođe, tokom reakcije vezivanja ne narušava se struktura prethodno formiranih dvolančanih i trolančanih supstrata (slobodna DNK). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da protein HsOrc4, jedna od subjedinica kompleksa ORC, specifično prepoznaje trolančanu DNK formiranu od dupleksa (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> i jednolančanog poli(dT)<sub>40</sub>.

Ovim eksperimentom je pokazano da protein HsOrc4 specifično prepoznaje kratke trolančane oligonukleotide. Ukoliko su ovakve strukture slične njegovim prirodnim vezivnim mestima, trolančani oligonukleotidi trebalo bi da budu efikasni kompetitori prilikom vezivanja proteina HsOrc4 za *ori* lamin B2. Radi utvrđivanja kompetitivnog efekta trolančanih DNK, kratki i dugi tripleksi, prethodno formirani od

neobebeženih konstituenata, inkubirani su sa proteinom, a potom je u reakcionu smešu dodavan radioaktivno obeležen fragment lboI. Po završetku inkubacije, produkti su analizirani u 4% poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom.

Rezultati kompeticije prikazani su na slici 4.15. U reakcijama u kojima je prisutan tripleks značajno se smanjuje količina kompleksa proteina sa ori-sekvencom. Ovakav rezultat ukazuje na efikasnu kompeticiju između ori-sekvence i tripleksa  $(dT)_{40} \cdot (dA)_{40} \cdot (dT)_{40}$  za vezivanje sa proteinom HsOrc4. Efekat kompeticije je još izraženiji kod dugih trolančanih molekula. Poznato je da se protein HsOrc4 kooperativno vezuje za ori-sekvencu lamin B2 (Stefanović et al., 2003) čime se mogu objasniti razlike u intenzitetu kompeticije između kratkih i dugih trolančanih struktura. Takođe, da je uočeni kompetitivni efekat posledica vezivanja proteina za tripleks potvrđeno je i u kontrolnim reakcijama sa jedno- ili dvolančanim fragmentima, gde nije detektovana kompeticija.



Slika 4.15. Kompeticija jedno-, dvo- i trolančane DNK ori-sekvenci lamin B2 za vezivanje sa proteinom HsOrc4.

A)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa HsOrc4 (2-8) u prisustvu  $\text{poli}(dT)_{40} \cdot \text{poli}(dA)_{40} \cdot \text{poli}(dT)_{40}$  (3,4),  $\text{poli}(dA)_{40} \cdot \text{poli}(dT)_{40}$  (5,6) i  $\text{poli}(dT)_{40}$  (7,8). B)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa HsOrc4 (2-8) u prisustvu dugih TAT tripleksa (3,4), dvolančanog kopolimera  $\text{poli}(dA) \cdot \text{poli}(dT)$  (5,6) i  $\text{poli}(dT)_{40}$  (7,8). Naznačeni brojevi odgovaraju molarnom odnosu kompetitora i fragmenta  $^{32}\text{P}$ -lboI.

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da protein HsOrc4 razlikuje trolančanu strukturu DNK od jedno ili dvolančane, i specifično se vezuje za nju i da je, sudeći po efikasnosti kompeticije, trolančana DNK veoma slična prirodnim vezivnim mestima za HsOrc4.

#### 4.3. Analiza vezivne specifičnosti antitela na protein HsOrc4

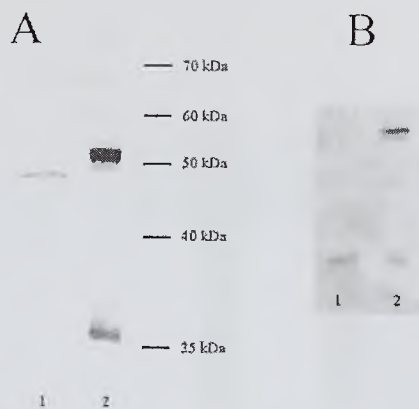
Interesantni rezultati koji potvrđuju pretpostavke o nekanonskoj strukturi *ori* lamin B2 i posebnoj vezivnoj specifičnosti proteina HsOrc4 dobijeni su i sa poliklonskim antitelima iz seruma miševa imunizovanih rekombinantnim proteinom HsOrc4 izolovanim iz bakterijskih ćelija pod nativnim uslovima. Ovo antitelo iskorišćeno je za detaljno ispitivanje svojstava proteina HsOrc4 i njegove interakcije sa ishodištima replikacije.

##### 4.3.1. Interakcija antitela sa proteinom HsOrc4

Radi proizvodnje poliklonskih antitela miševi (soj Bulb C) su bili imunizovani rekombinantnim proteinom HsOrc4 prečišćenim iz bakterijskih lizata pod nativnim uslovima (S.Kojić, lična komunikacija). Serumi imunizovanih životinja testirani su Western blot analizom sa nuklearnim proteinima HeLa ćelija i rekombinantnim proteinom HsOrc4 (slika 4.16A).

U uzorku proteina izolovanim iz jedara HeLa ćelija dobijen je samo jedan signal na visini oko 49 kDa, što odgovara molekularnoj masi humanog proteina Orc4. Kod bakterijskog izolata rekombinantnog proteina HsOrc4 detektovane su 2 trake na visini oko 55 kDa i 27 kDa. Gornja traka odgovara rekombinantnom proteinu HsOrc4 koji poseduje dodatne aminokiseline poreklom iz His markera, pa je malo veći od izvornog proteina i putuje sporije od njega. Protein molekulske mase oko 27 kDa poreklom je iz bakterija što je utvrđeno Western blot analizom proteinskih izolata iz bakterija koje sadrže ekspresioni vektor bez rekombinantnog proteina HsOrc4 (slika 4.16B). Western blot analizom urađenom sa preimunim serumom nije dobijen signal ni u jednom proteinskom uzorku, čime je potvrđeno da samo serumi imunizovanih životinja sadrže antitela koja specifično prepoznaju protein HsOrc4.





Slika 4.16. Western blot analiza proteina HsOrc4.

A) Nuklearni proteini HeLa ćelija (1) i rekombinantni HsOrc4 purifikovan iz bakterijskih ćelija. Sa desne strane označen je standard molekulske mase. B) Proteinski izolat iz bakterija koje sadrže ekspresioni vektor bez (1) ili sa (2) proteinom HsOrc4.

Poliklonsko antitelo na nativni HsOrc4 testirano je i metodom “supershift”-a, kojom se detektuje interakcija antitela i proteina koji je u kompleksu sa DNK. Kao DNK proba u ovom eksperimentu korišćen je radioaktivno obeležen fragment lboI. Po inkubaciji probe i proteina HsOrc4 u prisustvu nespecifičnog kompetitora (videti 3.16.), u smešu je dodavano antitelo i inkubacija je nastavljena još 30 minuta. Produkti reakcije analizirani su u 4% poliakrilamidnom gelu sa TBE puferom (slika 4.17).



Slika 4.17. "Supershift" esej sa antitelom na protein HsOrc4.  $^{32}\text{P}$ -IbOI (1) inkubiran sa antitelom (2), inkubiran sa proteinom HsOrc4 (3) ili istovremeno inkubiran i sa antitelom i sa proteinom HsOrc4 (4).

Kao što je prikazano na slici 4.17, kompleks proteina i DNK pomera se ka većim molekulskim masama u reakcionim smešama u koje je dodato antitelo. Takođe, primećuje se da se skoro celokupna proba podiže, a isti efekat uočen je i u uzorku bez proteina HsOrc4 što je pokazalo da osim sa proteinom, antitelo interaguje sa izolovanim fragmentom *ori* lamin B2. Ovaj rezultat bio je neočekivan i ukazao je na kontaminaciju preparata proteina korišćenog za imunizaciju bakterijskom DNK. Budući da su miševi imunizovani proteinom koji afinitetnom hromatografijom prečišćen skoro do homogenosti, pretpostavljeno je da je imunogena DNK bila prisutna u kompleksu sa proteinom, pa je afinitet antitela prema DNK detaljnije ispitan.

