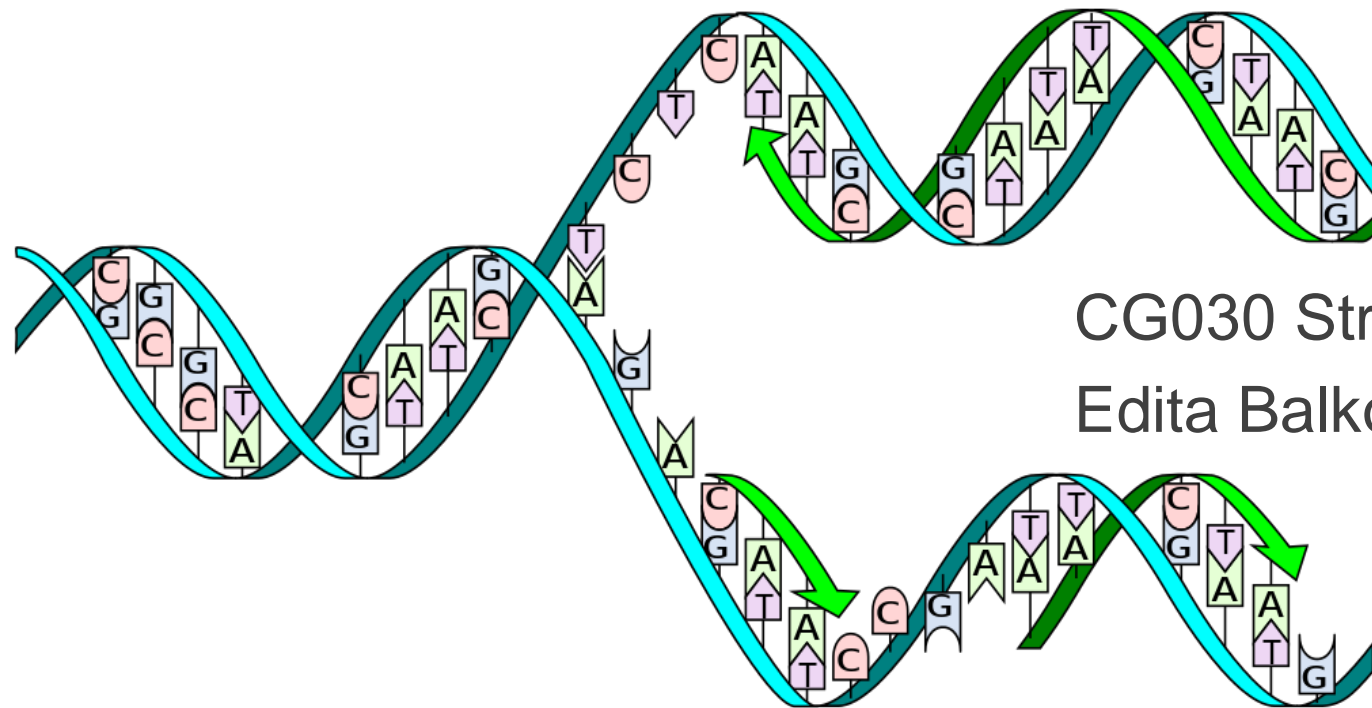


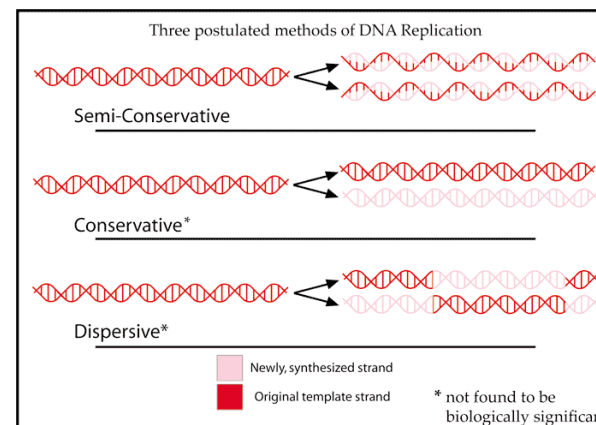
PROTEINOVÉ KOMPLEXY V REPLIKACI DNA



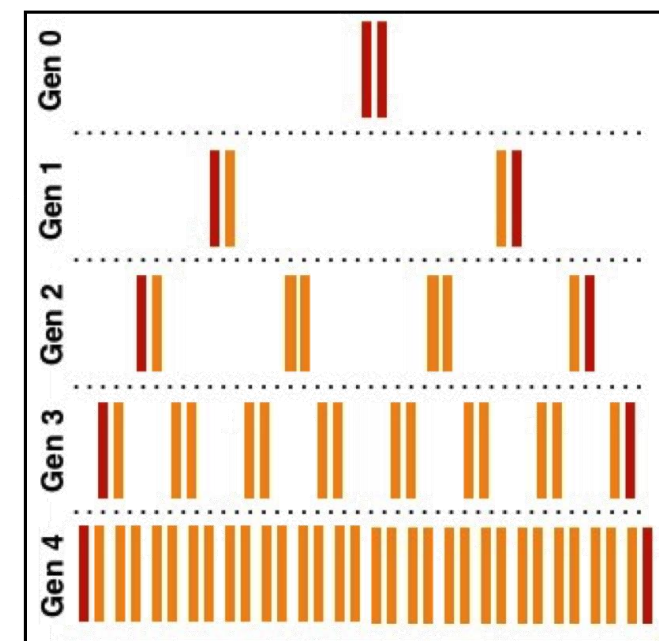
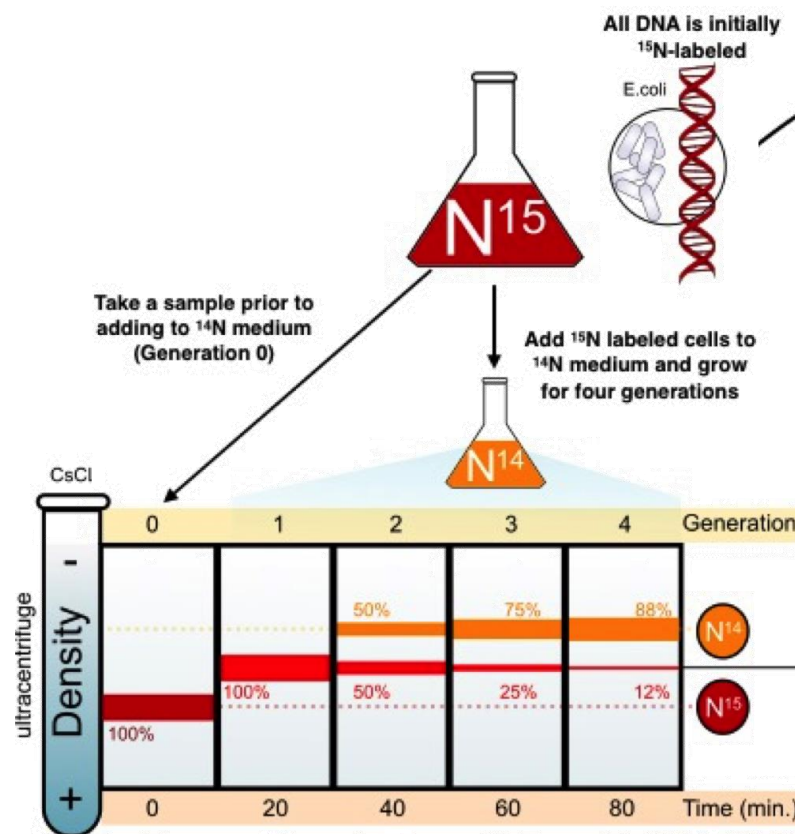
CG030 Struktura a funkce proteinových komplexů
Edita Balkóová 4.4.2019

Replikácia

- DNA polymeráza I – *E.coli* (Kornberg, 1957)
- Semikonzervatívna (Meselson a Stahl, 1958)
- Replikačná vidlica – *E.coli* (Cairns, 1963)
