

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Božić

Intramolekularna rekombinacija u bakterijama
Escherichia coli i *Agrobacterium tumefaciens*

Diplomski rad

Zagreb, 2008. godina

*Zahvala roditeljima koji su me ohrabivali,
Profesorima koji su me naučili,
Prijateljima koji su me trpili.*

*Zahvalu dugujem doc. dr. sc. Ivani Ivan i Ba e koja je uložila mnogo
truda kako bi ovaj diplomski rad privedi kraju.*

*Tako er želim zahvaliti dr. sc. Nenadu Malenici na svim sugestijama koje mi
je davao tijekom istraživanja i izrade rada.*

*Hvala svim članovima grupe prof. dr. sc. Višnje Besendorfer i njoj samoj na
svim usmjeravanjima i komentarima.*

*Na kraju, posebno veliko hvala mojem prerano preminulom mentoru
doc. dr. sc. Sre ku Jeleni u, koji je bio inspiracija svima.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

INTRAMOLEKULARNA REKOMBINACIJA U BAKTERIJAMA *Escherichia coli* I *Agrobacterium tumefaciens*

Luka Bokor
Zavod za molekularnu biologiju
Prirodoslovno-matematički fakultet, Horvatovac 102a, Zagreb

Sažetak: Uzastopno ponovljeni sljedovi nalaze se u genomima mnogih organizama i podložni su delecijama i amplifikacijama, te su velik uzrok genomske nestabilnosti. Genetička analiza rearanžiranih ponovljenih sljedova u bakteriji *Escherichia coli* je pokazala da je u njihov nastanak uključeno nekoliko mehanizama. Mogu se ugrubo podijeliti na RecA-ovisne i RecA-neovisne mehanizme.

Ovim radom željeli smo ispitati efikasnost intramolekularne rekombinacije u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*, te je usporediti s onom u bakteriji *Escherichia coli*. U tu svrhu napravili smo plazmid koji sadrži direktno ponovljene nepotpune gene za otpornost na spektinomycin razmaknute genom za otpornost na ampicilin. Otpornost na spektinomycin može nastati ili RecA-ovisnom homolognom rekombinacijom, pri čemu dolazi do delecije gena za otpornost na ampicilin ili RecA-neovisno pri čemu se zadržava gen za otpornost na ampicilin i amplificiraju geni za otpornost na spektinomycin. U ovom radu smo pokazali da je intramolekularna rekombinacija u *A. tumefaciens* uglavnom RecA-neovisna.

(53 stranice, 24 slike, 7 tablica, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: direktna ponavljanja, rekombinacija, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, RecA

Voditelj: Dr. sc. Ivana Ivančić Bašić, doc.

Pomoćni voditelj: Dr. sc. Nenad Malenica

Ocjenitelji: Dr. sc. Ivana Ivančić Bašić, doc.
Dr. sc. Davor Kovačević, doc.
Dr. sc. Tajana Preočanin, doc.
Dr. sc. Ines Radanović, doc.

Rad prihvaćen: 03. prosinca 2008.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

INTRAMOLECULAR RECOMBINATION IN BACTERIA *Escherichia coli* AND *Agrobacterium tumefaciens*

Luka Božić
Department of Molecular Biology
Faculty of Science, Horvatovac 102a, Zagreb

Abstract: Tandemly repeated DNA sequences are common in the genomes of many organisms and are susceptible to deletions and amplifications. That way they are a major cause of genome instability. Genetic analysis of repeated sequence rearrangements in *Escherichia coli* has revealed that multiple mechanisms participate in the process. They can be roughly divided into RecA-dependant and RecA-independent mechanisms. In this graduation thesis we wanted to test intramolecular recombination efficiency of bacterium *Agrobacterium tumefaciens* and compare it to that in *Escherichia coli*. For that purpose we have designed a plasmid which has tandem repeats of incomplete spectinomycin genes separated with ampicillin resistance gene. Spectinomycin resistance can be achieved either by RecA-dependant homologous recombination between direct repeats, while simultaneously deleting ampicillin resistance gene, or by RecA-independent mechanisms, which yields both ampicillin resistance gene and spectinomycin resistance genes amplification as a product. In this graduation thesis we have shown that intramolecular recombination in *A. tumefaciens* is mostly RecA-independent.

(53 pages, 24 pictures, 7 tables, 26 references, original in: croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: tandem repeats, recombination, *Agrobacterium tumefaciens*,
Escherichia coli, RecA

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Bašić, Asst. Prof.

Assistant supervisor: Dr. Nenad Malenica

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Bašić, Asst. Prof.
Dr. Davor Kovačević, Asst. Prof.
Dr. Tajana Preočanin, Asst. Prof.
Dr. Ines Radanović, Ass. Prof.

Thesis accepted: 3rd December 2008.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. GENETIKA I REKOMBINACIJA	2
1.2. INTRAMOLEKULARNA REKOMBINACIJA	3
1.2.1. Model proklizavanja DNA polimeraze	7
1.2.2. Replikacijsko nesravnavanje povezano s izmjenom sestrinskih kromatida	8
1.4. BAKTERIJE <i>Escherichia coli</i> I <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.4.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	9
1.4.2. Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA	11
2. MATERIJAL I METODE	12
2.1. MATERIJAL	13
2.1.1. Organizmi	13
2.1.1.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.1.2. Bakterija <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.1.2. Plazmidi (vektori)	13
2.1.2.1. Plazmid pCAMBIA2300 (pC2300)	13
2.1.2.2. Plazmid pBluescript SK (pSK)	14
2.1.2.3. Plazmid pPZP200	14
2.1.3. Otopine	14
2.1.3.1. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija	14
2.1.3.2. Restriksijska digestija plazmidne DNA	15
2.1.3.3. Bijelo-plava selekcija	15
2.1.3.4. Priprema otopina antibiotika	15
2.1.4. Hranjive podloge	16
2.1.5. Antibiotici	16
2.1.6. Otopine za gel-elektroforezu	17
2.1.7. Kompleti za pročišćavanje DNA	17
2.1.8. Za etnice	17
2.2. METODE	18
2.2.1. Priprema hranjivih podloga	18
2.2.2. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom	18
2.2.3. Plavo-bijela selekcija	19
2.2.4. Izolacija plazmidne DNA – miniprep	19
2.2.5. Restriksijska digestija plazmidne DNA	20
2.2.5.1. Priprema markera	21
2.2.6. Taloženje DNA etanolom	22
2.2.7. Obrada krajeva linearne DNA Klenow-om enzimom	22
2.2.8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	22
2.2.9. Ligacija plazmidne DNA	23

2.2.10. Detekcija rekombinacije i izražavanje u estalosti rekombinacije	24
2.2.11. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu	24
2.2.12. Izdvajanje fragmenata DNA iz agaroznog gela	24
2.2.13. Priprema i određivanje kompetentnosti elektrokompetentnih bakterijskih stanica	25
2.2.14. Mjerenje optičke gustoće bakterijske suspenzije	26
2.2.15. Mjerenje koncentracije DNA u otopini	26
3. REZULTATI	27
3.1. Umnožavanje gena za otpornost na spektinomycin s deletiranim 5' krajem i 3' krajem PCR-om	28
3.2. Plazmidi pCSpecES-Sma i pCSpecHS-Sma	29
3.3. Plazmid pSK(EV)Amp	32
3.4. Plazmid pCSpecESAmp	34
3.5. Plazmid pC SpecAmpi- HB	36
3.6. Provjera ispravnosti plazmida pC SpecAmpi- HB	39
3.7. Istraživanje u estalosti intramolekularne rekombinacije u bakteriji <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
3.8. Utvrđivanje mehanizma rekombinacije u bakteriji <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.9. Istraživanje u estalosti intramolekularne rekombinacije u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	42
3.10. Izolacija plazmida iz transformanata i restrikcijska analiza	43
4. RASPRAVA	45
5. ZAKLJUČAK	48
6. LITERATURA	50

1.1. Geneti ka rekombinacija

Geneti ka rekombinacija prvi je put definirana kada se uo ilo da se geni na razli itim kopijama homolognih kromosoma u vinske mušice mogu presložiti tijekom mejoze. Nedugo zatim otkri e DNA kao geneti kog materijala dalo je dva modela rekombinacije na molekularnoj razini. Model izbora kopije (engl. copy-choice) pretpostavlja da rekombinantna molekula DNA nastaje za vrijeme sinteze DNA na na in da DNA polimeraza prvo zapo ne kopiranje jednog roditeljskog lanca, a zatim se prebaci na kopiranje drugog. Alternativni model predlagao je da do rekombinacije dolazi lomom i ponovnim spajanjem dvaju roditeljskih molekula DNA, a ne sintezom nove molekule DNA. Iz modela izbora kopije kasnije su se razvili modeli RecA-neovisne rekombinacije, dok su se iz alternativnog modela razvili modeli mehanizama RecA-ovisne homologne rekombinacije (The Cell: A Molecular Approach, 2004).

Homologna rekombinacija definira se kao izmjena homolognih segmenata izme u dvije, ili unutar jedne, molekule DNA. Isto tako identificirana je kao glavni proces rekombinacijskog popravka DNA (Kuzminov, 1999; Grompone i sur., 2004). Rekombinacijom s homolognim slijedom DNA na neošte enom kromosomu ovaj mehanizam osigurava obnovu normalnog slijeda nukleotida u molekuli DNA. Homolognom rekombinacijom nastaju nove kombinacije alela, što tijekom evolucije dovodi do stvaranja geneti ke raznolikosti.

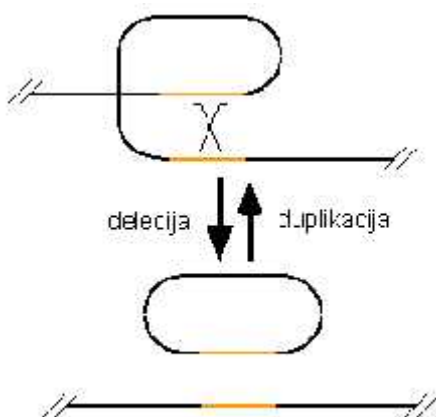
Proces homologne rekombinacije zapo inje stvaranjem jednolan ane DNA (ssDNA) koja e se spariti s homolognim dupleksom i dovesti do izmjene lanaca. U bakteriji *Escherichia coli* u pripremi ssDNA sudjeluju dva osnovna puta homologne rekombinacije: RecBCD i RecF (poznat je i tre i, RecE put, koji je manje zna ajan). U divljem tipu bakterije *E. coli* homologna rekombinacija odvija se primarno RecBCD putem (Kowalczykowski i sur., 1994).

Dužina homolognih dijelova neposredno utje e na u estalost procesa rekombinacije (Bi i Liu, 1996). Za homologne dijelove ve e od 1 000 parova baza (pb) utvr eno je da rekombiniraju pomo u proteina RecA, dok je kod sljedova kra ih od 1 000 pb uo eno da mogu rekombinirati i neovisno o tom proteinu (Lovett i sur., 2002). Za taj

slučaj rekombinacije utvrđeno je da mora postojati minimalni dio identičnog slijeda nukleotida između dvije sekvence (MEPS-minimal effective processing segment), koji u bakteriji *E. coli* iznosi 150 pb, odnosno 44-99 pb za RecA-ovisnu rekombinaciju, ovisno o putu kojim se rekombinacija odvija (RecBCD ili RecF) (Shen i Huang, 1986).

1.2. Intramolekularna rekombinacija

Uzastopno ponovljeni slijedovi nalaze se u genomima mnogih organizama i podložni su delecijama i amplifikacijama. Ovi rearanžmani se mogu dogoditi između ponovljenih gena dugih nekoliko kilobaza ili između kratkih fragmenata dužine svega nekoliko nukleotida. Genetička analiza rearanžmana ponovljenih slijedova u bakteriji *E. coli* je pokazala da je u procesu uključeno nekoliko mehanizama (Saveson i Lovett, 1997). Ti mehanizmi mogu se ugrubo podijeliti na RecA-ovisne i RecA-neovisne.



Slika 1. Intramolekularna homologna rekombinacija. Narandastom bojom istaknuti su homologni slijedovi na dvolančnoj molekuli DNA. Isprekidanim linijama želi se istaknuti kako se molekula DNA nastavlja ispred i iza homolognih slijedova (preuzeto iz: Maloy, 1994).

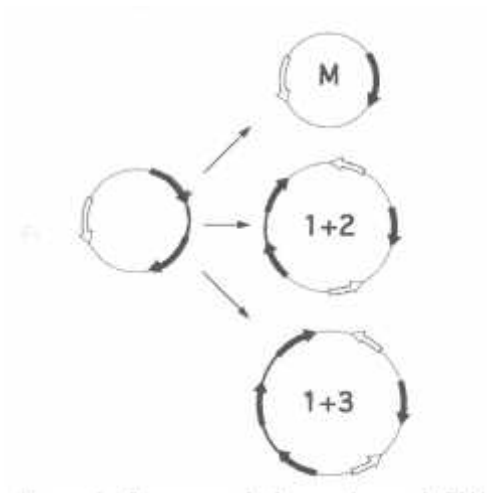
I RecA-ovisan i RecA-neovisan rearanžman zbiva se između slijedova koji pokazuju homologiju. RecA-ovisni mehanizmi rekombinacije zahtijevaju homologne slijedove u minimalnoj dužini od 200 pb, dok RecA-neovisni mehanizmi ne pokazuju potrebu za takvim uvjetima (Dianov i sur., 1991; Bi i Liu, 1994). RecA-neovisna rekombinacija odvija se između krajeva od 100 pb. Posebno su zanimljiva kratka ponavljanja slijedova

dužine do pet parova nukleotida (koja se nazivaju mikrosateliti), zato što su se pokazala vrlo nestabilna u eukariotskim genomima. Rearanžirani na mikrosatelitima su povezani s nekim genetskim poremećajima u ovjeka, kao što su Huntingtonova bolest, miotonička mišićna distrofija i sindrom krhkog X kromosoma. Za procese nastanka delecije između uzastopno ponavljaju ih sljedova DNA dužine do 100 pb odgovoran je isključivo RecA-neovisan put rekombinacije, dok u procesu delecije između sljedova dužine 787 pb omjer udjela RecA-ovisne i RecA-neovisne rekombinacije iznosi 2:3 (Lovett i sur., 1994; Lovett i sur., 1993).

Mehanizmi RecA-neovisne rekombinacije su posljedica pogreške u replikaciji. Smatra se da postoji više puteva kojima se odvija RecA-neovisna rekombinacija: mehanizam proklizavanja DNA polimeraze i replikacijsko nesravnivanje povezano s izmjenom sestrinskih kromatida (Bzymek i Lovett, 2001).