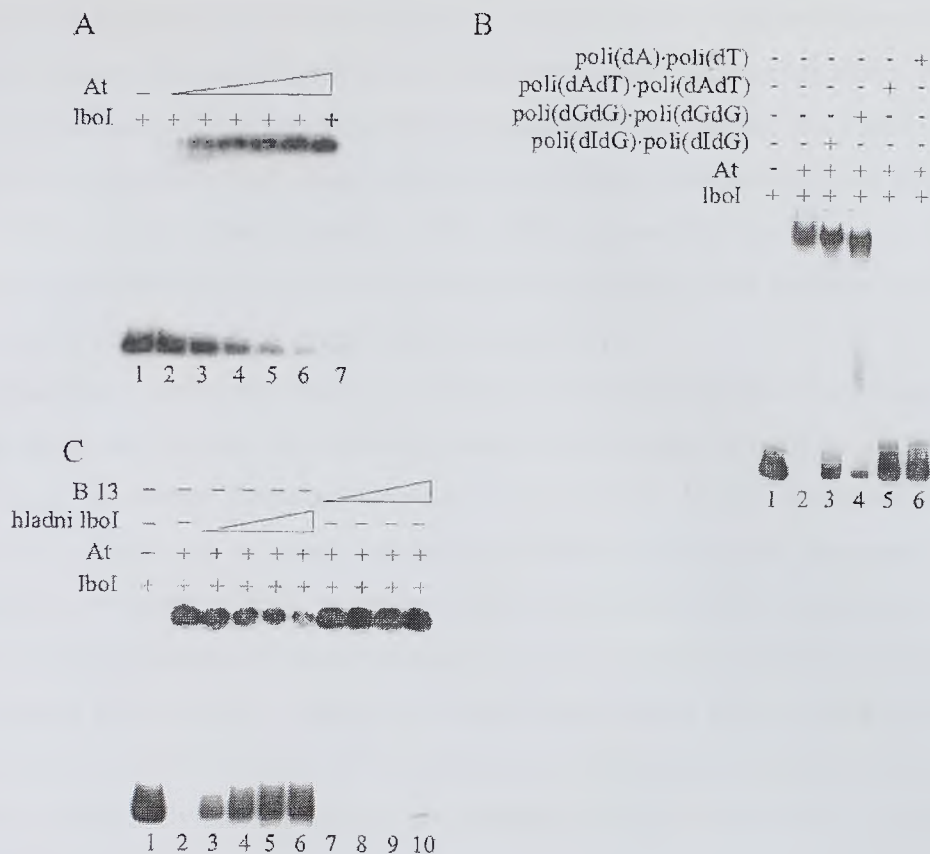
#### 4.3.2. Interakcija antitela sa DNK

Uzorcima kojima su miševi injecirani pripremljeni su pod uslovima pod kojima je protein HsOrc4 zadržao svoju funkcionalnost i sposobnost da vezuje DNK. U ranim fazama izolacije, protein je mogao da dođe u kontakt sa bakterijskom DNK

fragmentisanom tokom ćelijske lize i da interaguje sa njom, a potom da je zadrži i tokom prečišćavanja sve do preparata kojim je vršena imunizacija. Na ovaj način imunogena DNK bi odslikavala vezivnu specifičnost proteina HsOrc4, dok bi DNK vezivna aktivnost antitela ukazivala na strukturnu specifičnost imunogene DNK, a preko nje i na specifičnost samog proteina HsOrc4.

DNK vezivna specifičnost antitela utvrđivana je reakcijama kompeticije, u kojima je praćena sposobnost različitih molekula DNK da kompetiraju fragmentu lboI u reakciji vezivanja za antitelo. Najpre je određena količina antitela koja kvantitativno vezuje određenu količinu obeleženog fragmenta lboI. U tu svrhu, imuni serum je inkubiran sa fragmentom lboI, a produkti reakcije analizirani su elektroforezom u 4% poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom (slika 4.18A). Utvrđeno je da 0,5  $\mu$ l seruma vezuje 1-3 fmola fragmenta lboI i ovaj odnos korišćen je u reakcijama kompeticije. Vezivanje antitela za kompetitorsku DNK detektovano je pojavom slobodnog fragmenta lboI, a njegova količina ukazivala je na afinitet antitela prema korišćenom kompetitoru.

Prvo je ispitivan afinitet antitela prema monotonim i naizmeničnim kopolimerima - poli(dA)-poli(dT), poli(dAdT)-poli(dAdT), poli(dIdC)-poli(dIdC) i poli(dGdC)-poli(dGdC) (Pharmacia). Po inkubaciji antitela sa kompetitorskom DNK u smešu je dodavan radioaktivno obeležen fragment lboI i inkubacija je nastavljena još 30 minuta. Produkti reakcije analizirani su elektroforezom u 4% poliakrilamidnom gelu sa TBE puferom, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.18B. Uočava se da 100x težinski višak poli(dAdT)-poli(dAdT) i poli(dA)-poli(dT) u odnosu na lboI potpuno blokira interakciju antitela sa *ori* DNK, dok ista količina poli(dIdC)-poli(dIdC) i poli(dGdC)-poli(dGdC) pokazuje slab kompetitivni efekat.



Slika 4.18. DNK vezivna aktivnost antitela.

A) 1 fmol  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa 1  $\mu\text{l}$  20x razblaženog seruma antitela (2) ili 1-5  $\mu\text{l}$  10x razblaženog seruma antitela (3-7). B)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa antitelom (2-6) u prisustvu kopolimera poli(dIdC)·poli(dIdC) (3), poli(dGdC)·poli(dGdC) (4), poli(dAdT)·poli(dAdT) (5) ili poli(dA)·poli(dT) (6). C)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa antitelom (2-10) u prisustvu 100x, 200x, 300x i 400x molarnog viška neobebeženog lboI (3-6) ili fragmenta B13 (7-10).

Afinitet antitela za sintetičke kopolimere sličan je ranije opisanom afinitetu samog proteina HsOrc4 ili proteinskog kompleksa ORC (Stefanović et al., 2003). Ovo je potvrđeno i eksperimentima u kojima je kao kompetitor korišćena dvolančana DNK izolovana iz genomskog regiona za koji je utvrđeno da nije aktivan u inicijaciji sinteze DNK. Kontrolni region (nazvan B13) nalazi se 5 kb nizvodno od *ori* lamin B2, a fragmenti DNK izolovani iz ovog regiona ne interaguju ni sa proteinom HsOrc4, ni sa celokupnim kompleksom ORC. U želji da utvrdimo da li i antitelo selektivno prepoznaje *ori* DNK upoređivani su kompetitivni efekti hladnih fragmenata lboI i B13. U eksperimentima kompeticije odgovarajući neobebeženi fragmenti DNK, primenjeni u 100 do 400 puta molarnom višku u odnosu na obeleženu probu, prvo su inkubirani sa antitelom, ili dodavani u reakciju vezivanja zajedno sa radioaktivno