- Okazakiho fragmenty (1968)

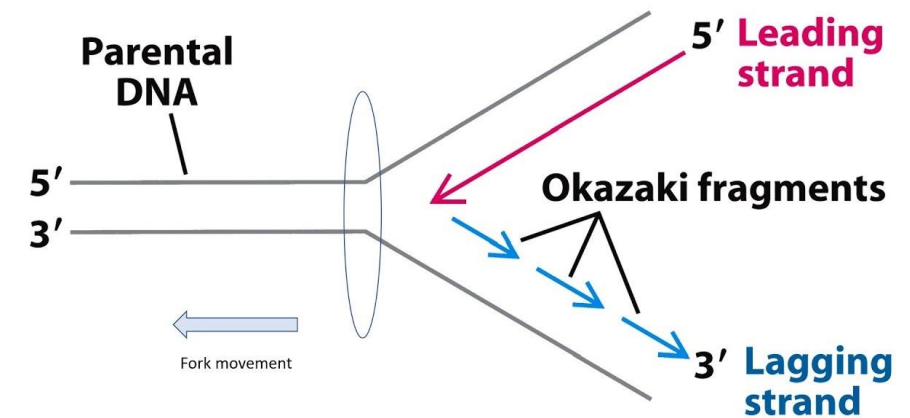
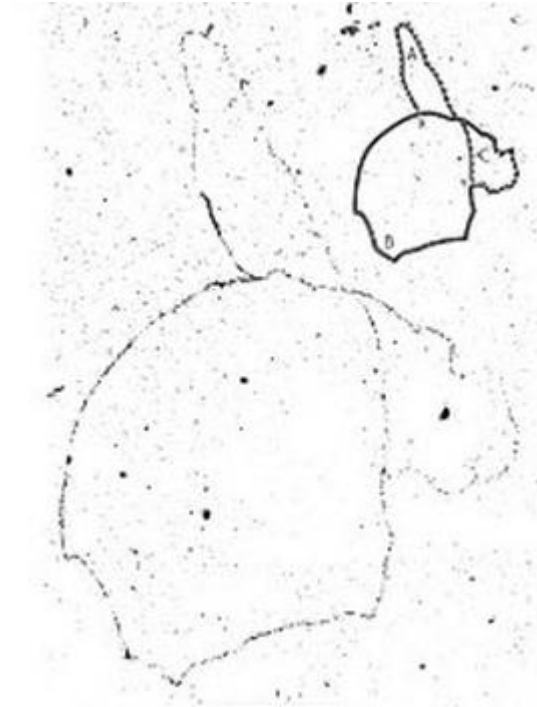


- Semikonzervatívna
- Obojsmerná
- Smer syntézy DNA: 5' → 3'
- Presnosť: $1/10^6$
- Rýchlosť:
 - *E. coli* – 50 000 b/min
 - *S. cerevisiae* – 3 600 b/min
 - Myš – 2 200 b/min
 - Človek – 50 b/min
- Načasovanie:
 - Bakterie nemajú špecifickú fázu
 - Eukaryota v S fázi