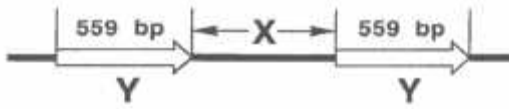
RecA-neovisna rekombinacija odvija se s visokom učestalosti između homolognih sljedova smještenih na istoj molekuli DNA, dok između homolognih sljedova smještenih na dvije različite molekule DNA učestalost rekombinacije ovisi o proteinu RecA (Bzymek i Lovett, 2001). Najbitnija značajka RecA-neovisne rekombinacije jest da ovisi o razmaknutosti homolognih sljedova. Povećanjem udaljenosti između homolognih sljedova, učestalost rekombinacije eksponencijalno opada (Lovett i sur., 1994; Bi i Liu, 1994; 1996). Kako bi RecA-neovisna rekombinacija uopće bila moguća nužno je da homologni sljedovi nisu međusobno udaljeni više od 10 kb (Lovett, 2004).

U istraživanjima rekombinacije između homolognih sljedova koriste se plazmidi u kojima se nalaze uzastopno ponovljeni sljedovi odvojeni bilo kojim slijedom između homolognih sljedova. Očekivani produkt rekombinacije između direktnih ponavljanja na plazmidu je monomerni plazmid (M) (Slika 2.). Zanimljivo, uz monomerni plazmid kao produkt RecA-neovisne rekombinacije pojavili su se dimerni i trimerni oblici (Slika 2.) (Lovett i sur., 1993; Bi i Liu, 1994). U nekim slučajevima kao jedini produkti rekombinacije pojavljuju se dimerni oblici (Dianov i sur. 1991, Bi i Liu, 1994).

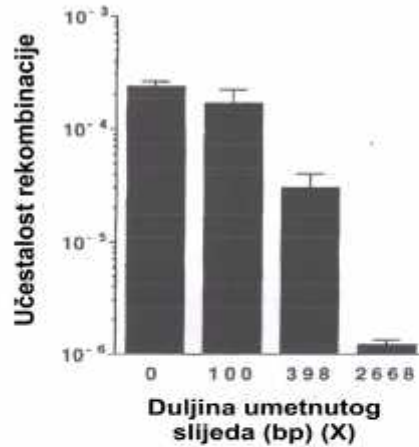


Slika 2. Struktura produkata nastalih DNA rearanžmanom izme u direktnih ponavljanja. Pune strelice označavaju direktna ponavljanja; zadebljane linije označavaju umetnuti slijed; prazne strelice označavaju smjer slijeda na plazmidu izvan ponavljanja i smjer umetnutog slijeda (preuzeto iz: Bi i Liu, 1996).

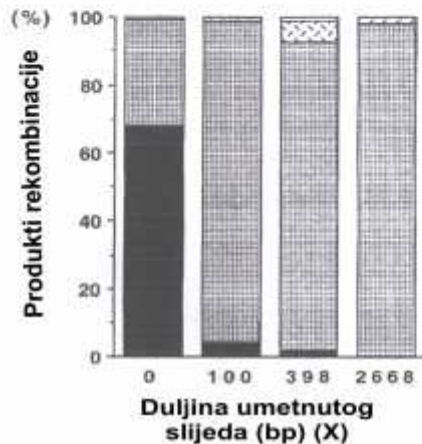
Također, zamijetno je da u učestalost rekombinacije i udio pojedinih produkata rekombinacije direktno ovise o duljini slijeda izme u direktnih ponavljanja i duljini direktnih ponavljanja. Plazmidi s vrlo kratkim direktnim ponavljanjima (npr. 14 pb) stvaraju isključivo monomernu produkta. Plazmidi s duljim direktnim ponavljanjima stvaraju i monomernu i dimerne produkta. Isto tako, porastom duljine slijeda izme u direktnih ponavljanja (razmaknice) naglo opada udio monomernog produkta, a raste udio dimernog produkta (Slika 3.). Isto tako porastom duljine razmaknice naglo pada i učestalost rekombinacije (Bi i Liu, 1996).



A



B



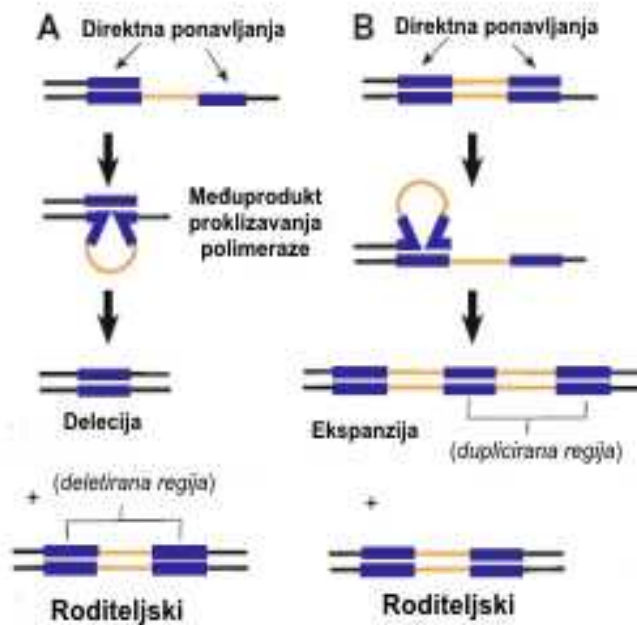
Slika 3. Utjecaj slijeda izme u direktnih ponavljanja na u estalost rekombinacije i vrstu produkata rekombinacije. Gornji graf pokazuje utjecaj duljine razmaknice izme u ponavljanja na u estalost rekombinacije; donji graf pokazuje utjecaj duljine razmaknice na vrstu produkta. Crna boja-monomer, to kasto-dimer, iscertano-trimer (preuzeto iz: Bi i Liu, 1996).

Do danas su prepoznata dva razli ita modela kojima se odvija RecA-neovisna rekombinacija izme u direktnih ponavljanja:

- 1) Model proklizavanja DNA polimeraze (engl. replication “slippage” model);
- 2) Replikacijsko nesravnivanje povezano s izmjenom sestrinskih kromatida (engl. sister-chromosome exchange-associated replication misalignment model).

1.2.1. Model proklizavanja DNA polimeraze

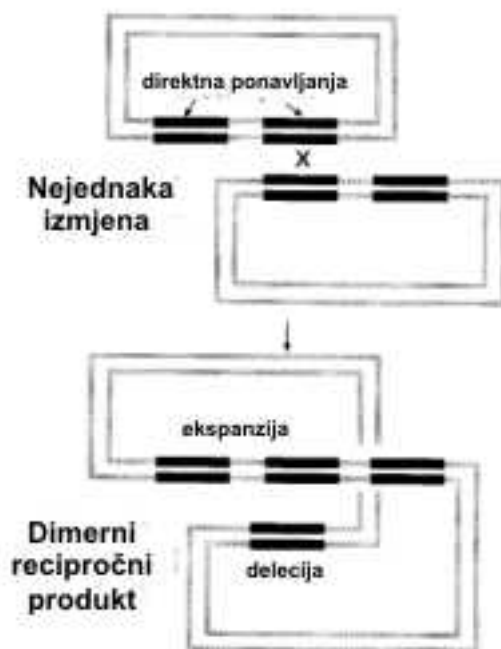
Model proklizavanja DNA polimeraze izvorno je nastao kao mehanizam kojim se objašnjava pojava mutacija pomaka okvira itanja. Eksperimentima je pokazano da zastajanje DNA polimeraze tijekom replikacije ponavljaju ih sljedova stimulira replikacijsko proklizavanje polimeraze (Canceill i Ehrlich, 1996). Dolazak DNA polimeraze do prve direktno ponavljaju e regije dovodi do zastoja i disocijacije replikacijske vilice, izvijanja dvostrukog DNA lanca kalupa i sparivanja s idu im homolognim slijedom. Smatra se da zato po nastavku replikacije polimeraza “proklizi” na sljede u ponavljaju u sekvencu istog lanca kalupa koja može biti udaljena do nekoliko stotina nukleotida (Slika 4.) (Viguera i sur., 2001). Nastavak sinteze DNA na krivo sparenom položaju tada za rezultat ima delecije i duplikacije (Bzymek i Lovett, 2001). Model proklizavanja DNA polimeraze objašnjava ovisnost RecA-neovisnih rearanžmana o homologiji i udaljenosti direktno ponavljaju ih sljedova. Mehanizam proklizavanja DNA polimeraze ograni en je na ponavljanja koja su razmaknuta manje od deset kilobaza, zbog toga što dva ponavljanja moraju biti u interakciji s istom replikacijskom vilicom (Lovett, 2004.)



Slika 4. Model proklizavanja DNA polimeraze (preuzeto iz: Lovett, 2004).

1.2.2. Replikacijsko nesravnivanje povezano s izmjenom sestrinskih kromatida

Jednostavni model proklizavanja DNA polimeraze unato zadovoljavaju em prikazivanju utjecaja homologije i razmaka izme u ponavljaju ih sljedova ne može objasniti sve uo ene RecA-neovisne tipove rearanžmana. Jedan dio RecA-neovisnih produkata vjerojatno je povezan sa dimerizacijom replikona. Nastanak tih dimernih produkata ne može se objasniti jednostavnim proklizavanjem pri replikaciji lanca DNA u nastajanju po lancu kalupu. No, crossing-over izme u kružnih plazmidnih replikona može stvoriti kružne dimere. Sli no modelu proklizavanja, smatra se da prilikom normalnog popravka replikacijske vilice dolazi do izmjene kalupa zbog pogreške pri sparivanju na inverzno ili direktno ponavljaju im sljedovima drugog replikona (Bzymek i Lovett, 2001). Eksperimentima je pokazano da RecA-neovisni dimerni produkti nisu rezultat intermolekularnog crossing-over-a, nego intramolekularnih interakcija sestrinskih kromatida (Slika 5.).



Slika 5. Replikacijsko nesravnivanje povezano s izmjenom sestrinskih kromatida. Nejednoliki crossing-over izme u direktnih ponavljanja stvara kružne dimere, Nakon ega je jedan alel u triplikatu, a jedan deletiran (preuzeto iz: Bzymek i Lovett, 2003).

1.4. Bakterije *Escherichia coli* i *Agrobacterium tumefaciens*

1.4.1. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je Gram-negativna fakultativno anaerobna bakterija koja ne stvara spore. Posjeduje kružni kromosom veličine 4.6 Mb. Optimalna temperatura za uzgoj bakterije *E. coli* je 37°C. U optimalnim uvjetima na bogatoj hranjivoj podlozi vrijeme izmeće u dioba *E. coli* je 22-25 minuta. Kultivirani sojevi su dobro prilagođeni na laboratorijske uvjete. *E. coli* je jedan od glavnih modelnih organizama u molekularnoj biologiji. Posjeduje enzime za izmjenu DNA molekula konjugacijom, transdukcijom ili transformacijom, što omogućuje brzo horizontalno širenje genetičkog materijala. Svi rekombinacijski procesi dosada poznati otkrivani su istraživanjima na *E. coli*, kao i njihovi mehanizmi. Također se koristi u biotehnologiji, kao povoljan organizam za stvaranje rekombinantne DNA, koja je postala osnova biotehnologije. Izmjenjene *E. coli* koriste se u procesima stvaranja cjepiva, bioremedijaciji, produkciji enzima i mnogim drugim postupcima.

1.4.2. Bakterija *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterija *Agrobacterium tumefaciens* je Gram-negativna štapičasta bakterija koja ne stvara spore. Najpoznatija je po tome što uzrokuje tumore u biljaka, a kako tumore izaziva prijenosom DNA u biljnu stanicu domaćina postala je objekt intenzivnih istraživanja transformacije biljnih stanica.

A. tumefaciens ima neobičnu kromosomsku organizaciju. Posjeduje jedan linearni kromosom veličine 2 Mb, jedan kružni kromosom veličine 2.8 Mb, te Ti (tumor-inducirajući) plazmid veličine 206.479 kb. Geni koji uzrokuju tumore u biljaka nalaze se većinom na Ti plazmidu. Dio Ti plazmida (oko desetine) ugrađuje se u jezgrinu DNA biljnih stanica i time ih se transformira. Dio Ti plazmida koji se ugrađuje u jezgrinu DNA naziva se T-DNA (prijenosna ili transfer-DNA).

O rekombinaciji u *A. tumefaciens* nije provedeno mnogo istraživanja. Usporedbom sekvenci genoma različitih prokariota poznato je da sadrži protein AddAB umjesto proteina RecBCD. Također, sadrži šest kopija gena za Ku protein koji je ključan u mehanizmu nehomolognog sparivanja krajeva (engl. non-homologous end joining), što omogućuje, budući

da je to glavni marker za NHEJ, da se dio popravka DNA odvija i tim mehanizmom. Kada nastane dvostrani lom u molekuli DNA prvo dolazi do vezanja Ku kompleksa na dva kraja molekule DNA. Ku protein je glavni marker za postojanje NHEJ procesa u nekim organizmima. Prokariotski Ku protein veličine je 30-40 kDa, dok je eukariotski veličine 70-80 kDa (Aravind i Koomin, 2001). Nakon vezanja Ku proteina dolazi do nukleolitičke razgradnje krajeva dvostranog loma do nastanka ravnih krajeva (npr. polimerazama α i β) ukoliko su krajevi nekomplementarni ili oštećeni. Posljednji korak je sparivanje dvaju lanaca. Taj korak odvija se pomoću NAD^+ -ovisnih ili ATP-ovisnih DNA ligaza. Često su Ku geni organizirani u operone koji sadrže potrebne ligaze (Aravind i Koomin, 2001). Još nije poznato na in na koji se kompleks odvaja od ligirane molekule DNA. Većina proteina napušta mjesto ligacije pasivnom disocijacijom, no kako je Ku protein vezan kružno oko molekule DNA, smatra se da ili ostaje okružujuć DNA na tom mjestu, ili dolazi do proteolitičke razgradnje (Walker i sur., 2001).

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Geneti ka rekombinacija ima ključnu ulogu u o uvanju kromosomske stabilnosti i poticanju geneti ke raznolikosti. Iako je proces rekombinacije zajedni ki za sve žive organizme, enzimi rekombinacijskih procesa, kao i u inkovitost, te u estalost procesa rekombinacije u razli itim organizmima se razlikuju.

Posebno zanimljiva pojava je intramolekularna rekombinacija koja se odvija izme u direktnih ponavljanja. Direktna ponavljanja u genomu esto su uzrok delecija i duplikacija koje dovode do promjena u genomu. Delecije i duplikacije neki su od osnovnih mehanizama evolucije, no mogu biti i uzrok raznih genetskih bolesti.

U ovom radu željeli smo ispitati efikasnost rekombinacije u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens* i usporediti je s onom u bakterije *Escherichia coli*. U tu svrhu konstruirali smo plazmid na kojem se nalazi sustav koji omogu uje pra enje u estalosti rekombinacije. Plazmid sadrži direktno ponovljene nepotpune fragmente gena za otpornost na spektinomycin me usobno razmaknute genom za otpornost na ampicilin.