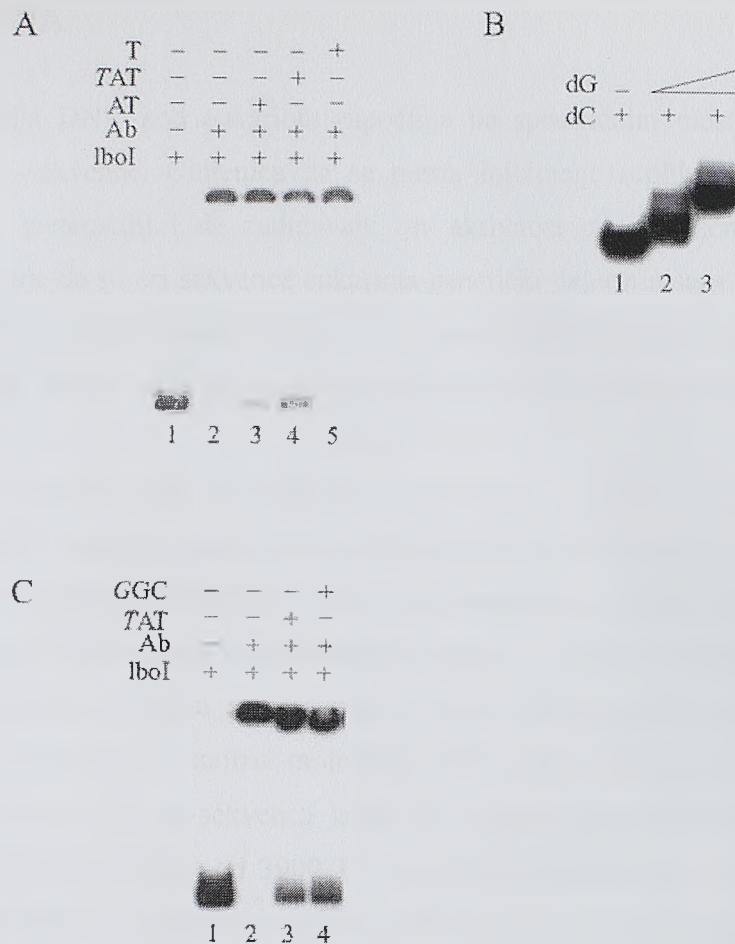
obeleženi fragmentom lboI. Produkti reakcije analizirani su elektroforezom u 4% poliakrilamidnom gelu sa TBE puferom, a dobijeni rezultati prikazani na slici 4.18C.

Primećuje se upadljiva razlika u kompeticiji između fragmenata lboI i B13. Već i mali višak neobeležene lboI uklanja antitelo sa obeležene ori-sekvence, dok sa druge strane 400x molarni višak kontrolne DNK (B13) gotovo da nema efekta. Ovim eksperimentom potvrđeno je da antitelo specifično prepoznaje neki strukturni element prisutan u *ori* DNK, ali ne i u kontrolnom fragmentu B13.

Budući da je strukturna analiza *ori* lamin B2 ukazala da specifični strukturni element može biti tripleks, analizirana je interakcija antitela sa kratkim tripleksom tipa TAT. U tu svrhu, formirani tripleksi, dužine 34 ili 40 bp, inkubirani su sa antitelom, a potom je u smešu dodavan radioaktivno obeležen fragment lboI. Kompeticija je vršena sa 500x molarnim viškom trolančane DNK u odnosu na <sup>32</sup>P-lboI. Po završetku inkubacije uzorci su analizirani u 4% poliakrilamidnim gelovima sa TBE puferom (slika 4.19A). Uočava se značajni kompetitivni efekat tripleksa, dok u kontrolnim reakcijama sa jedno- ili dvolančanim konstituentima tripleksa ovaj efekat nije toliko izražen. Ovime je pokazano da i antitelo, kao i protein HsOrc4, specifično prepoznaje trolančanu strukturu.

Osim tripleksa tipa TAT, DNK vezivna aktivnost antitela testirana je i sa tripleksom tipa GGC. Kratki GGC tripleksi formirani su inkubacijom radioaktivno obeležene poli(dC)<sub>34</sub> sa rastućom količinom poli(dG)<sub>34</sub> u puferu za vezivanje (slika 4.19B).

U eksperimentu kompeticije tripleksi su pripremani od neradioaktivnih konstituenata. Za TAT triplekse korišćen je 100x molarni višak poli(dT)<sub>34</sub>, dok je za GGC triplekse korišćen 10x molarni višak poli(dG)<sub>34</sub>. Ispitivanje interakcije tripleksa sa antitelom vršeno je kao što je već opisano u prethodnom eksperimentu, a rezultati su prikazani na slici 4.19C.



Slika 4.19 Interakcija antitela sa trolančanim strukturama.

A)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa antitelom (2-5) u prisustvu poli(dA)<sub>34</sub>·poli(dT)<sub>34</sub> (3), poli(dT)<sub>34</sub>·poli(dA)<sub>34</sub>·poli(dT)<sub>34</sub> (4), poli(dT)<sub>34</sub> (5). B) Formiranje GGC tripleksa,  $^{32}\text{P}$ -poli(dC)<sub>34</sub> (1) inkubiran sa 2x (2) ili 10x (3) molarnim viškom poli(dG)<sub>34</sub>. C)  $^{32}\text{P}$ -lboI (1) inkubiran sa antitelom (2-4) u prisustvu poli(dT)<sub>34</sub>·poli(dA)<sub>34</sub>·poli(dT)<sub>34</sub> i poli(dG)<sub>34</sub> (3) ili poli(dG)<sub>34</sub>·poli(dC)<sub>34</sub>·poli(dG)<sub>34</sub> i poli(dT)<sub>34</sub> (4).

Kompeticija sa *ori* lamin B2 za vezivanje sa antitelom primećena je i kod tripleksa GGC tipa. Isti kompetitivni efekat tripleksa TAT i GGC ukazuje da antitelo ne pravi razliku između ova dva tipa trolančanih struktura. Kako u fragmentu lboI ne postoje sekvence koje imaju sposobnost da nagrade tripleks tipa GGC, to je mogućnost da *ori* lamin B2 formira tripleks ovog tipa isključena. Rezultati dobijeni interakcijom antitela i fragmenta lboI u skladu su sa prethodno dobijenim i potvrđuju prisustvo neortodoksne strukture u *ori*-sekvenci lamin B2 koja, po svemu sudeći, predstavlja formu tripleksa.

## 5. DISKUSIJA

Replikacija DNK kod eukariota započinje na specifičnim mestima u genomu nazvanim *ori*-sekvence. Činjenica da se mesta inicijacije replikacije nasleđuju iz generacije u generaciju i da zadržavaju *ori* aktivnost na ektopičnim mestima u genomu ukazuje da su *ori*-sekvence eukariota genetički determinisane. Međutim, sem sekvence ACS kod pekarskog kvasca, u do sada identifikovanim *ori*-sekvencama eukariota nije detektovana konsenzusna sekvenca koja bi označavala mesta *ori* aktivnosti.

U cilju rasvetljavanja specifičnosti *ori*-sekvenci u ovom radu analizirana je struktura i oblik humane *ori*-sekvence lamin B2 koja je aktivna u velikom broju ćelijskih linija i zadržava *ori* aktivnost po prebacivanju na ektopično mesto u genomu. Ispitivani region obuhvatao je pretpostavljeno mesto otpočinjanja bidirekcionne sinteze DNK kao i region zaštićen proteinima *in vivo* i *in vitro*. Hemijskim agensima, pogodnim za strukturnu analizu molekula DNK dužine nekoliko stotina baznih parova, utvrđeno je da *ori*-sekvenca lamin B2 zauzima neortodoksnu strukturu *in vitro*. Najuočljiviji je region od 3900-3912 nukleotida koji pokazuje karakterističan obrazac reaktivnosti na hemijske agense u oba ispitivana fragmenta DNK (lboI i lboII). Osetljivost nukleotida oba lanca ukazuje da se ovaj region nalazi u denaturisanom obliku i formira strukturu okca u analiziranim fragmentima. Uzvodno od njega nalazi se niz nukleotida (ACGTACGGATCGCAC) za koji je kompjuterskom predikcijom utvrđeno da ima sklonost zauzimanja strukture Z-DNK. Osetljivost ovog regiona na hemijske agense i enzim DNaza I potvrdila je da se on, bar u jednom broju ispitivanih molekula, nalazi u Z-formi DNK.