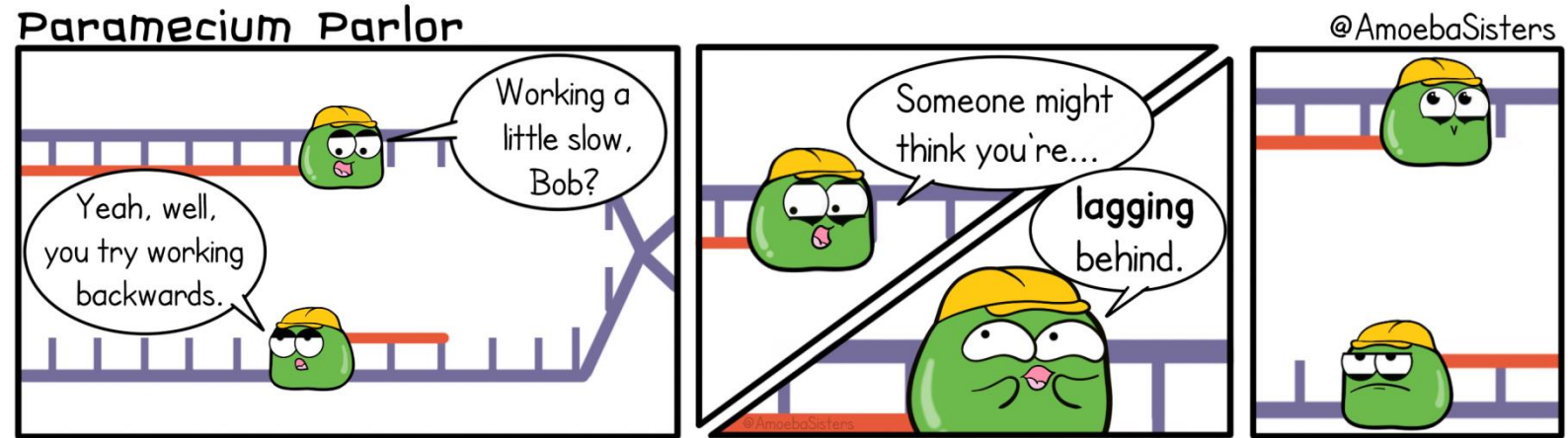
Replikácia

- DNA polymeráza I – *E.coli* (Kornberg, 1957)
- Semikonzervatívna (Meselson a Stahl, 1958)
- Replikačná vidlica – *E.coli* (Cairns, 1963)
- Okazakiho fragmenty (1968)
- Semikonzervatívna
- Obojsmerná
- Smer syntézy DNA: 5' → 3'
- Presnosť: $1/10^6$
- Rýchlosť:
 - *E. coli* – 50 000 b/min
 - *S. cerevisiae* – 3 600 b/min
 - Myš – 2 200 b/min
 - Človek – 50b/min
- Načasovanie:
 - Baktérie nemajú špecifickú fázu
 - Eukaryota v S fázi



Replikácia

- Semikonzervatívna
- Obojsmerná
- Smer syntézy DNA: 5' → 3'
 - Vedúci reťazec
 - Oneskorujúci sa (opžďujúci se)