Jedan od na ina nastanka otpornosti na spektinomycin jest intramolekularnom rekombinacijom, pri emu mora do i do delecije gena za otpornost na ampicilin. Druga mogu nost je da intramolekularnom rekombinacijom nastanu duplikacije ponovljenih regija i nastanak dimera ili trimera.

Tako er, kako u slu aju rekombinacije *A. tumefaciens* nisu vršena intenzivna istraživanja, te nema mnogo spoznaja o procesima rekombinacije, željeli smo utvrditi postoji li zna ajan utjecaj RecA proteina na u estalost rekombinacije u našem rekombinacijskom sustavu.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. Organizmi

2.1.1.1. Bakterije *Escherichia coli* i *Agrobacterium tumefaciens*

Tablica 1. Genotip bakterijskih sojeva korištenih u istraživanju

Organizam	Soj	Relevantni genotip
<i>Escherichia coli</i>	AB1157	<i>F2 thi-1 hisG4 (gpt-proA)62 argE3 thr-1 leuB6 kdgK51 rfbD1 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31 rac2 l2</i>
	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZUM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	<i>rpoH_ hrcA_</i>
	UIA143	<i>autC58 recA::EryJ40 (pAtC58)</i>

2.1.2. Plazmidi (vektori)

2.1.2.1. Plazmid pCAMBIA2300 (pC2300)

Plazmid pC2300, ukupne veličine 8 742 pb, spada u grupu komercijalno dostupnih plazmida (pCambia vectors). To je vektor prisutan u velikom broju kopija u bakterijama (engl. high-copy vector). Nosi gen za otpornost na kanamicin, pUC18 polilinker, te *lacZ* gen koji omogućuje plavo-bijelu selekciju (vidi str. 19.). U ovom istraživanju plazmid pC2300 poslužio je kao vektor pri izradi plazmida pC SpecAmp^r-HB. U njega smo ugradili gene za otpornost na antibiotike spektinomycin i ampicilin.

2. Materijal i metode

2.1.2.2. Plazmid pBluescript SK (pSK)

Plazmid pBluescript SK spada u grupu komercijalnih plazmida. Veli ine je 2 961 pb i sadži sljedove koji uklju uju polilinker (MCS-multiple cloning site), gen za otpornost na antibiotik ampicilin i po etak replikacije (ORI-origin of replication) *E. coli* i faga f1. MCS se nalazi unutar *lacZ* kontroliranog gena koji omogu uje plavo-bijelu selekciju. U ovom pokusu služio je za umnažanje gena za ampicilin, te kao vektor koji stvara velik broj kopija (engl. high-copy vector).

2.1.2.3. Plazmid pPZP200

pPZP200 je plazmid dužine 6 741 pb koji sadži gen za otpornost na antibiotik spektinomycin. U ovom radu služio je kao kalup za umnažanje nepotpunih fragmenata gena za otpornost na spektinomycin pomo u lan ane reakcije polimerazom (PCR).

2.1.3. Otopine

2.1.3.1. Izolacija plazmidne DNA iz bakterija

- CH₃COOK pH=4,8 100 mL: 29,44 g kalijevog acetata otopi se u oko 80 mL dH₂O, a zatim se doda 11,5 mL ledene octene kiseline. Otopina se nadopuni s dH₂O do volumena 100 mL i izmjeri pH vrijednost, koja treba biti 4,8. Tako pripremljena otopina je 3M u odnosu na kalij, a 5M u odnosu na acetat.
- GTE pufer, 200 mL: Otopi se 1,98 g glukoze u malo dH₂O, potom se doda 5 mL 1M otopine TrisCl pH 8 i 4 mL 0,5M otopine EDTA, te nadopuni s dH₂O do volumena 200 mL.
- 0,22M NaOH, 50 mL: 0,44 g natrijevog hidroksida otopi se u 50 mL dH₂O.
- Fenol: Redestilirani fenol otopljen na 67°C i zasi en jednakim volumenom TE-pufera (pH 8,0). Ne sterilizira se i uva se u tamnoj boci pri 4°C.

2. Materijal i metode

- Kloroform-izoamilni alkohol 24:1, 100 mL: U 96 mL kloroforma doda se 4 mL izoamilnog alkohola, te otopina uva u tamnoj boci.
- 10%-tni SDS, 100 mL: 10 g natrij-dodecil sulfata otopi se u 100 mL dH₂O.
- 70%-tni C₂H₅OH, 100 mL: 72,9 mL 96%-tnog etanola nadopuni se s dH₂O do volumena 100 mL
- Ribonukleaza A (RNAsa A) otopi se u 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) i 15 mM natrijevom kloridu do kona ne koncentracije 10 µg/µl i zagrije 15 minuta u kipu oj vodenoj kupelji. Nakon hla enja do sobne temperature uva se pri -20°C.

2.1.3.2. Restriksijska digestija plazmidne DNA

- Boja Orange G, 10 mL: 1,5 g Ficoll 400 i boje Orange G na vrhu spatule (nije potrebno vagati) pomiješa se s malo dH₂O u graduiranoj pipeti. Nakon što se kemikalije otope, nadopuni se s dH₂O do 10 mL. Boja se uva na +4 °C.
- Pufer za elektroforezu 50 × TAE, 250 mL: 60,5 g TrisCl otopi se u malo dH₂O, zatim se doda 14,27 mL ledene octene kiseline i 25 mL 0,5M EDTA pH 8, te nadopuni s dH₂O do 250 mL.

2.1.3.3. Bijelo-plava selekcija

- IPTG (izopropil- -D-tiogalaktopiranozid): pripremi se otopina 23.83 mg/mL (100 mM) u ddH₂O.
- X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- -D-galaktopiranozid): otopi se 20 mg X-Gal u 1 mL dimetilformamidu (DMF).

2.1.3.4. Priprema otopina antibiotika

- Na tehni koj vagi u Falcon kivetu odvaže se potrebna masa antibiotika (prema uputstvu proizvo a a). Kiveta se tada dopuni sa ddH₂O do 10 mL, te se antibiotik otopi miješaju i na vorteksu. Kada je sav antibiotik otopljen, pomo u injekcijske šprice profiltrira se kroz odgovaraju i filter u sterilnu Falcon kivetu i uva na -20°C.

2. Materijal i metode

2.1.4. Hranjive podloge

LB (Luria Broth) podloga

Tripton	10 g/L
Ekstrakt kvasca	10 g/L
NaCl	5 g/L

Podloga 2xTY za bakteriju *Escherichia coli*

Pepton	16 g/L
Ekstrakt kvasca	10 g/L
NaCl	5 g/L

Pri izradi krute podloge u otopinu se dodaje 1.5 % agara.

Podloga s kanamicinom:

Kanamycin se dodaje u sterilnu podlogu do kona ne koncentracije od 50 µg/mL u krutu podlogu (ohla enu na oko 50°C).

2.1.5. Antibiotici

Tablica 2. Otopine antibiotika

ANTIBIOTIK	KONCENTRACIJA OTOPINE	RADNA KONCENTRACIJA
Ampicilin	100 mg/mL ddH ₂ O	100 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL ddH ₂ O	50 µg/mL
Spektinomycin	100 mg/mL ddH ₂ O	100 µg/mL
Tetraciklin	12.5 mg/mL 50% etanola	12.5 µg/mL

2. Materijal i metode

2.1.6. Otopine za gel-elektroforezu

- Agarozni gel, 50 mL: Otopi se agarozu u 1 x TAE-puferu (koji se pripremi razrijevanjem 50 x TAE-pufera). Koncentracija agaroze u gelu može biti 0.7 do 1.5 %, ovisno o potrebi.
- Etidij-bromid: Osnovna otopina priprema se u koncentraciji od 10 mg/mL, ne sterilizira se i čuva se pri 4°C u tamnoj boci. Otopina za vizualizaciju DNA priprema se dodatkom 50 µL osnovne otopine u jednu litru destilirane vode i tako se čuva u tamnoj boci.
- Pufer za elektroforezu 50 x TAE: 60,5 g TrisCl otopi se u malo dH₂O, doda 14,2 mL ledene octene kiseline i 25 mL 0,5M EDTA pH=8 i dopuni s dH₂O do 250 mL.
- Boja Orange G, 10 mL: 1,5 g Ficoll 400 i boje Orange G na vrhu spatule (nije potrebno vagati) pomiješa se s malo dH₂O u graduiranoj pipeti. Nakon što se kemikalije otope, dopuni se s dH₂O do 10 mL.

2.1.7. Kompleti za pročišćavanje DNA

- Komplet za pročišćavanje DNA iz otopine – "QIAquick PCR Purification kit" (QIAGEN, Njemačka). Sadrži pufer PB, PE, EB i kolone "QIAquick spin columns"
- Komplet za pročišćavanje DNA iz gela - "QIAquick Gel Extraction kit" (QIAGEN, Njemačka). Sadrži pufer QG, PE, EB i kolone "QIAquick spin columns"

2.1.8. Za etnice

Tablica 3. PCR za etnice

ZA	ETNICA	SEKVENCA
Spec1		5'-GAA TTC CGG GGT CTG ACG CTC AGT GG-3'
Spec2		5'-GAG CTC CGG CTC CGC AGT GGA TGG CG-3'
Spec3		5'-GTC GAC ATG ACG GGC TGA TAC TGG GC-3'
Spec4		5'-AAG CTT ATT CGG GCA CGA ACC CAG TG-3'
ampI		5'-CCC GGG GAT CTT TTC TAC GGG GTC TG-3'
ampII		5'-CCA CCA TCG TGG CAC TTT TCG GGG AAA TG-3'

2.2. METODE

2.2.1. Priprema hranjivih podloga

- **LB podloga za uzgoj bakterije *Escherichia coli*, 500 mL uz dodatak kanamicina**

Pomiješa se 5 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca i 2.5 g NaCl, te otopi u manjem volumenu destilirane vode. Nakon što se sastojci otope miješanjem na magnetskoj miješalici, otopina se nadopuni destiliranom vodom do 500 mL. Otopina se prelije u bocu za autoklaviranje u koju je potrebno dodati magneti , a za krutu podlogu doda se još i 7.5 g bakterijskog agara. Nakon autoklavliranja 18 minuta na 124 °C, te hla enja podloge, u sterilnim uvjetima dodaje se antibiotik kanamicin do kona ne koncentracije 50 µg/mL.

- **Podloga 2TY za bakterije *Escherichia coli*, 500 mL uz dodatak kanamicina**

Pomiješa se 5 g peptona, 5 g ekstrakta kvasca i 2.5 g NaCl, te otopi u manjem volumenu destilirane vode. Za krutu podlogu doda se još i 7.5 g bakterijskog agara. Nakon što se sastojci otope, miješanjem na magnetskoj miješalici, otopina se nadopuni destiliranom vodom do volumena 500 mL. Otopina se prelije u bocu za autoklaviranje u koju se dodaje magneti u slu aju krute podloge. Nakon autoklavliranja 18 minuta na 124 °C, te hla enja podloge na 50 °C u sterilnim uvjetima doda se antibiotik kanamicin do kona ne koncentracije 50 µg/mL.

2.2.2. Transformacija bakterijskih stanica elektroporacijom

Elektrokompetentnim stanicama (50 µL, pohranjene u Eppendorf epruvetama na -80°C) stavljenim na led doda se 5 µL DNA za transformaciju i prebace se u ohla enu kivetu za elektroporaciju (prethodno držanu na ledu). U nosa elektroporatora (MicroPulser (*Bio-Rad*, SAD) smjesti se kiveta s uzorkom i odabere odgovaraju i program. Nakon elektroporacije (*E. coli* na 1.8 kV, *A. tumefaciens* na 2.2 kV), brzo se doda 500 µL teku e bakterijske podloge (LB ili 2xTY) bez antibiotika, stanice se prebace u staklenu epruvetu i inkubiraju u tresilici najmanje 1 sat (*E. coli* na 37°C, *A. tumefaciens* na 28°C). Istovremeno

2. Materijal i metode

se u inkubatoru na 37°C zagriju odgovarajuće ploče na koje se u sterilnim uvjetima, nakon inkubacije, staklenim štapićem razmažu suspenzije.

2.2.3. Plavo-bijela selekcija

Plavo-bijela selekcija jedan je od načina prepoznavanja kolonija s rekombinantnim plazmidom. Temelji se na djelovanju enzima β -galaktozidaze, koji cijepa glikozidnu vezu bezbojnog 5-brom-4-klor-3-indolil- β -D-galaktopiranozida (X-gal), te omogućuje nastalom 5-brom-4-klor-3-hidroksi-indolu da dimerizira i oksidira na zraku, pri čemu nastaje spoj plave boje. β -galaktozidaza je enzim koji se sastoji od dvije podjedinice, β i β' . Za ove pokuse koriste se sojevi bakterija koji imaju funkcionalnu podjedinicu β , a nemaju funkcionalnu podjedinicu β' . Ako plazmid nosi gen za podjedinicu β , bakterija koja primi takav plazmid ima dostupne obje podjedinice enzima. Takve bakterije imaju na podlozi s X-gal plavo obojenje. Ukoliko je unutar gena za podjedinicu β ugrađen neki gen, tada ne nastaje β podjedinica enzima i bakterijske kolonije ostaju bijele. U podlozi se nalazi i antibiotik za koji plazmid nosi rezistenciju, kako bismo bili sigurni da bijele kolonije imaju ugrađen upravo željeni rekombinantni plazmid.

2.2.4. Izolacija plazmidne DNA – miniprep

Tekuća podloga s odgovarajućim antibiotikom inokulira se bakterijskom kolonijom s agarne ploče u sterilnim uvjetima i inkubira preko noći na 37°C. Nakon inkubacije bakterijska suspenzija se ulije u Eppendorf epruvetu od 1.5 mL i bakterije se istalože centrifugiranjem 5 min na 5 000 rpm. Supernatant se izbacuje (potrebno ga je dobro istresti lupkajući epruvetom po papiru kako bi se uklonilo što više neistota). Talogu se doda 100 μ L pufera GTE, bakterijske stanice se dobro resuspendiraju na vorteksu, te se ostave stajati na sobnoj temperaturi 5 min. Toj suspenziji doda se 200 μ L smjese 0.22 M NaOH i 10% -tni SDS (pomiješati prije upotrebe). Suspenzija se ostavi stajati na ledu 5 min. Doda se 250 μ L otopine kalijevog acetata (3M K i 5M acetat), resuspendira i ostavi na ledu 15 min. Suspenzija se potom centrifugira na +4°C 15 min na 15 000 rpm. Supernatant se prebacuje u sterilnu epruvetu (Eppendorf, 1.5 mL) na led. Doda se 500 μ L smjese fenol-kloroform-izoamil alkohol u omjeru 25:24:1, promiješa i centrifugira 5 min na sobnoj temperaturi.