Elektroforezom u poliakrilamidnom gelu detektovana je anomalna pokretljivost fragmenata lboI i lboII, veća nego što bi se očekivalo na osnovu njihove linearne dužine. Ovaj efekat je izraženiji u prisustvu jona  $Mg^{2+}$ , za koje je poznato da smanjuju elektrostatičko odbijanje između naelektrisanih grupa i samim tim podržavaju formiranje različitih struktura u molekulu DNK. Rezultati ovog eksperimenta ukazuju da se *ori*-sekvenca ne nalazi u linearnoj formi već zauzima alternativnu strukturu koja smanjuje efektivnu dužinu molekula i povećava pokretljivost u gelu.

Sudeći po intenzitetu traka dobijenih u hemijskim esejima struktura okca prisutna je u većini analiziranih molekula dok je osetljivost ostalih nukleotida manje izražena i ukazuje na moguće postojanje strukturnog polimorfizma u analiziranoj *ori*-sekvenci.

Po elektroforezi fragmenata lboI i lboII u većini slučajeva detektuje se jedna traka što ukazuje da se polimorfizam javlja u istoj dominantnoj formi molekula ili u nekoliko podjednako verovatnih formi koje sve imaju slične elektroforetske karakteristike.

Iako povećana pokretljivost na poliakrilamidnom gelu može da bude posledica izrazite fleksibilnosti molekula, stabilno prisustvo denaturisanog regiona unutar linearnog fragmenta, i karakteristična reaktivnost pirimidina u okviru denaturisanog regiona ukazuje na složeniju strukturu. Detaljnom analizom sekvence fragmenata lboI i lboII uočava se da zadovoljavaju uslove za formiranje intramolekulskih trolančanih struktura. Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljena su dva modela koja objašnjavaju formiranje ovakvih struktura.

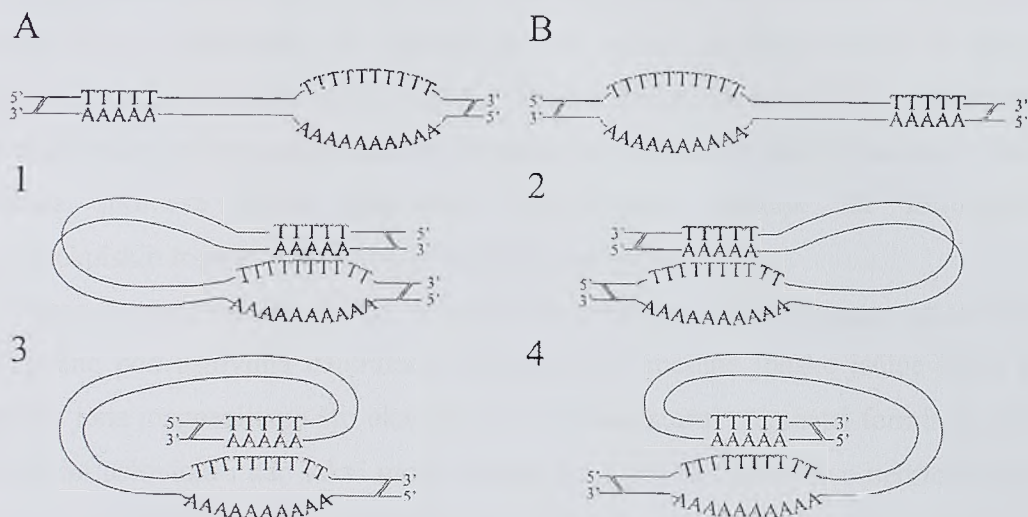
Po jednom modelu intramolekulski tripleks nastaje savijanjem lanca bogatog pirimidinima u regionu okca koji potom uspostavlja Hoogsteen-ove vodonične veze sa purinima u susednom, dvolančanom regionu, dok njemu komplementaran lanac bogat purinima ostaje u jednolančanoj formi. Međutim, eksperimentima hibridizacije nisu detektovani jednolančani regioni u okviru lanca bogatog purinima pa je formiranje tripleksa po ovom modelu isključeno.

Drugi model pretpostavlja da trolančane strukture u ori-sekvenci lamin B2 nastaju interakcijom udaljenih homopurinskih-homopirimidinskih regiona. Po ovom modelu u regionu, koji sadrži donor trećeg lanca tripleksa, komplementarni lanci su nesporeni i jedan od njih formira Hoogsteen-ove vodonične veze sa purinskim lancem drugog, akceptorskog regiona. U fragmentu lboI postoji 12 nizova (dA)-(dT) koji se međusobno odnose kao simetrični ponovci tipa MRI i GRI i čijom interakcijom mogu da se formiraju trolančane strukture. Region koji sadrži okce sa udaljenim sekvencama gradi 9 tipova MRI i 2 tipa GRI simetričnih ponovaka. Sa druge strane, centralni timini u denaturisanom regionu pokazuju delimičnu neosetljivost na dejstvo hemijskih agenasa specifičnih za jednolančanu strukturu dok njima komplementarni adenini izrazito reaguju sa DEPC-om. Unutar fragmenta lboI detektovan je samo jedan region u jednolančanoj formi što ukazuje da se region sa kojim interaguju timini nalazi u dvolančanom obliku te za posledicu ima formiranje trolančane strukture. Stvaranje vodoničnih veza između timina u regionu okca i dvolančanih nizova adenina može objasniti uočeno stabilno prisustvo denaturisanog regiona.

Kako unutar analiziranog fragmenta postoji više simetričnih sekvenci sa kojima je moguća interakcija timina denaturisanog regiona postoji i veći broj alternativnih strukturnih formi, ali sve one u sebi sadrže strukturu dvolančane petlje u čijoj se



osnovi nalazi tripleks. Na slici 5.1. prikazane su neke moguće strukture koje se formiraju po interakciji centralnih timina okceta i jednog od kraćih nizova A·T. Primenjenim tehnikama nemoguće je tačno odrediti akceptorski region, jer su u njemu nukleotidi neosetljivi na dejstvo hemijskih agenasa kao što bi bili i u dvolančanoj formi. Kako treći lanac čine nukleotidi timina, koji imaju sposobnost da nagrađe i klasične i reverzne Hoogsteen-ove vodonične veze, njegova orijentacija u odnosu na centralni lanac bogat purinima može biti i paralelna i antiparalelna.



Slika 5.1. Model trolančane strukture ori-sekvence lamin B2. Akceptorski region nalazi se uzvodno (A) ili nizvodno (B) u odnosu na donorski lanac tripleksa, a lanci spojeni Hoogsteen-ovim vodoničnim vezama mogu biti paralelno (1, 2) ili antiparalelno (3, 4) orijentisani.

Da bi formiranje tripleksa po ovom modelu bilo moguće, sam fragment DNK mora biti dovoljno fleksibilan da podrži stvaranje strukture dvolančane petlje i obezbedi neposredan kontakt između interagujućih regiona. Hibridizacijom radioaktivno obeleženog oligonukleotida (dT)<sub>40</sub> sa fragmentom IboI detektovani su signali i ispod najkraće linearne forme intermolekulskog tripleksa, što ukazuje da su u okviru jednog fragmenta IboI nizovi adenina povezani međusobno polipirimidiniskim mostom i da ori-sekvencija ima sposobnost da obrazuje dvolančanu petlju.