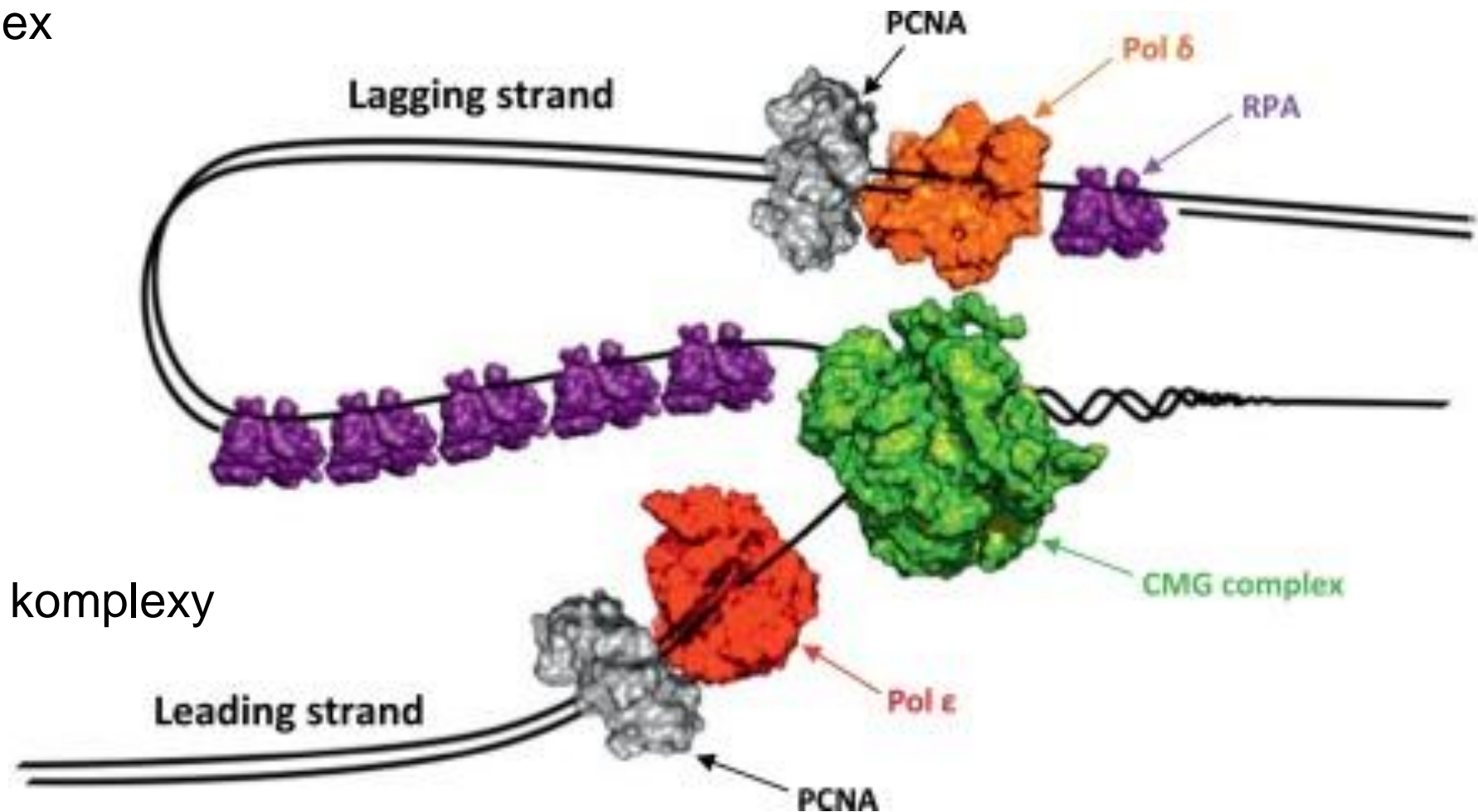


3 fáze replikácie:

- Iniciácia
 - Začiatok už v M/G1 (licensing), rozpletenie dvojšróbovice DNA, vznik replikačnej vidlice a naviazanie enzymatického komplexu
- Elongácia
 - pridávanie nukleotidov a postup replikačnej vidlice
 - Topologický stres, ťažko replikovatelné lokusy, proteiny na DNA, transkripcia, poškodená DNA
- Terminácia
 - ukončenie replikácie

Proteinové komplexy v replikácii

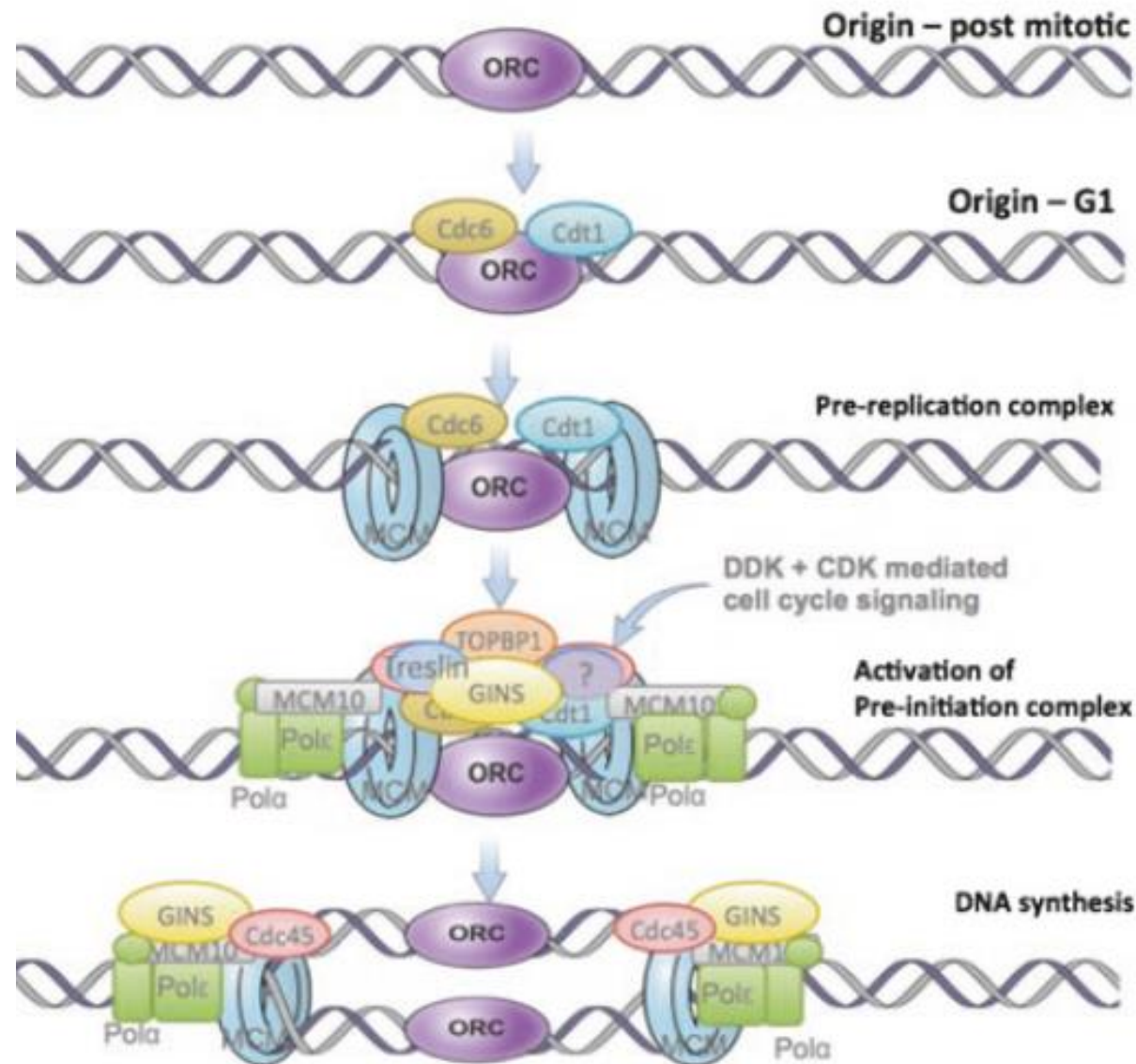
- Prereplikačný komplex
- CMG helikáza
- RPA
- Primáza
- DNA polymerázy
- PCNA
- DNA ligáza
- Topoizomerázy I a II
- Histon remodelačné komplexy
- ...