2. Materijal i metode

Nakon centrifugiranja gornja faza se prebaci u istu sterilnu epruvetu i doda 1 mL hladnog 2-propanola. Ostavi se stajati na ledu 15 min (može i preko noći). Nakon stajanja otopina se centrifugira na + 4°C 15 min na 15 000 rpm, supernatant se izbac i talogu se doda 1 mL 70%-tnog etanola za ispiranje. Otopina se centrifugira 5 min na 14 000 rpm na sobnoj temperaturi, supernatant se izbac i talog suši na zraku. Kada se talog posuši, otopi se u 20 µL ddH₂O kojoj je prethodno dodana RNAza. Uzorci se uvaju na – 20°C.

2.2.5. Restriksijska digestija plazmidne DNA

U ovisnosti o količini DNA otopini se dodaju enzimi prema uputama proizvođača, uz odgovarajući pufer volumen kojeg iznosi 1/10 digestijske smjese.

Tablica 4. Smjesa za restriksijsku digestiju

ddH₂O	16 µL
Preporučeni pufer	2 µL
DNA	0.5-1µL
Restriksijska endonukleaza	0.5-1µL

Smjesa se lagano promiješa i spusti u centrifugi. Inkubira se na temperaturi optimalnoj za pojedini enzim prema uputama proizvođača.

Ukoliko je potrebno cijepati DNA pomoću dva enzima, preporučljivo je to izvršiti u istoj smjesi. Tada se prema uputama proizvođača odabere pogodan pufer, a postupak je identičan digestiji sa jednim enzimom. Ukoliko ne postoji pogodan zajednički pufer, restrikcija se provodi odvojeno, a nakon prve reakcije restrikcije DNA se precipitira.

2. Materijal i metode

2.2.5.1. Priprema markera

Za marker HindIII priredi se sljedeća smjesa za restriksijsku digestiju:

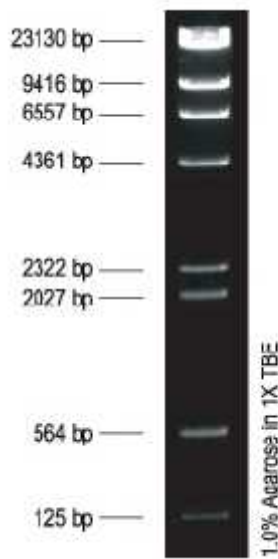
100 μ L DNA

30 μ L pufer R

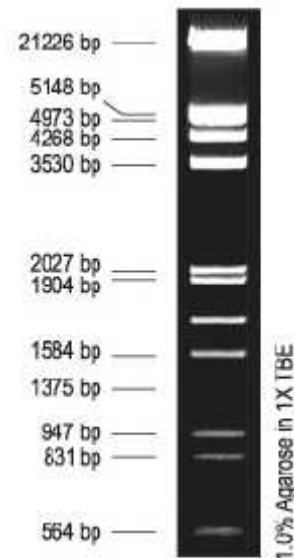
5 μ L HindIII

165 μ L ddH₂O.

Nakon prekono ne restriksijske digestije na gelu se vide fragmenti DNA to no odre enih veli ina prikazanih na slikama 6. i 7.



Slika 6. Duljina fragmenata DNA nakon restriksijske digestije enzimom HindIII.



Slika 7. Duljina fragmenata DNA Nakon restriksijske digestije enzimima HindIII/EcoRI.

Za marker HindIII/EcoRI priredi se sljedeća smjesa za restriksijsku digestiju:

100 μ L DNA

30 μ L pufer R

3 μ L HindIII

3 μ L EcoRI

164 μ L ddH₂O.

Nakon prekono ne restriksijske digestije na gelu se vide fragmenti DNA to no odre enih veli ina prikazanih na slici .

2.2.6. Taloženje DNA etanolom

U uzorak se doda 3.0 M natrijev acetat tako da kona na množinska koncentracija u otopini bude 0.3 mol (1/10 volumena). Otopini se doda dva volumena etanola (96%, hladan), potom se otopina ostavlja na ledu 15-30 min. Nakon stajanja otopina se centrifugira na + 4°C, 15 000 rpm, 15 min. Supernatant se ukloni, dodaje se 750 µL 70%-tnog etanola i ponovo centrifugira 4 min na + 4°C na 15 000 rpm. Supernatant se ukloni, a talog ostavi da se posuši na zraku.

2.2.7. Obrada krajeva linearne DNA Klenow-im enzimom

Ponekad je za kloniranje potrebno izravnati krajeve fragmenata DNA. U tom slu aju prilazi se obradi krajeva linearne DNA Klenow-im enzimom.

Pripremi se reakcijska smjesa prema podacima u tablici 5.

Tablica 5. Reakcijska smjesa za obradu krajeva Klenow-im enzimom

DNA obra ena restrikcijskim enzimom	10-15 µL
10X reakcijski pufer za Klenow enzim	2 µL
dNTP Mix, 2mM	0.5 µL
Klenow enzim	0.1-0.5 µL
ddH₂O	do 20 µL

Smjesa se inkubira na 37°C 10 min, potom se reakcija zaustavi zagrijavanjem smjese na 75°C 10 min.

2.2.8. Lan ana reakcija polimerazom (PCR)

Lan ana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* postupak kojim se umnožava željeni slijed DNA. Pri tome se koriste DNA polimeraza Pfu (termostabilna), za etnice za željeni slijed i kalup DNA.

2. Materijal i metode

PCR reakcije se provode u epruветama od 250 μL u PCR-ure aju "Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 2400". Reakcije su provodene u volumenu od 50 μL , a reakcijske smjese pripremljene su na sljedeći način:

kalup DNA	1 μL
dNTP mix (2 mM)	3 μL
za etnica I (0,1 μM)	1 μL
za etnica II (0,1 μM)	1 μL
Pfu pufer	5 μL
Pfu polimeraza	1 μL
ddH ₂ O	36 μL

Temperature ciklusa:

Prvi korak postupka je denaturacija kalupa na 95°C 4 min, nakon čega slijede tri koraka koja se ponavljaju u 30 ciklusa:

Denaturacija kalupa DNA	95°C	30 s
Vezanje za etnica (engl. "annealing")	65°C	30 s
Reakcija produljenja lanca (engl. "extension")	72°C	2 min

Nakon završenog tridesetog ciklusa reakcijska smjesa se inkubira na 72°C 5 min (reakcija produljenja lanca), nakon čega se ohladi na + 4 °C.

2.2.9. Ligacija plazmidne DNA

Kako bi se spojili fragmenti DNA za kloniranje, provodi se reakcija ligacije. Reakcija se provodi u PCR-ure aju, 8 sati na 22°C i 8 sati na 16°C.

Reakcijska smjesa pripremljena je na sljedeći način:

T4 DNA Ligaza	0.5 μL
Pufer za T4 DNA Ligazu	1.1 μL
DNA insert	6.4 μL

DNA vektor

3.0 μL

2.2.10. Detekcija rekombinacije i izra unavanje u estalosti rekombinacije

A. tumefaciens transformirane plazmidom pC SpecAmp^r-HB nanošene su u razrije enju od 10^{-7} na kanamicin/ampicilin podlogu, te u razrije enju 10^{-4} na spektinomicinsku podlogu. Razrije enja su prire ena na na in da se iz 1 mL suspenzije transformanata otpipetira 100 μL suspenzije i nadopuni sa ddH₂O do 1 mL, i tako sve do potrebnog razrije enja. U estalost rekombinacije izra unata je metodom medijana (Lea & Culson, 1949) za sve plo e, i to na na in da je u estalost rekombinacije= M/N , gdje je M broj rekombiniranih bakterijskih kolonija na spektinomicinskim plo ama-Spec^r, dok je N broj kolonija nerekombiniranih kolonija bakterija na kanamicin/ampicilin plo ama-Amp^r (prema Bi i Liu, 1996.).

2.2.11. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Za razdvajanje fragmenata DNA dobivenih restrikcijskom digestijom koristi se agarozni gel (0.7-1.5%) pripremljen dodavanjem agaroze u otopinu TAE-puferu. Otopina se zagrijava sve dok agarozna nije u potpunosti otopljena. Nakon što se otopina ohladi na približno 50°C, u otopinu se doda 3 μL etidijevog bromida koncentracije 10 mg/mL. Tako pripremljena otopina izlije se u nosač za gel s češljem i pričekava se da se gel stvrdne. Potom se gel stavi u kadicu za elektroforezu i kadica nadopuni puferom do malo iznad površine gela. Uzorci se prije nanošenja u jažice pomiješaju sa 3 μL boje Orange G. Elektroforeza se provodi na 60-80 V dok boja ne dođe do donjeg ruba gela.

Gel se potom analizira pomoću UV-transiluminatora.

2.2.12. Izdvajanje fragmenata DNA iz agaroznog gela

2. Materijal i metode

Nakon razdvajanja molekula DNA elektroforezom, dijelovi DNA odgovaraju e veli ine izrezani su pod UV svjetlom pomo u skalpela iz gela agaroze i preneseni u Eppendorf epruvete. Za pro iš avanje DNA za kloniranje upotrijebljen je komplet kemikalija QIAquick Gel Extraction Kit, u skladu s uputama proizvo a a. Metoda se zasniva na vezanju molekula DNA sa velikim afinitetom na membranu kolone, dok se ne isto e ispiru. Zatim se DNA eluira u slabom ionskom puferu. Ovako dobivena DNA je visoke isto e.

2.2.13. Priprema i odre ivanje kompetentnosti elektrokompetentnih bakterijskih stanica

U dva puta po 600 mL bakterijske podloge bez antibiotika inokulira se 5 mL prekonone kulture i inkubira uz trešnju u tresilici na 37°C do postizanja opti ke gusto e $OD_{600}=0.7-1.0$. Potom se stanice ohlade na ledu, kao i sav pribor s kojim e do i u kontakt tijekom daljnjeg postupka. Svi daljnji koraci izvode se na ledu, sav pribor drži se na ledu. Stanice se izliju u kivete u alikvotima od 150 mL, centrifugiraju [5 000 rpm, 10 min, + 4°C (Sorvall RC5B, *Du Pont Instruments*, SAD)], supernatant se izlije i stanice resuspendiraju u 150 mL hladne diH₂O (drži se na ledu tijekom cijelog procesa). Postupak centrifugiranja se ponovi. Ponovo se odlije supernatant, stanice se resuspendiraju u 100 mL diH₂O, te ponovo centrifugiraju. Supernatant se ponovo odlije i stanice resuspendiraju u 50 mL diH₂O. Ponovi se postupak centrifugiranja. Supernatant se odlije, talog se prebaci u manje kivete i resuspendira u 30 mL diH₂O. Suspenzija se centrifugira [5000 rpm, 10 min, + 4°C (centrifuga *Sigma* 3K30, Njema ka)]. Nakon odlijevanja supernatanta, talog se prebaci u Eppendorf epruvete i ponovi se postupak centrifugiranja. Nakon centrifugiranja otpipetira se supernatant i stanice se resuspendiraju u 1.5 mL 7% DMSO (dimetil-sulfoksid).

Ovako pripremljena suspenzija alikvotira se u sterilne hladne Eppendorf epruvete koje se zamrznu u teku em dušiku i pohrane na -80°C.

Kompetentnost stanica mjeri se elektroporacijom, transformacijom sa 1 µL DNA poznate koncentracije (komercijalni vektor). Nakon transformacije pripreme se razrije enja na krutim podlogama. Kompetentnost se izra unava kao broj kolonija izraslih na podlozi pomnožen s redom razrje enja i podijeljen sa koncentracijom DNA koju smo koristili za transformaciju.

2. Materijal i metode

Mjera kompetentnosti izražava se u cfu/ μ g DNA (cfu=colony forming unit), a da bi stanice bile elektrokompotentne kompetentnost mora biti minimalno 10^6 cfu/ μ g DNA.

2.2.14. Mjerenje optičke gustoće bakterijske suspenzije

Optička gustoća bakterijske suspenzije mjeri se na UV/Vis spektrofotometru (*Unicam*, *SAD*) pri valnoj duljini 600 nm, uz upotrebu iste bakterijske tekućine podoge kao slijepe probe.

2.2.15. Mjerenje koncentracije DNA u otopini

Iz uzorka kojem se želi saznati koncentracija otpipetira se 1 μ L uzorka i razrijedi u 999 μ L diH₂O. Spektrofotometar se kalibrira pomoću 1 mL diH₂O. Mjeri se apsorbancija uzorka pri 260 nm, nakon čega se koncentracija izražava prema sljedećoj formuli:

$$c = A_{260} * \text{faktor apsorbancije} * \text{faktor razrjeđenja}$$

Faktori apsorbancije:

ssDNA – 37 μ g/mL

dsDNA – 50 μ g/mL

ssRNA – 40 μ g/mL.

Koncentracija DNA izražava se u μ g/ μ L.

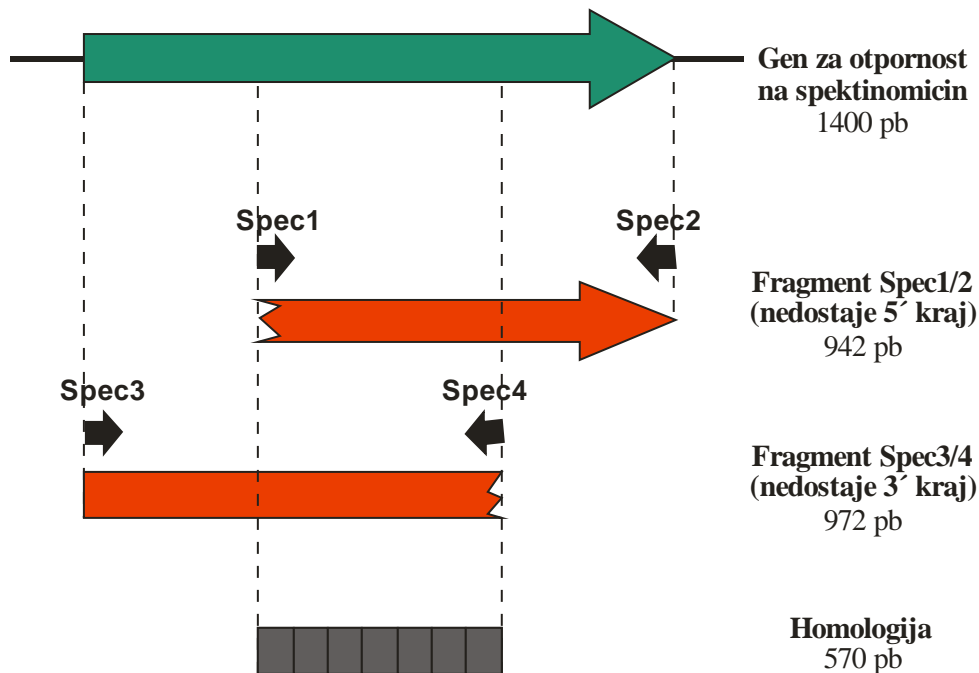
2. Materijal i metode

3. REZULTATI

3. Rezultati

Za potrebe istraživanja intramolekularne rekombinacije bilo je potrebno razviti sustav koji omogući pranje u stalosti rekombinacije. Za to smo izabrali gen za otpornost na antibiotik spektinomycin iz plazmida pPZP200 koji je dug 1 400 pb. Pomoću dva para za etnice konstruirana su dva skraćena oblika gena za otpornost na spektinomycin koji se međusobno preklapaju u slijedu od 570 pb (Slika 8.). Kao razmaknica konstruiran je gen za otpornost na ampicilin i ugrađen između prethodno opisanih fragmenata gena za otpornost na spektinomycin.