Prisustvo sekvenci koje formiraju tripleks i Z-DNK uočeno je i kod humane c-myc i hrčkove DHFR ori-sekvence (Liu et al., 2003, Bianchi et al., 1990) koje su u oba slučaja bile klonirane u cirkularne plazmide. Pod uticajem superspiralizacije i u uslovima niskog pH, primećeno je da ove ori-sekvence zauzimaju trolančanu strukturu tipa C<sup>+</sup>GC. Formiranje tripleksa nezavisno od superspiralizacije, uočeno je

između simetričnih homopurinskih-homopirimidinskih ponovaka jednog ili više linearnih molekula (Hampel et al., 1994). Ove strukture bile su stabilne i nakon narušavanja uslova pod kojima su formirane, a stabilnost tripleksa je bila posledica nastanka topološki zaključane strukture (braided knot). Intramolekulski tripleksi nezavisni od superspiralizacije mogu da se formiraju i u fragmentima lboI i lboII. Međutim, iako oni sadrže veći broj simetričnih homopurinskih-homopirimidinskih ponovaka analiza elektroforetske pokretljivosti pokazuje da zauzimaju jednu dominantu formu (slika 4.7), koja putuje brže nego što bi se očekivalo na osnovu linearne dužine fragmenta, što ukazuje da se većina molekula nalazi u formi intramolekulskog tripleksa (slika 4.10A). Sporija traka predstavljala bi strukturu intermolekulskog tripleksa koji nastaje interakcijom simetričnih ponovaka dva ili više molekula lboI, a njeno sporadično pojavljivanje ukazuje da formiranje intermolekulskih tripleksa zavisi od komponenti prisutnih u puferu.

Važno je napomenuti da su nekanonske strukture u ori-sekvenci lamin B2 detektovane pod uslovima neutralnog pH, niske ili umerene jonske jačine kao i u prisustvu jona magnezijuma što ukazuje da se ovi strukturni elementi formiraju pod fiziološkim uslovima i kao takvi mogu postojati u živoj ćeliji. Ovakve neortodokсне strukture mogle bi da predstavljaju jednu od opštih karakteristika ori-sekvenci jer su detektovane u regionu sa asimetrično raspoređenim nizovima adenina i timina, karakterističnim i za druge eukariotske replikatore. Prisustvo trolančane strukture u ori-sekvenci posebno je značajno ukoliko doprinosi njenoj funkciji u inicijaciji replikacije. Podaci iz literature ukazuju da su AT bogati regioni neophodni za *ori* aktivnost (Paixao et al., 2004) i da mogu da se razmenjuju između različitih ori-sekvenci eukariota (Altman and Fanning, 2004), što ukazuje da oni u sebi sadrže informaciju bitnu za funkciju ori-sekvence u inicijaciji replikacije, a to može biti upravo struktura tripleksa. Regioni na spojevima dvolančane i trolančane strukture, kao i lanac DNK komplementaran donorskom lancu tripleksa formirali bi otvorenu strukturu koja olakšava pristup inicijacionim proteinima i sintezu početnih nizova nukleotida.

Sa druge strane, nizovi timina *ori* lamin B2 odgovorni za formiranje pretpostavljene trolančane strukture nalaze se u regionima uključenim u interakciju sa kompleksom ORC, što ukazuje da struktura tripleksa može da predstavlja deo mehanizma kojim inicijacioni protein prepoznaje ori-sekvence. Podaci iz literature pokazuju da HsORC ima malu DNK-vezivnu specifičnost i da se preferencijalno

vezuje za AT bogate regione. Po svoj prilici subjedinica 4 obezbeđuje DNK vezivnu aktivnost celokupnog kompleksa, jer se obrazac vezivanja ORC-a za ori-sekvencu može reprodukovati sa proteinom HsOrc4 (Stefanović et al., 2003). Ukoliko ori-sekvencu zaista gradi trolančanu formu, HsOrc4 bi morao da prepozna strukturu tripleksa.

Interakcija proteina HsOrc4 sa ori-sekvencom ili trolančanom DNK ispitivana je u prisustvu različitih kompetitora. Utvrđeno je da HsOrc4 prepoznaje intermolekulski tripleks tipa TAT za koji se direktno vezuje sa velikim afinitetom. Protein je pokazivao i slab afinitet za jednolančani poli(dT)<sub>40</sub>, dok sa dvolančanim poli(dA)<sub>40</sub>·poli(dT)<sub>40</sub> i jednolančanim poli(dA)<sub>40</sub> nije detektovana interakcija. U eksperimentima kompeticije prisustvo trolančanih struktura je značajno smanjivalo količinu proteina vezanog za ori-sekvencu, dok ovaj efekat nije primećen u reakcijama sa dvo- ili jednolančanom DNK. Kompeticija je bila izraženija sa dugim trolančanim kompetitorom što bi se moglo objasniti kooperativnim vezivanjem proteina HsOrc4 za DNK.

Kooperativno vezivanje za višestruka vezivna mesta, po svoj prilici, odgovorno je za nisku DNK vezivnu specifičnost kompleksa ORC detektovanu u ranijim eksperimentima (Vashee et al., 2003). Naime, ako se proteinu ponude veoma dugi sintetski kopolimeri sastavljeni od monotonih ili naizmeničnih A i T nastavaka, on će se sa malim afinitetom, kooperativno vezati za mnoga mesta, nadoknađujući brojem interakcija njihovu pojedinačnu slabost. Osim toga, poznato je da veoma dugi molekuli relativno lako grade neortodoksne strukture, pa i to može biti jedan od razloga kompetitivne efikasnosti dugih sintetskih molekula DNK. Važno je naglasiti, da, sa kratkim supstratima na kojima nema mesta za više proteinskih molekula, afinitet pojedinačnih molekula proteina nije dovoljan da održi dvolančanu DNK u kompleksu, ali je sasvim dovoljan za interakciju sa trolančanom DNK. Veoma slična logika važi i za prirodne, *ori* DNK koje u sebi sadrže relativno duge AT bogate regione. Verovatno je u ovom slučaju inicijalni i najspecifičniji događaj vezivanje inicijacionog proteina za tripleks, a zatim sledi kooperativno prepoznavanje manje specifičnih, dvolančanih mesta. Afinitet koji HsOrc4 ispoljava prema jednolančanom nukleotidu sastavljenom od timina takođe može biti značajan i sugerisati da sam protein možda stimuliše formiranje tripleksa.

Rezultati dobijeni sa poliklonским antitelom iz seruma miševa imunizovanih proteinom HsOrc4 potvrđuju pretpostavke o neortodoksnoj strukturi ori-sekvence

lamin B2 i posebnoj vezivnoj specifičnosti proteina HsOrc4. Osim sa ćelijskim i rekombinantnim proteinom HsOrc4, ovo antitelo je interagovalo i sa DNK. U eksperimentima kompeticije njegova DNK-vezivna svojstva detaljno su analizirana. Uočeno je da antitelo efikasno interaguje sa trolančanom DNK, dok je njegov afinitet za dvolančanu i jednolančanu DNK nizak. Kompeticija sa tripleksima TAT i GGC pokazala je da antitelo ne pravi razliku između ova dva tipa tripleksa. Sa druge strane, razlika u kompeticiji ori-sekvence i fragmenta B13, poreklom iz regiona koji ne učestvuje u inicijaciji replikacije, ukazala je da antitelo prepoznaje neki element u *ori* lamin B2 koji nije prisutan u regionu izvan ori-sekvence. Ovi rezultati sugerišu da je DNK-vezivna aktivnost antitela specifična za trolančanu strukturu i da je upravo ta struktura odgovorna za veći afinitet antitela za ori-sekvencu u odnosu na fragment B13. Kompleksan imuni odgovor na rekombinantni protein HsOrc4 je posledica prisustva imunogene DNK koja je u preparat za imunizaciju mogla da dospe jedino u kompleksu sa proteinom HsOrc4 i kao takva odslikava DNK-vezivna svojstva ovog proteina.