Iniciácia

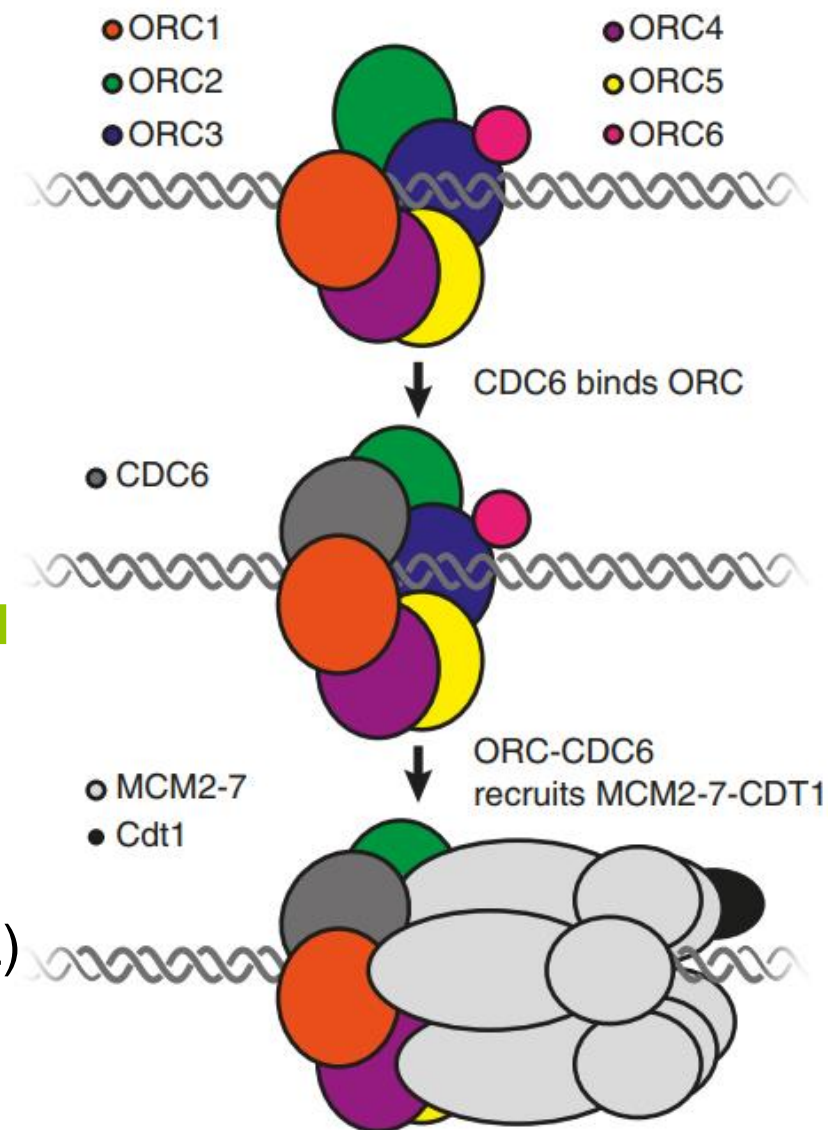
- Bakterie majú len 1 replikačný počiatok
- Eukaryota – väčší zložitejší genom – viac počiatkov replikácie
- Zostavenie prereplikačného komplexu v G1
 - „replication licencing“
- Fosforylácia MCM helikázy pomocou CDK a DDK kináz
- Aktivácia replikačnej helikázy (CMG helikáza) v S
 - K MCM helikáze sa pripoja ďalšie proteíny

1. ORC komplex
2. MCM helikáza → preRC
3. MCM dvojitý hexamer
4. MCM dvojitý hexamer → CMG helikáza



ORC

- Origin of **r**ecognition **c**omplex
- Objavené u *S. cerevisiae*
- Podjednotky Orc1, Orc2, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 (+CDC6)
- Asociované s chromatinom - väzba na **ARS**
 - **A**utonomously **r**eplicating **s**equences
 - Väzba k DNA závislá na ATP
- Funkcia: **zostavenie prereplikačného komplexu (preRC) v G1**
 - Transkripčné umlčenie, heterochromatinizácia, kondenzácia a kohézia chromosómov, cytokinéza
- **preRC: Cdc6, Cdt1, Mcm2-7, ORC**
- MCM helikázový komplex sa aktivuje až v S fázi (pomocou kináz)
- Nie všetky replikačné počiatky sa aktivujú
- Meier-Grolinov syndróm (AR-ORC, Cdc6), EBV, nádory

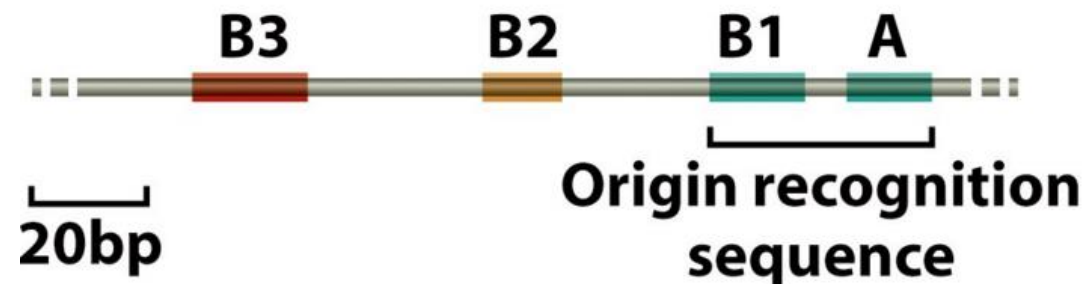


ARS

- **A**utonomously **r**eplicating **s**equences
- Sem sa viaže preRC
- ORC sa viaže na DNA pomocou **WH** domén a **AT hookov**

- **Konsezus sekvencia u *S. cerevisiae*:**

- ORC naviazaný počas celého buňčného cyklu
- A-element vysoko konzervovaný
5'- T/A T T T A Y R T T T T/A -3
- 100 bp dlhé
- Aktívne (replikácia z 1 ARS každý druhý buňčný cyklus)