3.1. Umnožavanje fragmenata gena za otpornost na spektinomycin s deletiranim 5' krajem i 3' krajem pomoću lanane reakcije polimerazom (PCR)



Slika 8. Za etnice za konstrukciju fragmenata gena za spektinomycin sa deletiranim 5' i 3' krajevima. Zelenom bojom označen je gen za otpornost na spektinomycin. Crnom bojom označene su korištene za etnice, crvenom bojom označeni su fragmenti gena za otpornost na spektinomycin, Spec1/2 (942 pb) i Spec3/4 (972 pb). Sivom bojom označeno je područje homologije.

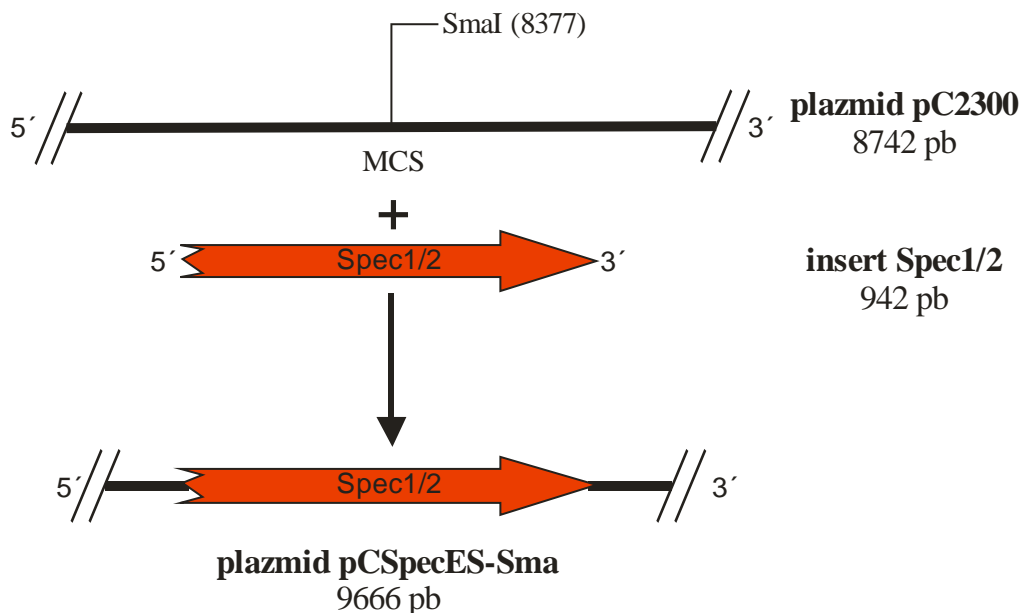
Pomoću za etnica Spec1 i Spec2 PCR-om smo umnožili fragment gena za spektinomycin iz plazmida pPZP200 kojem nedostaje 5' kraj (Spec1/2, 942 pb), a za etnicama Spec3 i Spec4 fragment kojem nedostaje 3' kraj (Spec3/4, 972 pb). Dobiveni

3. Rezultati

fragmenti se preklapaju u području od 570 pb (Slika 8.) i mogu poslužiti kao mjesta homologije. Oba fragmenta smo ugradili u plazmid pC2300.

3.2. Plazmidi pCSpecES-Sma i pCSpecHS-Sma

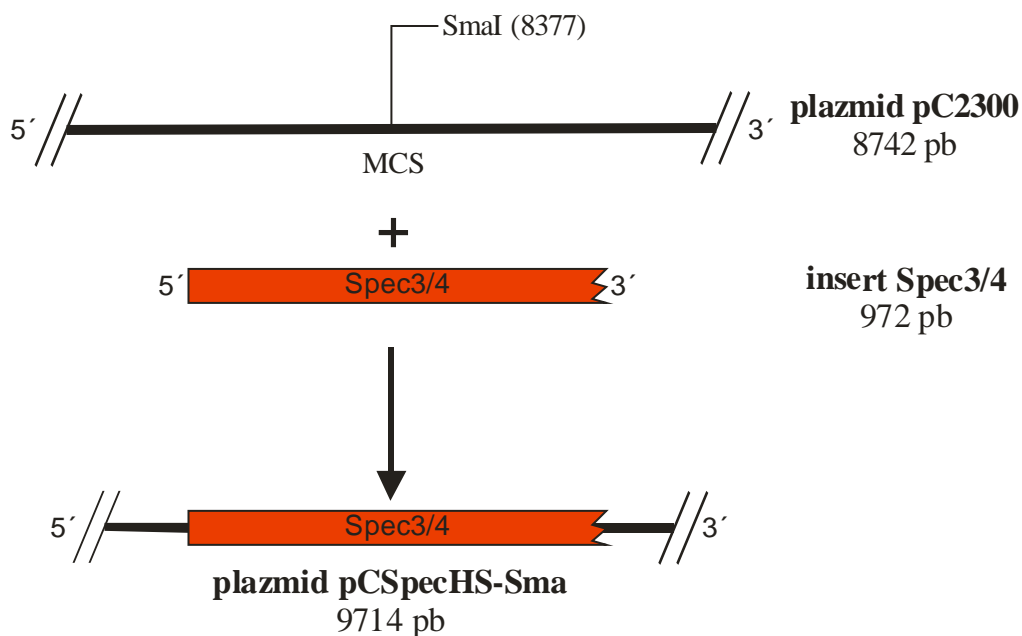
Fragment Spec1/2 ugradili smo u restriksijsko mjesto SmaI plazmida pC2300 (pCambia) (Slika 9.) i plazmid s insertom probrali bijelo-plavom selekcijom na selektivnim podlogama s kanamicinom i X-galom.



Slika 9. Shema konstrukcije plazmida pCSpecES-Sma. Ugradnja fragmenta Spec 1/2 u restriksijsko mjesto SmaI plazmida pC2300.

Na isti način smo i fragment Spec3/4 ugradili u plazmid pC2300 u restriksijsko mjesto SmaI (Slika 10.) i dobili plazmid pCSpecHS-Sma.

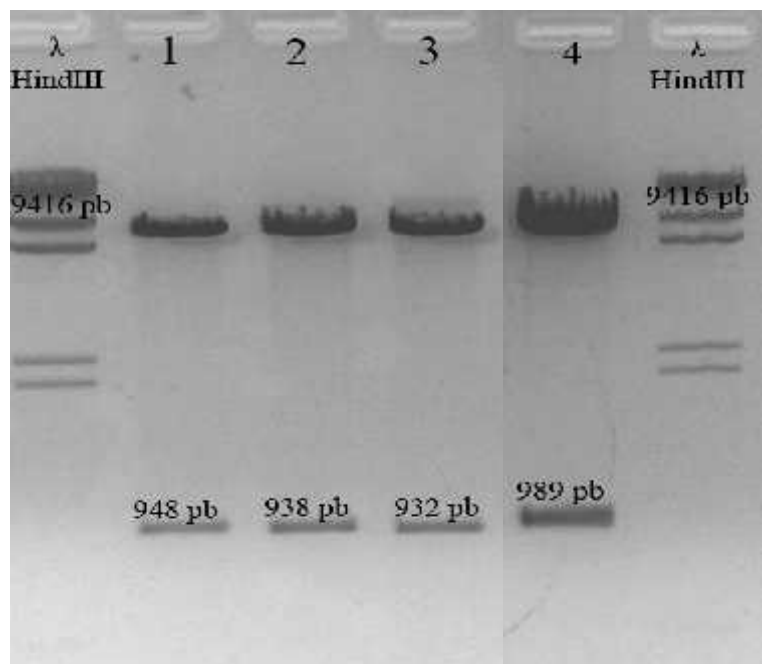
3. Rezultati



Slika 10. Shema konstrukcije plazmida pCSpecHS-Sma. Ugradnja fragmenta gena Spec3/4 u restriksijsko mjesto SmaI plazmida pC2300.

To nost ugradnje odgovaraju ih fragmenata u plazmidu izvršili smo restriksijskom digestijom i gel elektroforezom nastalih produkata. Plazmid pCSpecES-Sma pocijepan je u dvostrukoj digestiji enzimima EcoRI/PstI (fragment od 948 pb, jažica 1), EcoRI/SalI (fragment od 938 pb, jažica 2), te EcoRI/XbaI (fragment od 932 pb, jažica 3). Plazmid pCSpecHS-Sma pocijepan je u dvostrukoj digestiji enzimima Acc65I/SalI (fragment od 989 pb, jažica 4) (Slika 11.). Navedeni restriksijski enzimi imaju mjesta prepoznavanja lijevo i desno od ugra enog fragmenta Spec1/2, odnosno Spec3/4 u plazmidima pC2300.

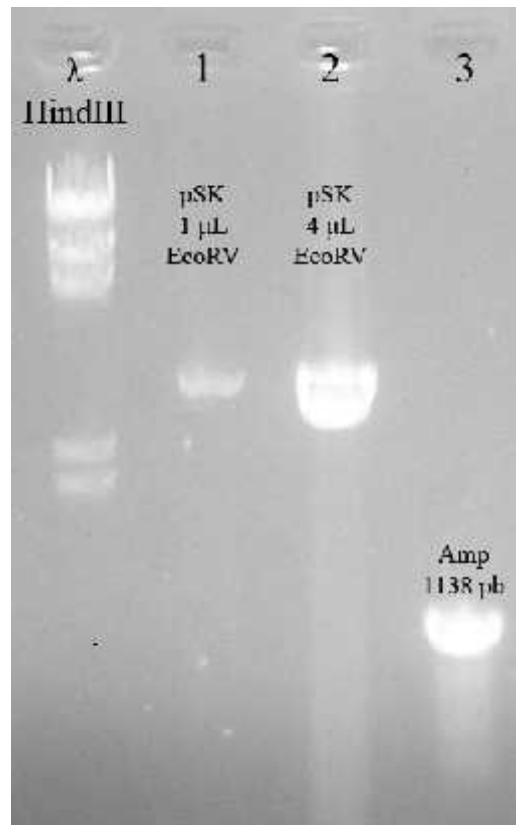
3. Rezultati



Slika 11. Rezultati elektroforeze digestije pCSpecES-Sma i pCSpecHS-Sma. Marker Hind III, prve tri jažice pCSpecES-Sma, zadnja pCSpecHS-Sma. 1-digestija restrikcijским enzimima EcoRI/PstI, 2-digestija restrikcijским enzimima EcoRI/SalI, 3-digestija restrikcijским enzimima EcoRI/XbaI, 4-digestija restrikcijским enzimima Acc65I/SalI.

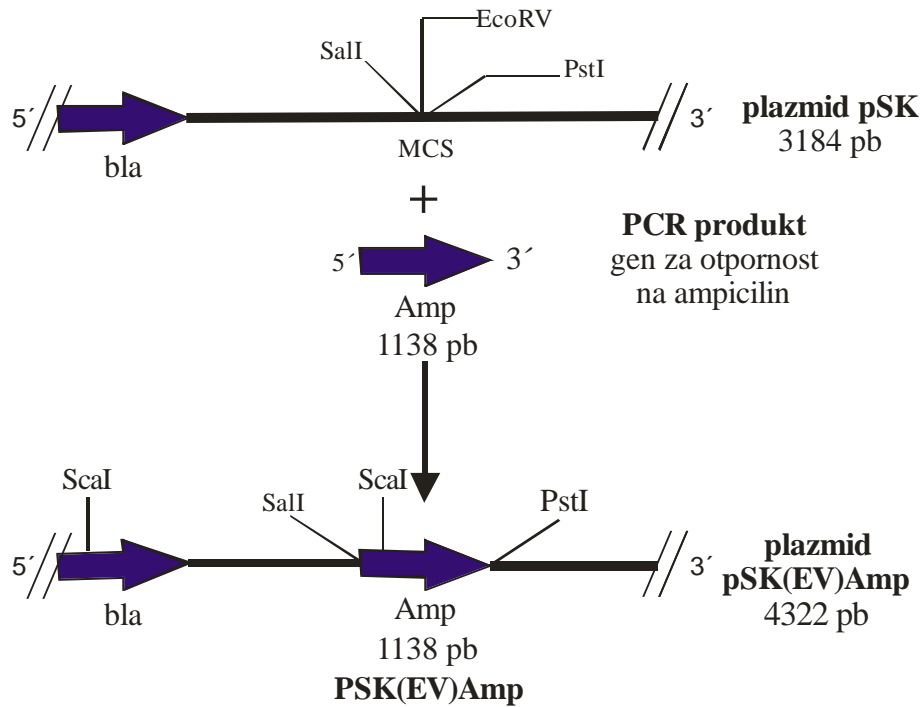
3.3. Plazmid pSK(EV)Amp

Nakon završene konstrukcije plazmida s fragmentima gena za otpornost na spektinomycin pristupili smo amplifikaciji gena za otpornost na ampicilin. Gen za otpornost na ampicilin umnožili smo u PCR uređaju s za etnicama ampI i ampII gdje je plazmid pSK služio kao kalup. Tako umnoženi gen za otpornost na ampicilin ugradili smo u restrikcijsko mjesto EcoRV istog pSK plazmida (Slika 12. i Slika 13.).