Ukupni rezultati u ovom radu nedvosmisleno pokazuju da humani *ori* lamin B2 zauzima neortodokсну strukturu *in vitro* i sugerišu da je ta struktura odgovorna za interakciju DNK i inicijacionog proteina. Priroda protein-DNK interakcije na ori-sekvenci veoma je važna za razumevanje samog procesa selekcije mesta u genomu na kojima započinje replikacija. Kod *S. pombe* kompleks ORC vezuje se za *ori* preko "AT-hook" domena u subjednici 4 (Chuang and Kelly, 1999). Međutim, ORC poreklom iz *X. laevis*, kod koga DNK-vezivni domen nije definisan, prepoznaje i vezuje ista mesta na kojima otpočinje replikacija kao i SpORC (Kong et al., 2003), što ukazuje da za prepoznavanja ori-sekvenci nije neophodno prisustvo "AT-hook" domena. Sa druge strane, studije interakcije kompleksa ORC i ori-sekvence horionskog lokusa *D. melanogaster* pokazale su da struktura DNK utiče na afinitet vezivanja kompleksa DmORC za DNK (Remus et al., 2004). Naime, afinitet inicijacionog proteina bio je 30 puta veći za negativno superspiralizovanu DNK u odnosu na relaksiranu formu što ukazuje da je upravo struktura DNK odgovorna za specifična DNK-vezivna svojstva kompleksa DmORC.

Svojstvo ori-sekvence da zauzme trolančanu strukturu koju specifično prepoznaje inicijacioni protein bi omogućilo njenu selekciju naspram regiona koji ne učestvuju u inicijaciji replikacije, a sama efikasnost kojom *ori* formira tripleks bi uticala na učestalost kojom se data ori-sekvencu aktivira. Na efikasnost zauzimanja trolančane

strukture, osim osobina same ori-sekvence, utiče i struktura hromatina u kojoj se ona nalazi. Na ovaj način, svi faktori koji utiču na remodelovanje hromatina (transkripcija, nivo acetilacije histona) mogli bi da imaju regulatornu ulogu u specifikaciji mesta inicijacije replikacije i prilagode obrazac aktivnih ori-sekvenci promenama u ćeliji koje se događaju tokom rasta i razvića organizma.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Humana ori-sekvenca lamin B2 zauzima neortodoksnu strukturu *in vitro* u uslovima neutralnog pH, niske ili umerene jonske jačine i 2 mM jona magnezijuma.
2. Neortodokсна структура по свему судећи представља интрамолекулски триплекс који настаје интеракцијом централних тмина структуре окца у региону 3900-3912 и једног од краћих низова (dA)·(dT).
3. Antitelo na rekombinantni protein HsOrc4 specifično prepoznaje element u ori-sekvenci lamin B2 koji izostaje u regionu koji ne učestvuje u inicijaciji replikacije. Jednolančani (dT)<sub>40</sub> i dvolančani (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> ne utiču na interakciju antitela sa ori-sekvencom, dok tripleksi tipa TAT i GGC pokazuju značajan kompetitivni efekat. Kako *ori* lamin B2 ne sadrži sekvence koje imaju sposobnost da nagrade triplex tipa GGC, ovim je potvrđeno da su u ispitivanoj ori-sekvenci prisutni intramolekulski tripleksi TAT.
4. Rekombinantni protein HsOrc4 specifično prepoznaje i vezuje kratku trolančanu DNK tipa TAT. Za (dT)<sub>40</sub> se vezuje sa malim afinitetom, dok sa (dA)<sub>40</sub> i (dA)<sub>40</sub>·(dT)<sub>40</sub> nije detektovana interakcija.
5. Kompeticija jedno-, dvo- i trolančanih molekula DNK u vezivanju HsOrc4 za ori-sekvencu pokazala je da protein razlikuje trolančanu strukturu od jedno- i dvolančane i specifično se vezuje za nju i da je, судећи по ефикасности конкуренције, trolančana DNK veoma slična prirodnim vezivnim mestima proteina HsOrc4.
6. Intramolekulski triplex u *ori* lamin B2 formira se interakcijom nizova (dA)·(dT) karakterističnih i za druge ori-sekvence i može predstavljati jedno od opštih svojstava ishodišta replikacije eukariota. Sudeći po DNK vezivnoj specifičnosti proteina HsOrc4, intramolekulski tripleksi predstavljaju deo mehanizma kojim protein HsOrc4, a samim tim i kompleks ORC, prepoznaje i selektuje ori-sekvence eukariota.

## 7. LITERATURA

- **Abdurashidova** G, Riva S, Biamonti G, Giacca M, Falaschi A. Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *EMBO J.* 1998 May 15;17(10):2961-9.
- **Abdurashidova** G, Deganuto M, Klima R, Riva S, Biamonti G, Giacca M, Falaschi A. Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science.* 2000 Mar 17;287(5460):2023-6.
- **Abdurashidova** G, Danailov MB, Ochem A, Triolo G, Djeliova V, Radulescu S, Vindigni A, Riva S, Falaschi A. Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *EMBO J.* 2003 Aug 15;22(16):4294-303.
- **Agazie** YM., Burkholder GD. and Lee JS. Triplex DNA in the nucleus: direct binding of triplex-specific antibodies and their effect on transcription, replication and cell growth. *Biochem. J.* 1996. 316 ( Pt 2): 461–466.
- **Aladjem** MI, Rodewald LW, Kolman JL, Wahl GM. Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science.* 1998 Aug 14;281(5379):1005-9.
- **Altman** AL, Fanning E. The Chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1098-110. Erratum in: *Mol Cell Biol* 2002 Sep;22(17):6319.
- **Altman** AL, Fanning E. Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol Cell Biol.* 2004 May;24(10):4138-50.
- **Austin** RJ, Orr-Weaver TL, Bell SP. *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev.* 1999 Oct 15;13(20):2639-49.
- **Basham** B, Eichman BF, Ho PS. The single-crystal structure of Z-DNA. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure.* Oxford Univ. Press 82, 1998. pp. 199–252.
- **Beall** EL, Manak JR, Zhou S, Bell M, Lipsick JS, Botchan MR. Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):833-7.

- **Behe** MJ. An overabundance of long oligopurine tracts occurs in the genome of simple and complex eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 1995. **23**: 689–695.
- **Bell** SP, Stillman B. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature.* 1992 May 14;357(6374):128-34.
- **Bell** SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002. 71:333-74.
- **Bell** SP. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.* 2002 Mar 15;16(6):659-72.
- **Bianchi** A, Wells RD, Heintz NH, Caddle MS. 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 Dec 15;265(35):21789-96.
- **Bielinsky** AK, Blitzblau H, Beall EL, Ezrokhi M, Smith HS, Botchan MR, Gerbi SA. Origin recognition complex binding to a metazoan replication origin. *Curr Biol.* 2001 Sep 18;11(18):1427-31.
- **Bielinsky** AK, Gerbi SA: Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J Cell Sci* 2001, 114:643-651.
- **Blow** JJ, Laskey RA. Initiation of DNA replication in nuclei and purified DNA by a cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Cell.* 1986 Nov 21;47(4):577-87.
- **Bosco** G, Du W, Orr-Weaver TL. DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol.* 2001 Mar;3(3):289-95.
- **Brahmachari** SK., Sarkar PS., Raghavan S., Narayan M. and Maiti AK. Polypurine/polypyrimidine sequences as cis-acting transcriptional regulators. *Gene* 1997. **190**: 17–26.
- **Brewer** BJ, Fangman WL. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell.* 1987 Nov 6;51(3):463-71.
- **Brewer** BJ, Fangman WL. Mapping replication origins in yeast chromosomes. *Bioessays.* 1991 Jul;13(7):317-22.
- **Carminati** JL, Johnston CG, Orr-Weaver TL. The *Drosophila* ACE3 chorion element autonomously induces amplification. *Mol Cell Biol.* 1992 May;12(5):2444-53.
- **Chesnokov** I, Remus D, Botchan M. Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 9;98(21):11997-2002.