- Okrem *S. cerevisiae* a jej blízko príbuzných kvasiniek sa u žiadneho ďalšieho organizmu nepodarilo nájsť uniformnú konsenzuálnu sekvenciu pre väzbu ORC

- **AT-bohatá sekvencia u *S. pombe***

- ORC sa viaže v M/G1, uvoľní sa v S
- Replikačné počiatky viac podobné mnohobuněčným jako *S. cerevisiae*
- 1000 bp dlhé
- Málo aktívne (replikácia z 1 ARS každý desiaty buňčný cyklus)

ARS

- Autonomously replicating sequences
- Sem sa viaže preRC
- ORC sa viaže na DNA pomocou WH domén a AT hookov

Vyššie eukaryota:

- Asymetrické **AT bohaté** sekvencie, rozhoduje epigenetika
 - G-kvadruplexy, počiatky transkripcie, Dnáza hypersenzitívne oblasti
 - **Early replicating regions:**
 - H3K4me1/2/3, H3K9ac, H3K18ac, H3K36me3, a H3K27ac
 - Euchromatin
 - **Late replicating regions:**
 - H3 a H4 hypoacetylácia, a H3K9 a H3K27 metylácia
 - Často tkáňovo špecifické
 - V ľudských bunkách Orc1 sa počas S fáze uvoľní z komplexu a spät sa naviaže na konci mitózy
- ARS: Kvasinky po 40kb, savci každých 200-300kb
 - Ľudská buňka asi 50 000 ARS

Podjednotky ORC

ORC1 :

- Interakcia so Sir1 (*S.c.*), HP1 (*D.m.*)
 - transkripčná represia
- **BAH doména** sa viaže na H4K20me2
 - esenciálna interakcia pre asociáciu s chormatinom

ORC2:

- Lokalizácia aj pri centromerách
 - delécia → mitotické defekty
- **AT hook**: väzba k DNA

ORC4 :

- Asociácia s membránami neurónov, úloha v dendritickom rastu

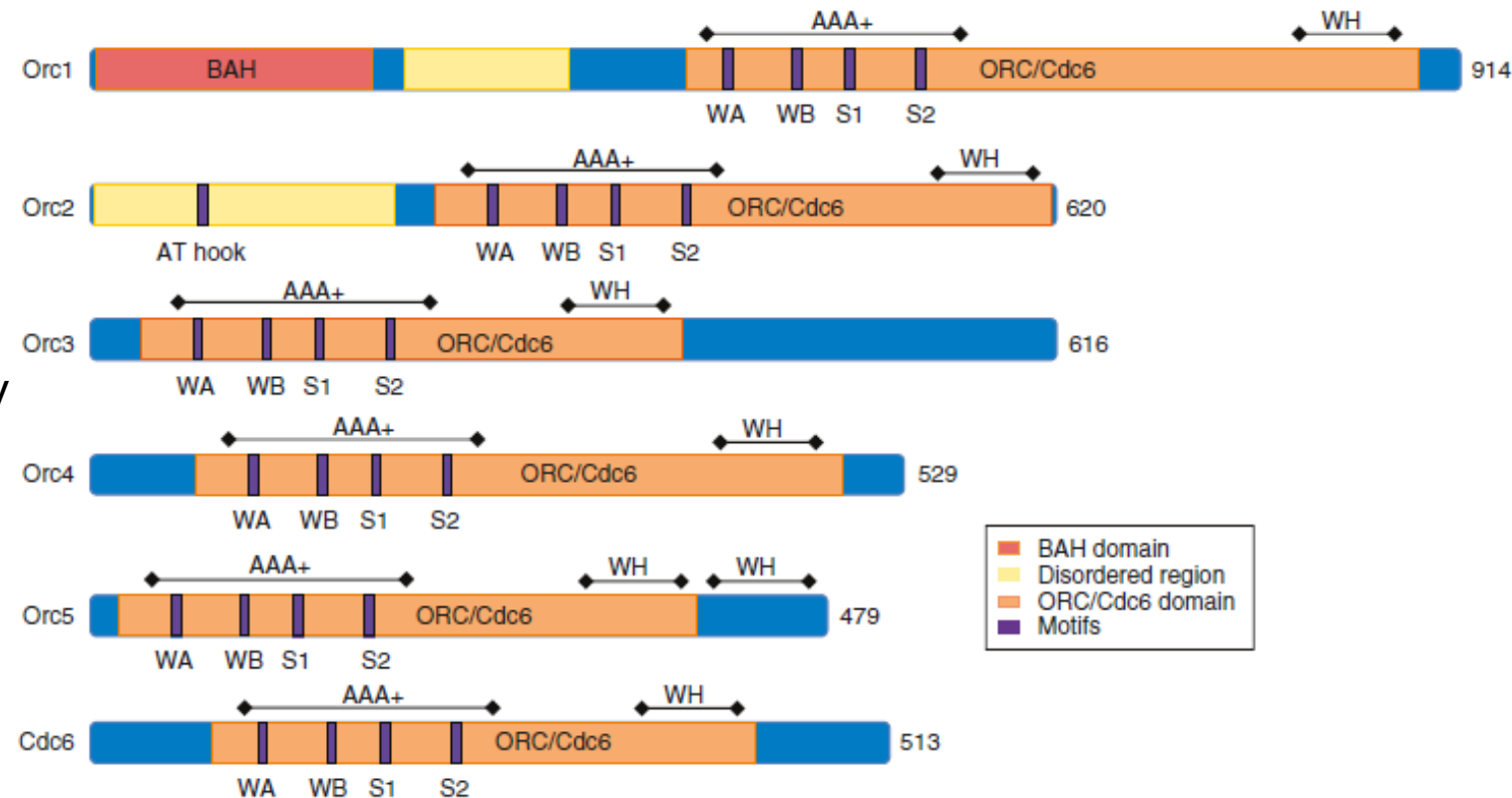
ORC6:

- **Štruktúrne odlišná od ostatných ORC podjednotiek**
- Medzidruhovo veľmi málo konzervovaná
- Lokalizácia u kinetochóroch, úloha v cytokynéze (*H.s.*, *D.m.*)

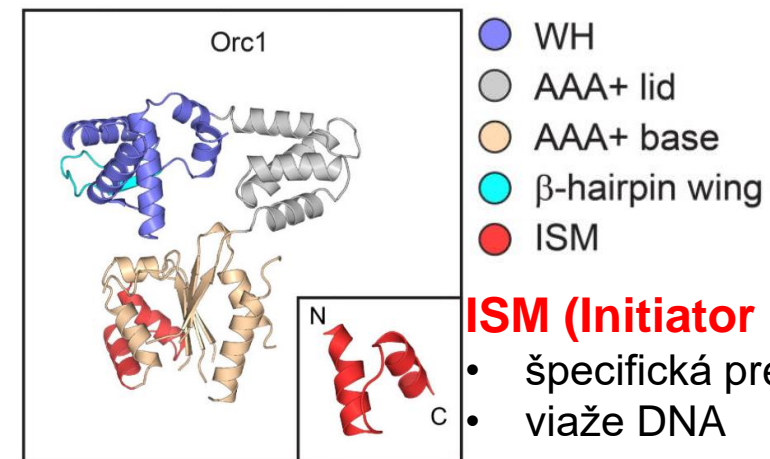
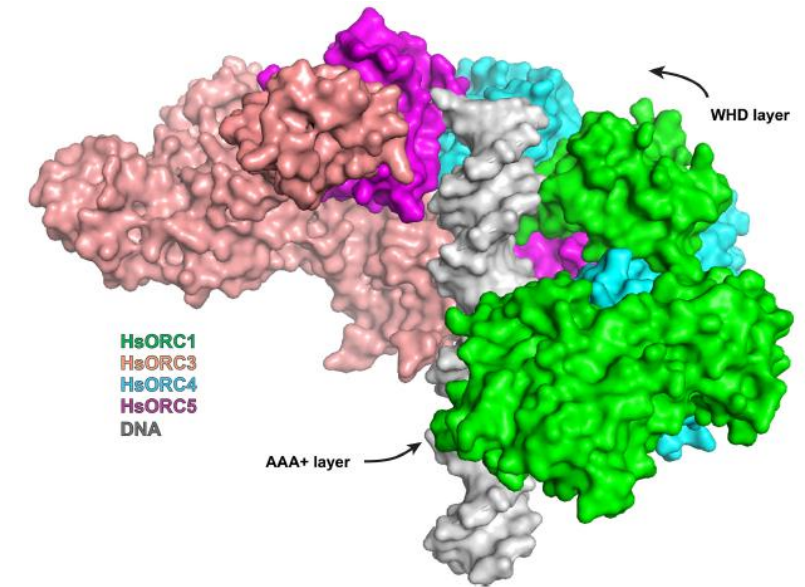
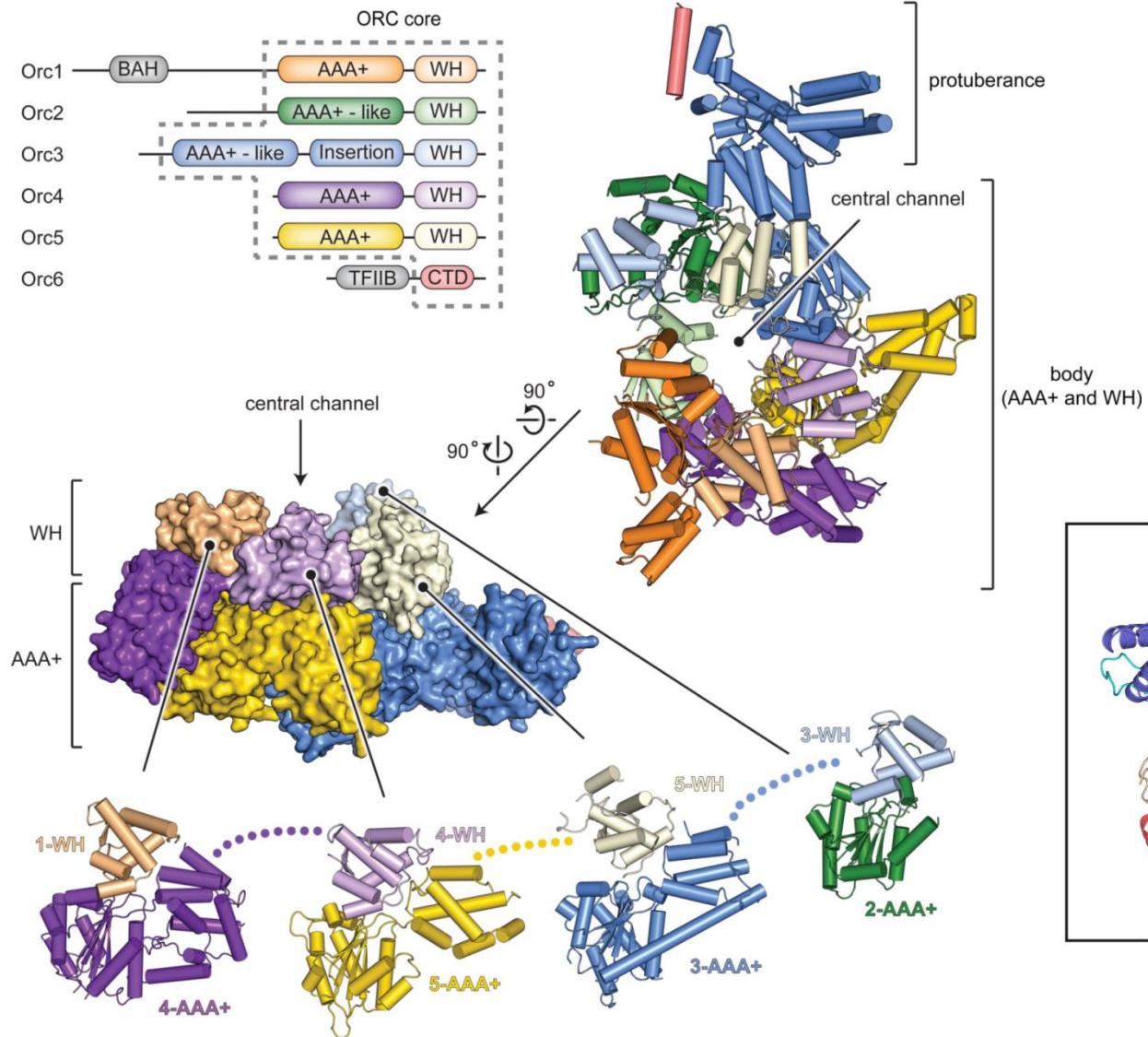
WH doména a AT hook – väzba k DNA