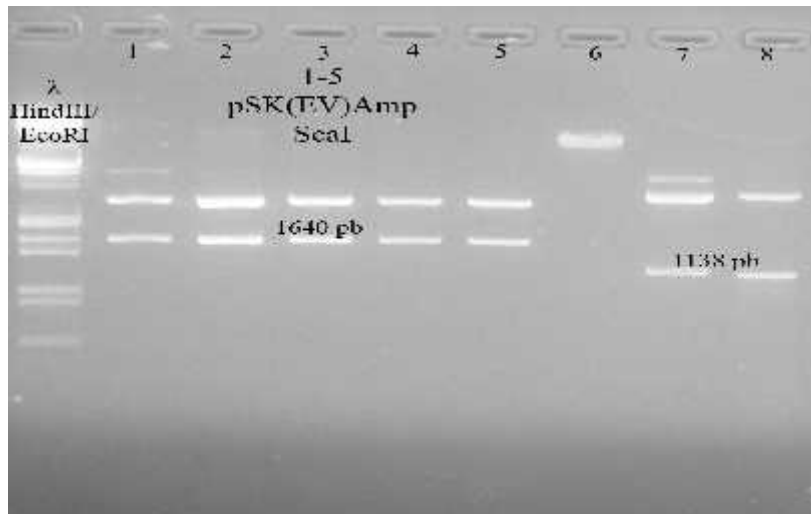
Slika 12. PCR gena za otpornost na ampicilin iz plazmida pSK. U jažicama 1 i 2 provjerili smo koncentraciju plazmida pSK i kontrolu digestije enzimom EcoRV. U jažici broj 3 nalazi se PCR produkt gena za otpornost na ampicilin, duljine 1 138 pb.

3. Rezultati



Slika 13. Shema konstrukcije plazmida pSK(EV)Amp. PCR produkt gena za otpornost na ampicilin ugrađen u restrikcijsko mjesto EcoRV plazmida pSK. Dobiveni plazmid pSK(EV)Amp ima dva gena za otpornost na ampicilin.

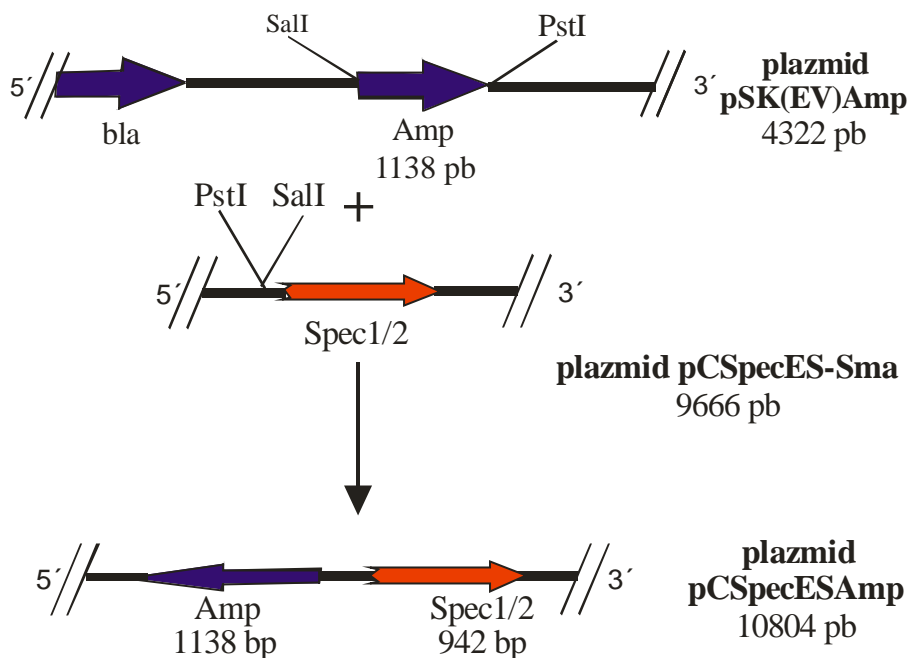
Provjeru ugradnje inserta izvršili smo na dva načina: cijepanjem restrikcijskim enzimom ScaI (jažice 1-5) i dvostrukom digestijom restrikcijskim enzimima PstI i SalI (jažica 7). U jažicu 8 dodani su PCR-prodakt i sam plazmid pSK za usporedbu veličina (Slika 14.).



Slika 14. Restrikcijska digestija kolonija pSK(EV)Amp ScaI. U jažicama označenim 1-5 nalazi se plazmid izoliran redom iz kolonija 3, 4, 5, 7, 9, porezan enzimom ScaI. U jažici broj 7 pSK(EV)Amp porezan enzimima PstI/SalI kao kontrola za ugrađeni ampicilin. U jažici 8 nalazi se plazmid pSK, te PCR produkt gena za otpornost na ampicilin, kao mjera duljine fragmenata.

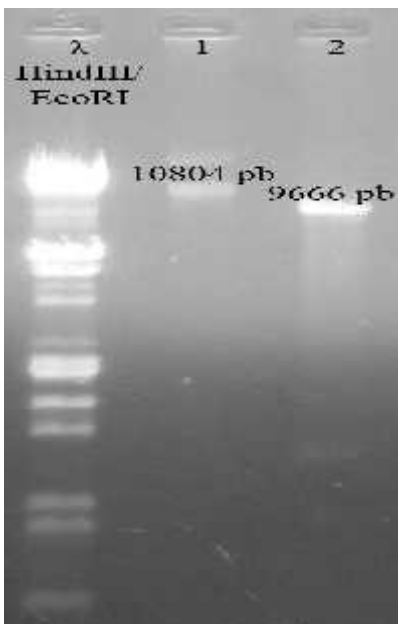
3.4. Plazmid pCSpecESamp

Kako bi konstruirali plazmid koji ima fragmente gena za otpornost na spektinomycin razmaknute genom za otpornost na ampicilin plazmide pCSpecES-Sma i pSK(EV)Amp porezali smo dvostrukom restriksijskom digestijom s restriksijskim enzimima PstI/SalI. Nakon elektroforeze, iz gela smo izolirali fragment s genom za otpornost na ampicilin veli ine 1 138 pb, kao i linearizirani vektor pCSpecES-Sma, te ligirali (Slika 15.). O ekivani plazmid pCSpecAmp je veli ine 10 804 pb.



Slika 15. Shema konstrukcije plazmida pCSpecESamp. Gen za otpornost na ampicilin izrezali smo restriksijskim enzimima PstI/SalI iz plazmida pSK(EV)Amp, te ugradili u ista restriksijska mjesta plazmida pCSpecES-Sma.

3. Rezultati



Slika 16. Provjera ugradnje gena za otpornost na ampicilin u plazmid pCSpecES-Sma. U jažici označenoj brojem 1 nalazi se ligacijske smjesa pCSpecESAmp (10 804 pb). U jažici označenoj brojem 2 nalazi se plazmid pCSpecES-Sma porezan enzimima PstI/SalI koji služi kao kontrola prije ugradnje inserta.

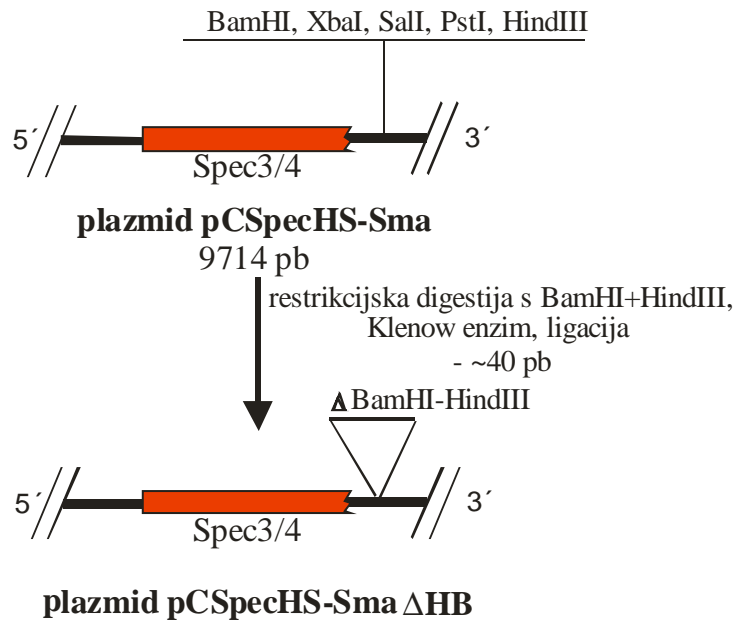
Uspješnost ugradnje gena za otpornost na ampicilin potvrdili smo digestijom restrikcijskim enzimom HindIII koji ima mjesta prepoznavanja lijevo i desno od ugraenog gena za otpornost na ampicilin (Slika 17.). Orijentaciju ugraenog gena utvrdili smo digestijama restrikcijskim enzimima Acc65I/SalI, PstI/SalI, SmaI/XbaI, EcoRI, te EcoRI/BamHI (rezultati nisu prikazani).



Slika 17. Restrikcijska digestija pCSpecESAmp sa HindIII. Jažice 1-12: kolonije pCSpecESAmp porezane enzimom HindIII. O ekivana veli ina fragmenta ~1140 pb. Jažica 13: plazmid pCSpecES-Sma, prikazuje veli inu vektora, teko er porezan enzimom HindIII. Jažica 14: pSK porezan sa HindIII, služi kao orijentacija veli ine.

3.5. Plazmid pC SpecAmpi- HB

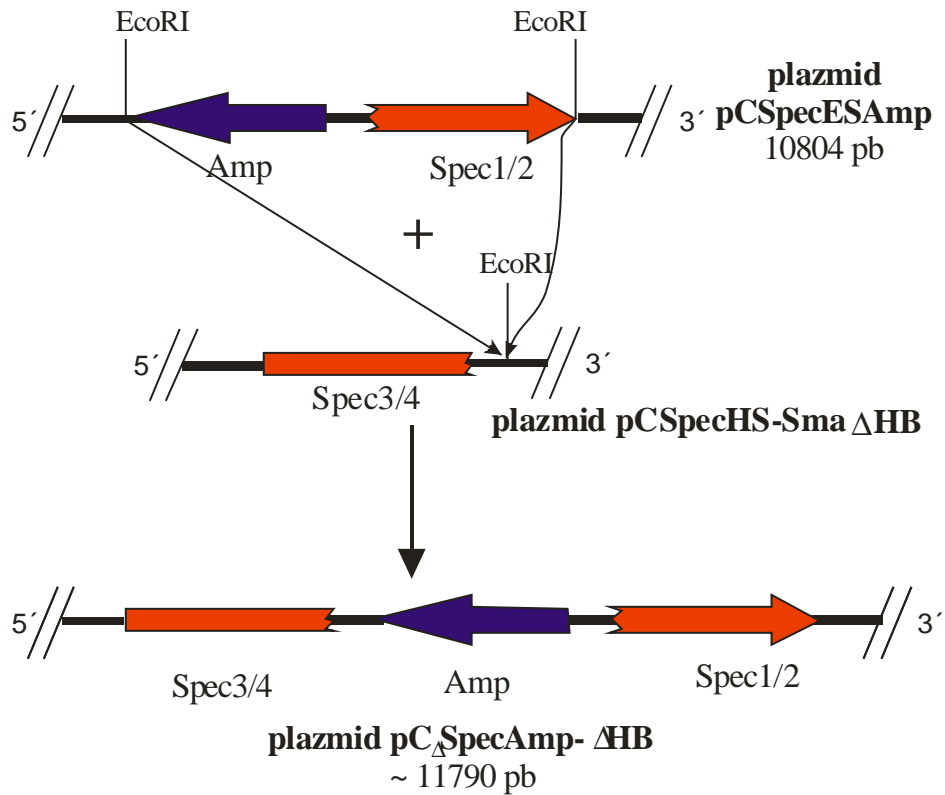
Plazmid pC SpecAmpi- HB konstruiran je u dva koraka. U prvom koraku smo plazmidu pCSpecHS-Sma uklonili 30 pb između restrikcijskih mjesta BamHI i HindIII (9352-9382 bp). Potom smo ljepljive krajeve dobivene nakon dvostruke digestije popunili pomoću Klenow-og enzima (Slika 18.). Tako je nastao plazmid pCSpecHS-Sma HB.



Slika 18. Izvođenje delecije restrikcijskih mjesta između enzima BamHI i HindIII plazmida pCSpecHS-Sma.

Zatim smo u plazmid pCSpecHS-Sma HB ugradili fragment Spec1/2+Amp izrezan iz plazmida pCSpecESamp pomoću restrikcijskog enzima EcoRI (Slika 19.)

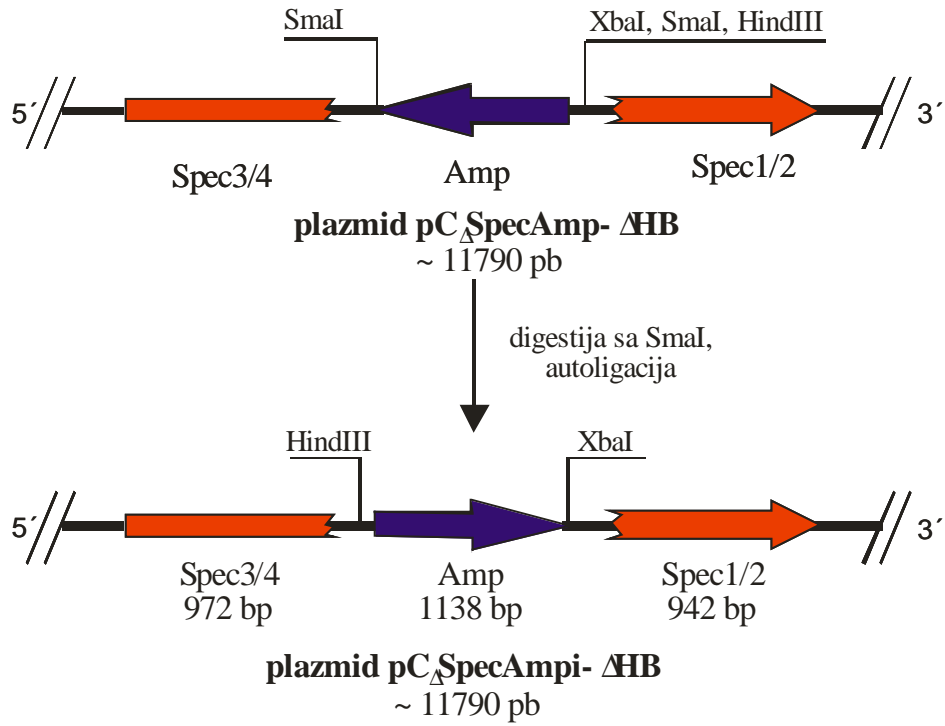
3. Rezultati



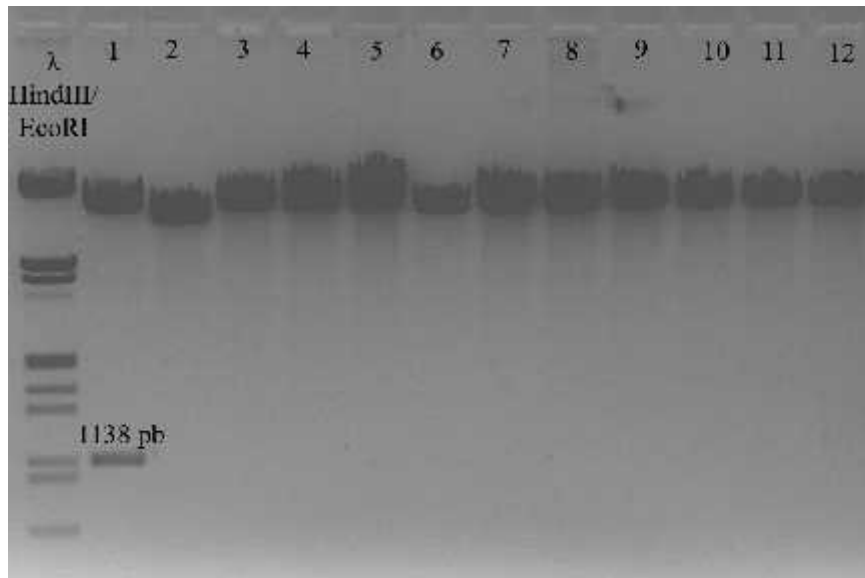
Slika 19. Shema konstrukcije plazmida pC SpecAmp- HB. Fragment Spec 1/2+Amp izrezan je iz plazmida pCSpecESamp enzimom EcoRI, te ugra en u restriksijsko mjesto EcoRI plazmida pCSpecHS-Sma HB.