- **Chesnokov** IN, Chesnokova ON, Botchan M. A cyto kinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Aug 5;100(16):9150-5.
- **Chuang** RY, Kelly TJ. The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 16;96(6):2656-61.
- **Clyne** RK, Kelly TJ. Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*. 1995 Dec 15;14(24):6348-57.
- **Coverley** D, Laskey RA. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1994. 63:745-76.
- **Danis** E, Brodolin K, Menut S, Maiorano D, Girard-Reydet C, Mechali M. Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol*. 2004 Aug;6(8):721-30.
- **Delmolino** LM, Saha P, Dutta A. Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):26947-54.
- **DePamphilis** ML. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays*. 1999 Jan;21(1):5-16. Review
- **DePamphilis** ML. Eukaryotic DNA replication origins: reconciling disparate data. *Cell*. 2003a Aug 8;114(3):274-5.
- **DePamphilis** ML. The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene*. 2003b May 22;310:1-15. Review.
- **Dijkwel** PA, Wang S, Hamlin JL. Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(9):3053-65.
- **Dimitrova** DS, Giacca M, Demarchi F, Biamonti G, Riva S, Falaschi A. In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Feb 20;93(4):1498-503.
- **Dubey** DD, Zhu J, Carlson DL, Sharma K, Huberman JA. Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*. 1994 Aug 1;13(15):3638-47.
- **Dubey** DD, Kim SM, Todorov IT, Huberman JA. Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol*. 1996 Apr 1;6(4):467-73.

- **Edenberg** HJ, Huberman JA. Eukaryotic chromosome replication. *Annu Rev Genet.* 1975. 9:245-84.
- **Edwards** MC, Tutter AV, Cvetic C, Gilbert CH, Prokhorova TA, Walter JC. MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33049-57.
- **Epner** E, Forrester WC, Groudine M. Asynchronous DNA replication within the human beta-globin gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov;85(21):8081-5.
- **Ermakova** OV, Nguyen LH, Little RD, Chevillard C, Riblet R, Ashouian N, Birshstein BK, Schildkraut CL. Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):321-30.
- **Giacca** M, Zentilin L, Norio P, Diviacco S, Dimitrova D, Contreas G, Biamonti G, Perini G, Weighardt F, Riva S, et al. Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jul 19;91(15):7119-23.
- **Gilbert** DM. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science.* 2001 Oct 5;294(5540):96-100.
- **Giordano-Coltart** J, Ying CY, Gautier J, Hurwitz J. Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 4;102(1):69-74.
- **Giovannangeli** C and Helene C. Triplex-forming molecules for modulation of DNA information processing. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000. **2**: 288–296.
- **Guieysse** AL, Praseuth D and Helene C. Identification of a triplex DNA-binding protein from human cells. *J. Mol. Biol.* 1997. **267**: 289–298.
- **Hampel** KJ, Burkholder GD, Lee JS. Plasmid dimerization mediated by triplex formation between polypyrimidine-polypurine repeats. *Biochemistry.* 1993 Feb 2;32(4):1072-7.
- **Hampel** KJ, Ashley C, Lee JS. Kilobase-range communication between polypurine-polypyrimidine tracts in linear plasmids mediated by triplex formation: a braided knot between two linear duplexes. *Biochemistry.* 1994 May 17;33(19):5674-81.
- **Harland** RM, Laskey RA. Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. *Cell.* 1980 Oct;21(3):761-71.

- **Heinzel** SS, Krysan PJ, Tran CT, Calos MP. Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol.* 1991 Apr;11(4):2263-72.
- **Htun** H, Dahlberg JE Single strands, triple strands, and kinks in H-DNA. *Science.* 1988 Sep 30;241(4874):1791-6.
- **Htun** H, Dahlberg JE. Topology and formation of triple-stranded H-DNA. *Science.* 1989 Mar 24;243(4898):1571-6. Review.
- **Huberman** JA, Riggs AD. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol.* 1968 Mar 14;32(2):327-41.
- **Jacob** F., Brenner S. and Cuzin F. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1963. 28: 329.
- **Kemp** MG, Ghosh M, Liu G, Leffak M. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A alters the pattern of DNA replication origin activity in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 13;33(1):325-36.
- **Kim** SM, Huberman JA. Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):7294-303.
- **Kiyama** R, Camerini-Otero RD. A triplex DNA-binding protein from human cells: purification and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10450-4.
- **Klemm** RD, Austin RJ, Bell SP. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell.* 1997 Feb 21;88(4):493-502.
- **Kohwi** Y, Malkhosyan SR and Kohwi-Shigematsu T. Intramolecular dG.dG.dC triplex detected in *Escherichia coli* cells. *J. Mol. Biol.* 1992. **223**: 817-822.
- **Kong** D, DePamphilis ML. Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(23):8095-103.
- **Kong** D, DePamphilis ML. Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. *EMBO J.* 2002 Oct 15;21(20):5567-76.
- **Kong** D, Coleman TR, DePamphilis ML. *Xenopus* origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC. *EMBO J.* 2003 Jul 1;22(13):3441-50.

- **Leatherwood J**, Vas A. Connecting ORC and heterochromatin: why? *Cell Cycle*. 2003 Nov-Dec;2(6):573-5. Review.
- **Lee DG**, Bell SP. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 1997 Dec;17(12):7159-68.
- **Lee DG**, Makhov AM, Klemm RD, Griffith JD, Bell SP. Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. *EMBO J*. 2000 Sep 1;19(17):4774-82.
- **Lee JK**, Moon KY, Jiang Y, Hurwitz J. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13589-94
- **Lei M**, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*. 2001 Apr;114(Pt 8):1447-54. Review.
- **Leu TH**, Hamlin JL. High-resolution mapping of replication fork movement through the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells by in-gel renaturation analysis. *Mol Cell Biol*. 1989 Feb;9(2):523-31.
- **Li JJ**, Herskowitz I. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*. 1993 Dec 17;262(5141):1870-4.
- **Li CJ**, DePamphilis ML. Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol Cell Biol*. 2002 Jan;22(1):105-16.
- **Liang C**, Weinreich M, Stillman B. ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell*. 1995 Jun 2;81(5):667-76.
- **Lipford JR**, Bell SP. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell*. 2001 Jan;7(1):21-30.
- **Liu G**, Malott M, Leffak M. Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator. *Mol Cell Biol*. 2003 Mar;23(5):1832-42.
- **Lu L**, Zhang H, Tower J. Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for *Drosophila* chorion gene amplification. *Genes Dev*. 2001 Jan 15;15(2):134-46.
- **Machida YJ**, Dutta A. Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6253-6. Review.

- **Mahbubani** HM, Paull T, Elder JK, Blow JJ. DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res.* 1992 Apr 11;20(7):1457-62.
- **Maiorano** D, Moreau J, Mechali M. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature.* 2000 Apr 6;404(6778):622-5.
- **Marahrens** Y, Stillman B. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science.* 1992 Feb 14;255(5046):817-23.
- **Mendez** J, Stillman B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol.* 2000 Nov;20(22):8602-12.
- **Mendez** J, Stillman B. Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. *Bioessays.* 2003 Dec;25(12):1158-67.
- **Micklem** G, Rowley A, Harwood J, Nasmyth K, Diffley JF. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature.* 1993 Nov 4;366(6450):87-9.
- **Mirkin** SM. and Frank-Kamenetskii MD. (1994) H-DNA and related structures. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 541–576.
- **Mizushima** T, Takahashi N, Stillman B. Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes Dev.* 2000 Jul 1;14(13):1631-41.
- **Moon** KY, Kong D, Lee JK, Raychaudhuri S, Hurwitz J. Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12367-72.
- **Musso** M, Nelson LD and Van Dyke MW. Characterization of purine-motif triplex DNA-binding proteins in HeLa extracts. *Biochemistry* 1998. **37**: 3086–3095.
- **Natale** DA, Li CJ, Sun WH, DePamphilis ML. 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 Jun 1;19(11):2728-38.
- **Neidle** S, Parkinson GN. The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol.* 2003 Jun;13(3):275-83. Review.
- **Nguyen** VQ, Co C, Irie K, Li JJ. Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol.* 2000 Feb 24;10(4):195-205.