Ovako ugra en gen za otpornost na ampicilin u plazmidu pC SpecAmp- HB nije bio u ispravnoj orijentaciji u odnosu na promotor. Zato smo fragment Amp enzimom SmaI izrezali i ponovo ga ligirali kako bismo dobili invertirani gen za otpornost na ampicilin u smjeru promotora plazmida. Nakon ligacije, provjeru nove orijentacije izvršili smo digestijom restriksijskim enzimima HindIII/XbaI (fragment 1 138 pb). Kao što je vidljivo iz mape na slici 20., mjesto restriksijskog enzima HindIII inverzijom gena za otpornost na ampicilin prelazi na suprotnu stranu od mjesta restriksijskog enzima XbaI, što nam je omogućilo provjeru orijentacije gena za otpornost na ampicilin. Prvotna orijentacija gena za otpornost na ampicilin digestijom tim restriksijskim enzimima ne daje vidljivi fragment (Slika 21.). Iz slike gela vidljivo je da kolonija broj 1 jedina posjeduje fragment Amp u željenoj orijentaciji.

3. Rezultati



Slika 20. Nastanak plazmida pC SpecAmpi- HB. Na slici je prikazana inverzija gena za otpornost na ampicilin pomoću enzima SmaI.



Slika 21. Kontrolni gel digestije kandidata za plazmid pC SpecAmpi- HB. Kolonije 1-12 nakon restriksijske digestije enzimima HindIII/XbaI. Kolonija broj 1 posjeduje fragment u željenoj orijentaciji.

3.6. Provjera ispravnosti plazmida pC SpecAmpi- HB

Nakon izvršene konstrukcije plazmida pC SpecAmpi- HB, ispravnost plazmida smo provjerili transformacijom bakterije *E. coli*, te nasa ivanjem na kanamicinske (kontrola) i ampicilinske podloge. Na obje podloge smo dobili konfluentan rast (rezultati nisu prikazani). Kako je kanamicinska otpornost kodirana po etnim plazmidom pC2300, a gen za otpornost na ampicilin je bio cjelovit, to zna i da je samo ispravan konstrukt mogao dati podjednak broj transformanata na obje selektivne podloge. Zatim smo željeli istražiti da li ovim plazmidom možemo detektirati intramolekularnu rekombinaciju.

3.7. Istraživanje u estalosti intramolekularne rekombinacije u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*.

S plazmidom pC SpecAmpi- HB smo transformirali dva soja bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, UIA143 (*recA*⁻) i GV3101 (*recA*⁺). Nakon transformacije, napravili smo decimalna razrje enja i smjesu nasa ivali na selektivne podloge. Na kanamicinske podloge koje su služile kao kontrola nanosili smo decimalna razrje enja od 10⁻⁷. Na podloge koje sadrže spektinomicin i koje su služile za selekciju rekombinantnih plazmida, nanosili smo decimalna razrje enja od 10⁻³. Za svaki plazmid i svaki soj koristili smo po pet plo a (broj kolonija soja *recA*⁻ s plazmidom pC SpecAmpi- HB dobiven je na pet kanamicinskih plo a i pet spektinomicinskih plo a, te broj kolonija soja *recA*⁺ s plazmidom pC SpecAmpi- HB dobiven je na pet kanamicinskih plo a i pet spektinomicinskih plo a). Rezultati su prikazani u tablici 6.

3. Rezultati

Tablica 6. Rezultati pokusa istraživanja rekombinacije u *A. tumefaciens*

pC SpecAmpi- HB UIA143 (<i>RecA</i> ⁻)			
	10^{-4} (Spec)	10^{-7} (Kan)	10^{-5} (Spec/Kan)
1.	17	535	3
2.	1	122	1
3.	8	418	2
4.	4	371	1
5.	8	430	2
X			1.8
ST.D.			0.83666
pC SpecAmpi- HB GV3101 (wt)			
	10^{-4} (Spec)	10^{-7} (Kan)	10^{-5} (Spec/Kan)
1.	51	731	7
2.	44	933	5
3.	26	660	4
4.	10	145	7
5.	5	266	2
X			5
ST.D.			2.1213203

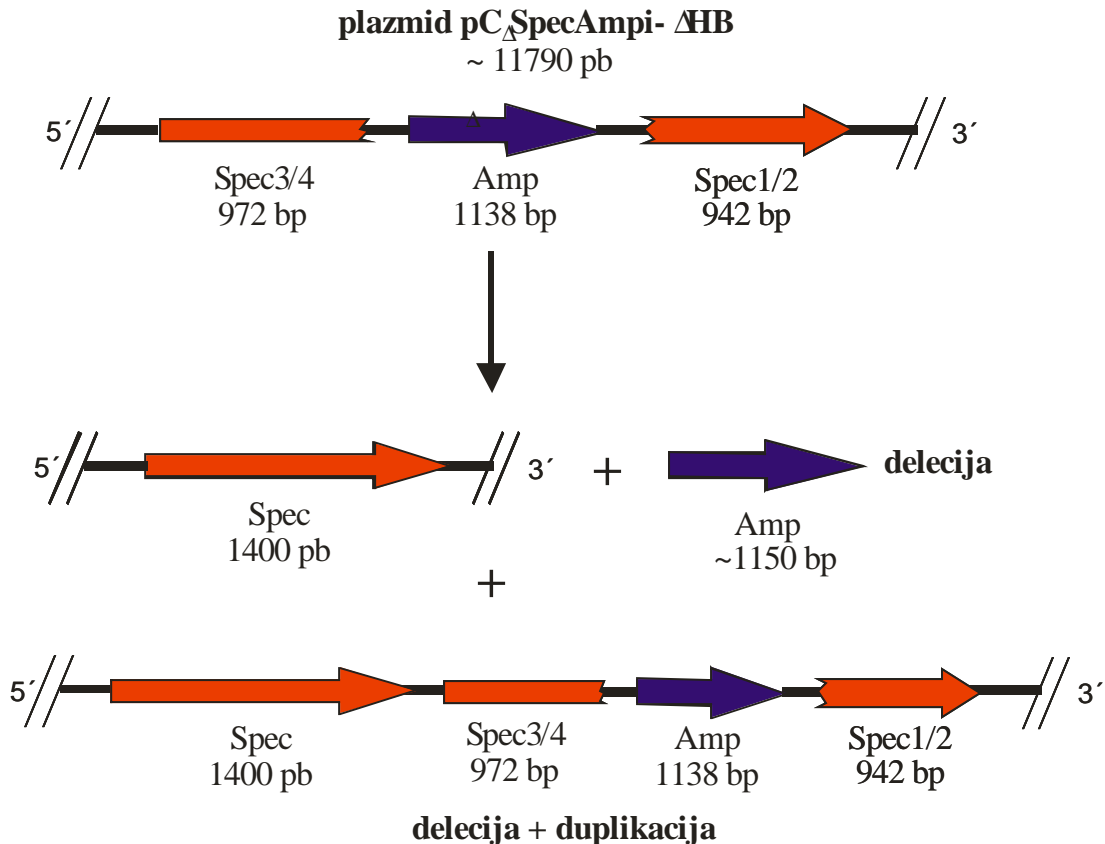
U estalost intramolekularne rekombinacije plazmida pC SpecAmpi- HB u *recA*⁻ soju UIA143 iznosi $1.8 \cdot 10^{-5}$, a u soju divljeg tipa GV3101 iznosi $5 \cdot 10^{-5}$. Dobiveni podaci o u estalosti rekombinacije direktno ponovljenih sljedova od 570 pb slažu se u vrlo dobroj mjeri sa podacima koji se mogu na i u literaturi o rekombinaciji bakterije *E. coli* (Bi i Liu, 1996).

Usporedbom intramolekularne rekombinacije izme u spektinomicinskih fragmenata plazmida pC SpecAmpi- HB u soju divljeg tipa GV3101 u odnosu na *recA*⁻ soj UIA143 dobili smo oko tri puta ve u u estalost rekombinacije (Tablica 6.). Ovaj rezultat upu uje na zaklju ak da protein RecA nije potreban za nastanak bakterija otpornih na spektinomicin, što je u skladu s podacima iz literature (Lovett i sur., 1993).

3. Rezultati

3.8. Utvrđivanje mehanizma rekombinacije u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*

Iz literature je poznato da je otpornost na spektinomycin mogla nastati jedino delecijom slijeda koji razdvaja dva nepotpuna fragmenta Spec1/2 i Spec3/4. To znači da bi svi Spec^r transformanti trebali postati osjetljivi na ampicilin. Međutim, uz deleciju često dolazi i do duplikacije, odnosno nastanka dimera i rjeđe trimera (Slika 22.) (Lovett i sur., 1993; Bi i Liu, 1996).



Slika 22. Očekivani produkti rekombinacije nastali delecijom i delecijom uz duplikaciju.

Da bi utvrdili mehanizam nastanka otpornosti na spektinomycin, odlučili smo provjeriti da li možemo selektirati bakterije *A. tumefaciens* otporne na ampicilin i spektinomycin. *A. tumefaciens* divljeg tipa i *recA*⁻ transformirali smo plazmidom pC SpecAmp^r-ΔHB i selektirali kanamicin otporne transformante na 28°C. Potom smo ih uzgojili u tekućoj podlozi s ampicilinom u tresilici na 28°C preko noći, te smo 100 μL nerazrijeđene kulture nasadili na krute Amp/Spec podloge. Ukoliko nakon tri dana na podlogama ne narastu kolonije, to znači da je došlo do rekombinacije i delecije gena za ampicilin. Ukoliko primijetimo rast na podlogama koje sadrže oba antibiotika, takvi rezultati bi mogli sugerirati da je otpornost na spektinomycin nastala delecijom uz duplikaciju.

3. Rezultati

Rezultati su bili sljede i:

<i>recA</i> ⁻ soj	Amp/Spec livada
Divlji tip	Amp/Spec livada

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da bakterije posjeduju obje rezistencije, što ukazuje da je vjerojatno došlo do RecA-neovisne delecije i duplikacije, što je u skladu s literaturom (Lovett i sur., 1993; Bi i Liu, 1996).

3.9. Istraživanje u estalosti intramolekularne rekombinacije u bakteriji *Escherichia coli*.

U estalost intramolekularne rekombinacije željeli smo ispitati i u bakteriji *E. coli*, te je usporediti s rezultatima dobivenim u bakteriji *A. tumefaciens*. Pokus smo izveli na sli an na in kao ranije: bakterije *E. coli* smo transformirali plazmidom pC SpecAmpi-

HB i transformante selektirali na kanamicinskoj podlozi. Idu i dan nekoliko kolonija smo nasadili u teku u podlogu s ampicilinom inkubirali u tresilici preko no i na 37°C. Nakon inkubacije napravili smo decimalna razrje enja do 10⁻⁶. Na ampicilinsku podlogu nasadili smo razrje enje 10⁻⁶, a na spektinomicinsku 10⁻³. Pokus smo napravili u triplikatu. Rezultati su prikazani u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati pokusa istraživanja rekombinacije u bakteriji *E. coli* divljeg tipa

Divlji tip (wt) AB1157			
	10 ⁻⁴ (Spec)	10 ⁻⁷ (Amp)	U estalost rekombinacije *10 ⁻³
1.	680	196	3.4
2.	603	160	3.7
3.	682	124	5.5
			4.2
ST.D.			1.13

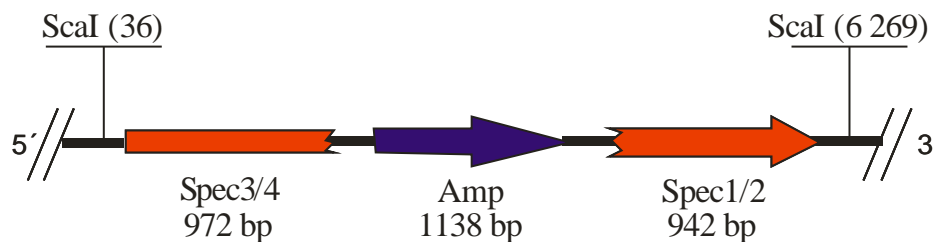
3. Rezultati

Iz ovih rezultata vidljivo je da u estalost rekombinacije plazmida pC SpecAmpi- HB u bakteriji *E. coli* iznosi $4.2 * 10^{-3}$. Takav rezultat je nešto ve i nego u bakteriji *A. tumefaciens*, ali još uvijek u o ekivanom rasponu u estalosti rekombinacije iz literature (Bi i Liu, 1996).

Kao i u slu aju *A. tumefaciens*, i bakterije *E. coli* smo nasadili na podloge koje sadrže ampicilin/spektinomycin antibiotike, a rezultat je bio istovjetan. Na podlogama smo dobili konfluentan rast.

3.10. Izolacija plazmida iz rekombinanata i njihova restrikcijska analiza

Nakon provedenih pokusa istraživanja u estalosti rekombinacije iz bakterija *A. tumefaciens* i *E. coli* željeli smo provjeriti da li je došlo do delecije uz nastanak dimera. U tu svrhu smo izolirali plazmid na na in da smo od svakog soja bakterija uzeli po dvije kolonije sa svake podloge (ampicilin, spektinomycin i ampicilin/spektinomycin), *recA⁻* i *recA⁺*, te proveli digestiju s enzimom ScaI. Kao kontrola služio je plazmid kojim su transformirani svi sojevi. Restrikcijska mjesta za ovaj enzim prikazana su na slici 23. iz koje je vidljivo da enzim ScaI cijepa izvan našeg konstrukta.