- **Nguyen VQ**, Co C, Li JJ. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature*. 2001 Jun 28;411(6841):1068-73.
- **Nishitani H**, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):625-8.
- **Ohno M**, Fukagawa T, Lee JS and Ikemura T. Triplexforming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies. *Chromosoma* 2002. **111**: 201–213.
- **Paixao S**, Colaluca IN, Cubells M, Peverali FA, Destro A, Giadrossi S, Giacca M, Falaschi A, Riva S, Biamonti G. Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(7):2958-67.
- **Pak DT**, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, Marr J, Romanowski P, Botchan MR. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*. 1997 Oct 31;91(3):311-23.
- **Palecek E**. Local supercoil-stabilized DNA structures. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 1991. 26:151–226.
- **Pelizon C**, Madine MA, Romanowski P, Laskey RA. Unphosphorylatable mutants of Cdc6 disrupt its nuclear export but still support DNA replication once per cell cycle. *Genes Dev*. 2000 Oct 1;14(19):2526-33.
- **Petersen BO**, Wagener C, Marinoni F, Kramer ER, Melixetian M, Denchi EL, Gieffers C, Matteucci C, Peters JM, Helin K. Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev*. 2000 Sep 15;14(18):2330-43.
- **Prasanth SG**, Prasanth KV, Stillman B. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science*. 2002 Aug 9;297(5583):1026-31.
- **Raghuraman MK**, Winzeler EA, Collingwood D, Hunt S, Wodicka L, Conway A, Lockhart DJ, Davis RW, Brewer BJ, Fangman WL. Replication dynamics of the yeast genome. *Science*. 2001 Oct 5;294(5540):115-21.
- **Rao H**, Marahrens Y, Stillman B. Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators. *Mol Cell Biol*. 1994 Nov;14(11):7643-51.
- **Remus D**, Beall EL, Botchan MR. DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for Drosophila ORC-DNA binding. *EMBO J*. 2004 Feb 25;23(4):897-907.

- **Rich** A, Nordheim A, Wang AHJ. 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 53:791–846.
- **Rivin** CJ, Fangman WL. Replication fORC rate and origin activation during the S phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 1980 Apr;85(1):108-15.
- **Rowles** A, Tada S, Blow JJ. Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 ( Pt 12):2011-18.
- **Rowley** A, Cocker JH, Harwood J, Diffley JF. Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *EMBO J.* 1995 Jun 1;14(11):2631-41.
- **Saha** S, Shan Y, Mesner LD, Hamlin JL. The promoter of the Chinese hamster ovary dihydrofolate reductase gene regulates the activity of the local origin and helps define its boundaries. *Genes Dev.* 2004 Feb 15;18(4):397-410.
- **Saitoh** Y, Miyagi S, Ariga H, Tsutsumi K. Functional domains involved in the interaction between Orc1 and transcriptional repressor AIF-C that bind to an origin/promoter of the rat aldolase B gene. *Nucleic Acids Res.* 2002 Dec 1;30(23):5205-12.
- **Sarkar** P. S. and Brahmachari S. K. (1992) Intramolecular triplex potential sequence within a gene down regulates its expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* 20: 5713–18.
- **Seki** T, Diffley JF. Stepwise assembly of initiation proteins at budding yeast replication origins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14115-20.
- **Shareef** MM, King C, Damaj M, Badagu R, Huang DW, Kellum R. *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol Biol Cell.* 2001 Jun;12(6):1671-85.
- **Sinden** RR. *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, CA. 1994.
- **Soyfer** VN, and Potaman VN. *Triple-helical Nucleic Acids*, Springer-Verlag, New YORC. 1996.
- **Spradling** AC. ORC binding, gene amplification, and the nature of metazoan replication origins. *Genes Dev.* 1999 Oct 15;13(20):2619-23.

- **Stanojčić S.** Interakcija inicijacionih proteina sa ori-sekvencom regiona lamin B2. Doktorska teza. 2003.
- **Stefanovic D, Stanojčić S, Vindigni A, Ochem A, Falaschi A.** In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):42737-43.
- **Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW.** Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature.* 1979 Nov 1;282(5734):39-43.
- **Tada S, Li A, Maiorano D, Mechali M, Blow JJ.** Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol.* 2001 Feb;3(2):107-13.
- **Takahashi T, Ohara E, Nishitani H, Masukata H.** Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *EMBO J.* 2003 Feb 17;22(4):964-74.
- **Tanaka S, Diffley JF.** Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat Cell Biol.* 2002 Mar;4(3):198-207.
- **Tribioli C, Biamonti G, Giacca M, Colonna M, Riva S, Falaschi A.** Characterization of human DNA sequences synthesized at the onset of S-phase. *Nucleic Acids Res.* 1987 Dec 23;15(24):10211-32.
- **Triolo T, Sternglanz R.** Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature.* 1996 May 16;381(6579):251-3.
- **Trivedi A, Waltz SE, Kamath S, Leffak M.** Multiple initiations in the c-myc replication origin independent of chromosomal location. *DNA Cell Biol.* 1998 Oct;17(10):885-96.
- **Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ, Walter JC.** Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* 2003 Aug 1;17(15):1894-908.
- **Vashee S, Simancek P, Challberg MD, Kelly TJ.** Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem.* 2001 Jul 13;276(28):26666-73.
- **Vujcic M, Miller CA, Kowalski D.** Activation of silent replication origins at autonomously replicating sequence elements near the HML locus in budding yeast. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep;19(9):6098-109.
- **Walter J, Newport JW.** Regulation of replicon size in *Xenopus* egg extracts. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):993-5.



- **Wang L**, Lin CM, Brooks S, Cimbora D, Groudine M, Aladjem MI. The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(8):3373-86.
- **Weinreich M**, Liang C, Chen HH, Stillman B. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11211-7.
- **Wells RD**, Blakesley RW, Hardies SC, Horn GT, Larson JE, Selsing E, Burd JF, Chan HW, Dodgson JB, Jensen KF, Nes IF and Wartell RM. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1977. 4, 305-340.
- **Wu JR**, Gilbert DM. A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science.* 1996 Mar 1;271(5253):1270-2.
- **Wu JR**, Keezer SM, Gilbert DM. Transformation abrogates an early G1-phase arrest point required for specification of the Chinese hamster DHFR replication origin. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1810-8.
- **Wyrick JJ**, Aparicio JG, Chen T, Barnett JD, Jennings EG, Young RA, Bell SP, Aparicio OM. Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science.* 2001 Dec 14;294(5550):2357-60.
- **Zou L**, Stillman B. Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science* 1998. 280:593-596.
- **Zweifel SG**, Fangman WL. Creation of ARS activity in yeast through iteration of non-functional sequences. *Yeast.* 1990 May-Jun;6(3):179-86.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

INTERAKCIJA INICIJACIONOG proteina ORC  
SA REPLICATOROM REGIONA LAMIN B2

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 7.9 2015

plene kucic

Прилог 2.

## Изјава о коришћењу

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

INTERAKCIJA INICIJACIONE, PROTEINA ORC SA  
REPLICATOROM REGIONA LAMIN B2

која је моје ауторско дело.

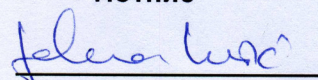
Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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 следећој страници.)

Потпис



У Београду, 7.9.2015