Slika 23. Restrikcijska mapa plazmida pC SpecAmpi- HB. Prikazan je linearizirani vektor, te restrikcijska mjesta enzima ScaI

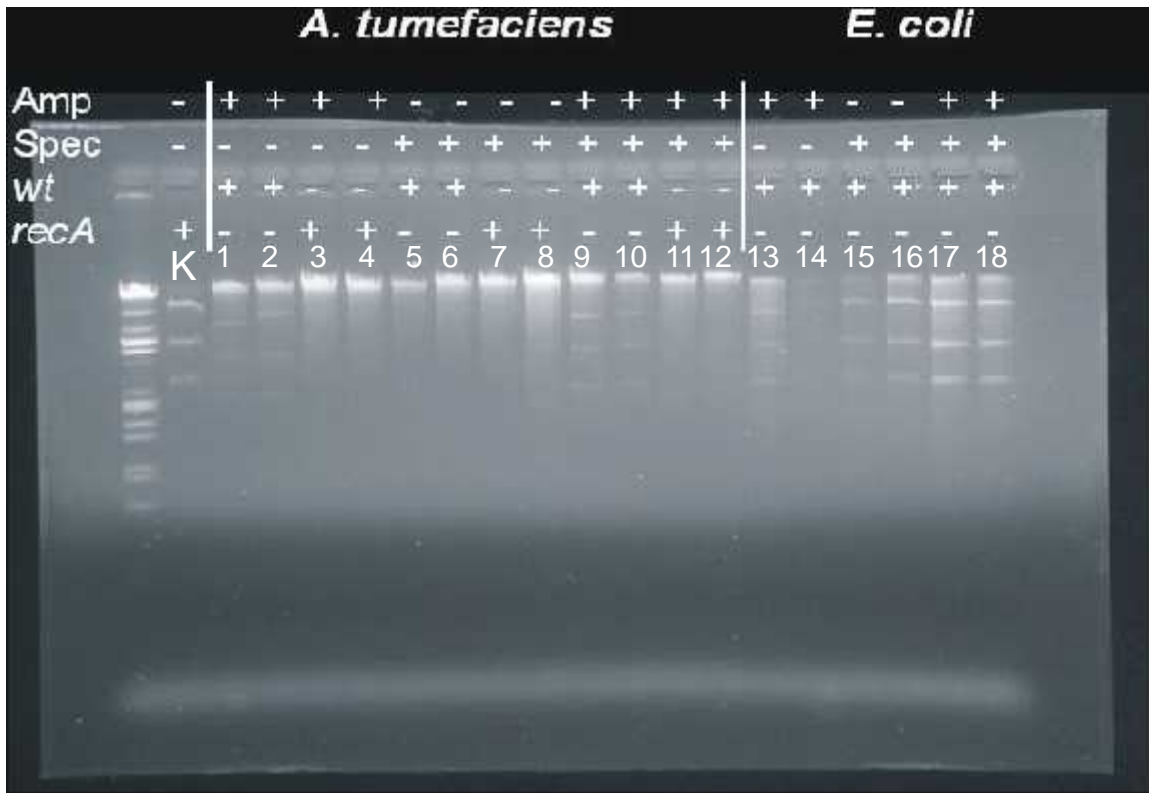
Digestijom restrikcijskim enzimom ScaI o ekivali smo dva fragmenta duljine 6 425 pb i 5 365 pb ukoliko nije došlo do rekombinacije, te 6 425 pb i 4 975 pb ukoliko je došlo do rekombinacije. Elektroforeza je izvršena nakon digestije od jednog sata, te nakon prekono ne digestije. Rezultati prikazani na slici 24. su od prekono ne digestije.

3. Rezultati

Kao prvo, primijetili smo tri fragmenta u kontrolnom uzorku, umjesto dva. To ukazuje da vjerojatno postoji još jedno neprepoznato mjesto cijepanja na plazmidu pC SpecAmp^r-HB.

Kao drugo, u svim izoliranim rekombinantima i transformantima primijetili smo jedan veći i neporezani fragment veličine ~21 kb. Taj veliki fragment može biti ili dimer ili dio kromosomske DNA. Nadalje, u divljem soju bakterije *A. tumefaciens* primijetili smo smanjenje veličine najviše dva donja fragmenta (jažice 1, 2, 9, 10). Ovaj trend smo uočili i u bakteriji *E. coli* (jažice 13-18). Pretpostavljamo da smanjenje fragmenata ukazuje na deleciju prilikom intramolekularne rekombinacije.

Nedostatak fragmenata smo uočili u *recA* mutantima bakterije *A. tumefaciens* (jažice 3, 4, 7, 8, 11 i 12), te divljem tipu (jažice 5 i 6). Razlog bi mogao biti problemi pri izolaciji plazmida iz *A. tumefaciens*, kao i veličina plazmida (~12 kb).



Slika 24. Elektroforeza plazmida pC SpecAmp^r-HB restrikcijom ScaI nakon prekono ne digestije. Prva jažica sadrži marker EcoRI/HindIII. U drugoj jažici nalazi se izvorni plazmid izoliran iz *E. coli* XL1-Blue (K).

4. Rasprava

U ovom radu htjeli smo ispitati efikasnost rekombinacije u bakteriji *A. tumefaciens* i usporediti je s onom u bakterije *E. coli*. U tu svrhu u istraživanju smo koristili plazmid pC SpecAmp^r-HB koji sadrži direktna ponavljanja u dužini od 570 pb koja su dio gena za otpornost na spektinomycin, me usobno razmaknuta genom za otpornost na ampicilin dužine 1 138 pb.

Transformacijom bakterija *E. coli* i nasa ivanjem na ampicilinske, kanamicinske i spektinomycinske podloge pokazali smo kako je plazmid pC SpecAmp^r-HB pravilno konstruiran, budu i da su bakterije recipijenti plazmida uspješno rasli na svim navedenim podlogama.

Prethodna istraživanja su pokazala da duljina homologije utje e na u estalost rekombinacije izme u direktnih ponavljanja, i to na na in da pove anjem homologije u estalost rekombinacije raste sve do duljine homologije od približno 500 pb, nakon ega daljnje pove anje duljine homolognih regija nema dodatni utjecaj na u estalost rekombinacije.(Lovett i sur., 1993; Bi i Liu, 1996). Tako su Bi i Liu (1996) pokazali da se u estalost rekombinacije u bakteriji *E. coli* za direktna ponavljanja kakva sadrži plazmid pC Specamp^r-HB i razmaknicu duljine 1 000 pb kre e u rasponu od 10^{-5} - 10^{-6} . Kako u estalost rekombinacije dobivena pokusom u bakteriji *A. tumefaciens* iznosi $1.8 * 10^{-5}$ u *recA*⁻ soju, odnosno $5 * 10^{-5}$ u divljem tipu, dobiveni rezultat se vrlo dobro slaže s literaturnim podacima. Nešto ve a u estalost rekombinacije u bakteriji *E. coli* koja iznosi $4.2 * 10^{-3}$ vjerojatno bi se mogla pripisati veli ini plazmida pC SpecAmp^r-HB, što doprinosi ve oj fleksibilnosti DNA molekule i smanjuje steri ke smetnje, a samim tim olakšava interakcije izme u dijelova molekule. Navedeno navodi na zaklju ak da su isti mehanizmi odgovorni za rekombinaciju u obje vrste bakterija.

Nadalje, u estalost rekombinacije u *A. tumefaciens* dobivena pokusom (Tablica 3.) otkriva kako nema zna ajnije razlike u u estalosti rekombinacije izme u soja *recA*⁻ i bakterija divljeg tipa. Soj *recA*⁻ pokazuje približno svega tri puta manju u estalost procesa rekombinacije, iz ega se može zaklju iti da rekombinacija u bakteriji *A. tumefaciens* u ovom slu aju ne ovisi o proteinu RecA.

Glavni mehanizam kojim dolazi do rekombinacije izme u direktnih ponavljanja je delecija izme u njih. U našem slu aju to zna i gubitak otpornosti na ampicilin. Me utim, zasa ivanjem transformanata na podloge s ampicilinom i spektinomycinom

4. Rasprava

primijetili smo gotovo podjednaku uestalost rekombinanata otpornih na spektinomycin/ampicilin. Ovaj rezultat upućuje da osim delecije, prilikom intramolekularne rekombinacije dolazi do duplikacije što je u skladu s podacima iz literature (Lovett i sur., 1993; Bi i Liu 1996).

Restriksijska analiza plazmida pC SpecAmpi- HB dala je zanimljive rezultate (Slika 24.). Ukoliko bakterije otpornost na spektinomycin stje u isključivo intramolekularnom rekombinacijom, rezultati digestije restriksijskim enzimom ScaI trebali bi to potvrditi. Plazmid pC SpecAmpi- HB izoliran iz bakterija koje su narasle na ampicilinskoj podlozi trebao je dati dva fragmenta duljine 6 425 pb i 5 365 pb, a bakterije koje su rasle na podlozi sa spektinomycinom dva fragmenta duljine 6 425 pb i 4 975 pb. Nasuprot, dobili smo tri fragmenta, a tijekom elektroforeze smo ustanovili postojanje molekule DNA duljine oko 21 000 pb. Pretpostavljamo da je postojalo dodatno neprepoznato restriksijsko mjesto za enzim ScaI, te da skraćenje ovih fragmenata u nekim rekombinantima ukazuje na deleciju koja se događa istovremeno uz duplikaciju. Kako nismo vršili elektroforezu neporezanih izoliranih plazmida, to je detekcija dimera bila otežana. Također, odabir enzima ScaI se pokazao lošim jer smo dobili tri fragmenta umjesto jednog ili dva pomoću kojih bi praćenje nastanka delecije i duplikacije bilo jasnije i jednoznačnije. Velikina plazmida (~12 kb) dodatno je otežavala i transformaciju, te kasniju izolaciju i analizu ovih plazmida iz rekombinanata.

Iako procesi rekombinacije u *A. tumefaciens* nisu istraženi kao u bakterije *E. coli*, dobiveni rezultati restriksijske analize ukazuju na sličnost procesa rearanžmana koji ovise o direktnim ponavljanjima.

5. ZAKLJUČAK

5. Zaključak

U skladu s dobivenim rezultatima moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Plazmid pC SpecAmp^r-HB je dobro konstruiran jer bakterije transformacijom stječu otpornost na ampicilin, te spektinomycin.
- Rekombinacija između ponovljenih sljedova plazmida pC SpecAmp^r-HB ne ovisi o proteinu RecA, što je vidljivo iz usporedbe uestalosti rekombinacije dobivene rekombinacijom u bakteriji *A. tumefaciens*, sojevima *recA*⁻ i *recA*⁺.
- Mehanizam intramolekularne rekombinacije je vjerojatno delecija uz nastanak dimera, što se može uočiti iz pomaka fragmenata dobivenih restrikcijom digestijom, te stječu otpornost na kombinaciju antibiotika ampicilin/spektinomycin.
- Dobiveni rezultati u ustalosti rekombinacije, otpornost na antibiotike, te restriksijska analiza upućuju na sličnost rekombinacijskih mehanizama u bakterijama *A. tumefaciens* i *E. coli*.

6. LITERATURA

6. Literatura

Aravind L, Koonin EV (2001): Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA end-binding protein ku, novel domains in the ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res* 11: 1365–1374.

Bi X., Liu L.F. (1996): A Replicational model for DNA recombination between direct repeats. *J. Mol. Biol.* 256: 849-858.

Bi X., Liu L.F. (1994): RecA-independent and RecA-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology requirement and distance effect. *J. Mol. Biol.* 235: 414-423.

Bowater R., Doherty A. J. (2006): Making ends meet: Repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining: *PloS Genet* 2(2): e8

Bzymek M., Lovett S. (2001): Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *PNAS* 98: 8319-8325.

Dianov G.L., Kuzminov A.V., Mazin A.V., Salganik R.I. (1991): Molecular mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. I. Deletion formation mediated by long direct repeats. *Mol. Gen. Genet.* **228**: 153-159.

Canceill D and Ehrlich S D (1996): Copy-choice recombination mediated by DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 June 25; 93(13): 6647–6652.

Cooper G.M.; *The Cell: A Molecular Approach*, 2004.

Dixon D.A., Churchill J.J., Kowalczykowski S.C. (1994): Reversible inactivation of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme by the recombination hot spot, Chi *in vivo*: evidence for functional inactivation or loss of RecD subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2980-2984.

Dixon D.A., Kowalczykowski S.C. (1993): The recombination hotspot, Chi, is regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *Cell* **73**: 87-96.

Dutra B.E., Sutera V.A., Lovett S. (2007): RecA-independent recombination is efficient but limited by exonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 216-221.

Feschenko V.V., Lovett S.T. (1998) Slipped Misalignment Mechanisms of Deletion Formation: Analysis of Deletion Endpoints. *J. Mol. Biol.* 276: 559-569.

6. Literatura

Gianfranco Grompone, Dusko Ehrlich, and Bénédicte Michel (2004): Cells defective for replication restart undergo replication fork reversal. *EMBO Rep.* 2004 June; 5(6): 607–612.

Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. (1994): Biochemistry of Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58: 401-465.

Kowalczykowski SC, Eggleston AK (1994): Homologous pairing and DNA strand exchange proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 991-1043.

Kowalczykowski SC (2000): Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 156-165.

Kuzminow, A. (1999): Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(4):751-813.

Lovett S.T., Drapkin P.T., Sutera V.A., Gluckman-Peskind T.J. (1993): A sister-strand exchange mechanism for recA-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* **135**: 631-642.

Lovett S.T., Gluckman T.J., Simon P.J., Sutera V.A., Drapkin P.T. (1994): Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a recA-independent, proximity-sensitive mechanism. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 294-300.

Lovett S. T., R. L. Hurley, V. A. Sutera, Jr., R. H. Aubuchon and M. A. Lebedeva (2002). "Crossing over between regions of limited homology in *Escherichia coli*. RecA-dependent and RecA-independent pathways." *Genetics* **160**(3): 851-9.

Lowett, S.T. (2004): Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol. Microbiol.* 52, 1243-1253.

Saveson C.J., Lovett S.T. (1997): Enhanced formation by aberrant DNA replication in *Escherichia coli*. *Genetics* **146**: 457-470

Sveteć I. K. (2005): Utjecaj palindroma na homolognu rekombinaciju i stabilnost kvaš evog genoma. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

6. Literatura

Telander-Muskavitch K.M., Linn S. (1982): A unified mechanism for the nuclease and unwinding activities of the RecBC enzyme of *Esherichia coli*. J. Biol. Chem. **257**: 2641-2648.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature 412: 607–614

Viguera E., Canceill D., Ehrlich S.D. (2001): Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. The EMBO Journal Vol. 20 No.10 pp. 2587-2595.