AAA+ doména – ATPázová doména

BAH doména – protein-proteinové interakcie



Štruktúra ORC



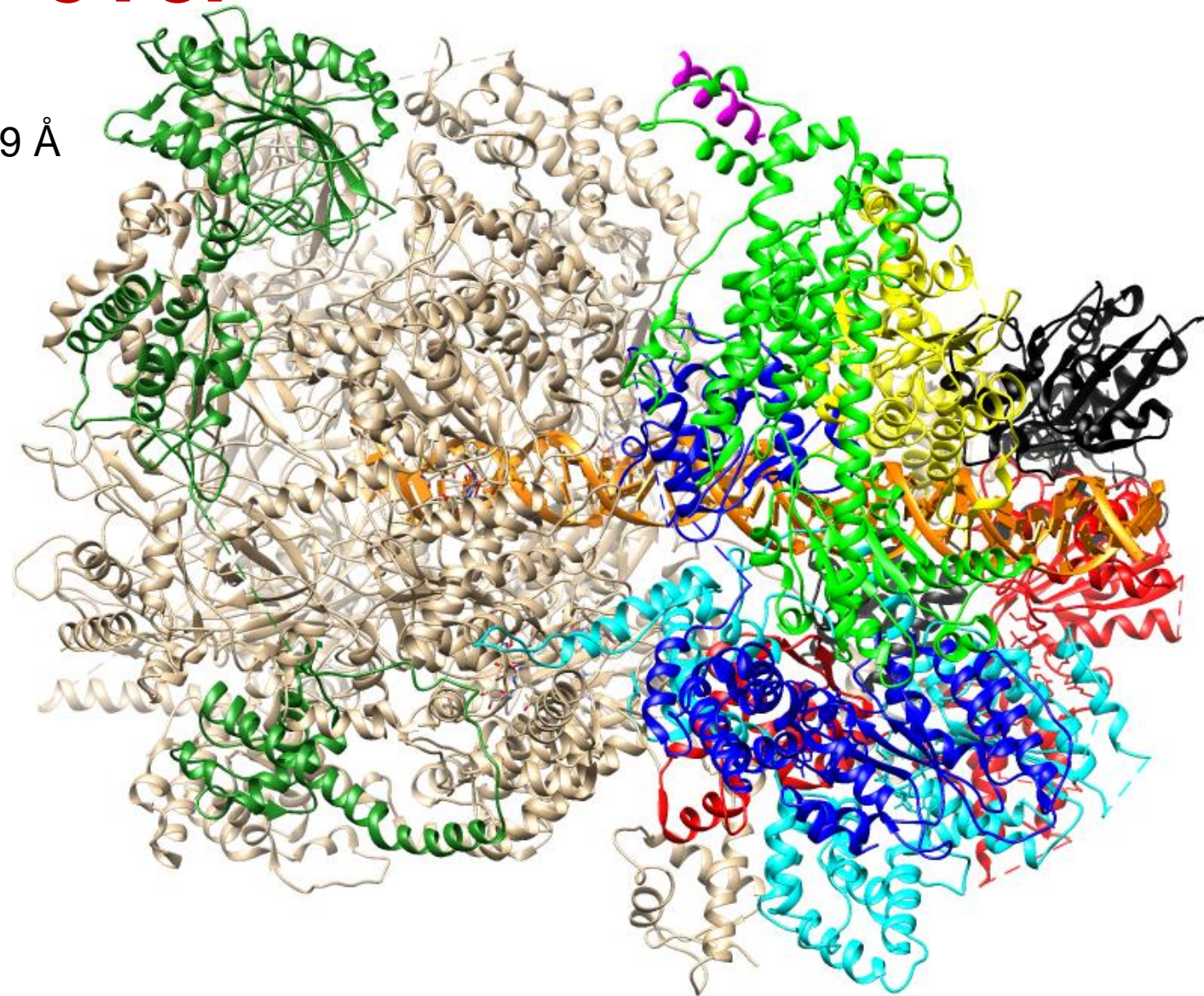
ISM (Initiator specific motif)

- špecifická pre iniciátory replikácie
- viaže DNA

Štruktúra ORC - 5V8F

- organismus: *S. cerevisiae*
- Cryoelektronová mikroskopie – 3,9 Å

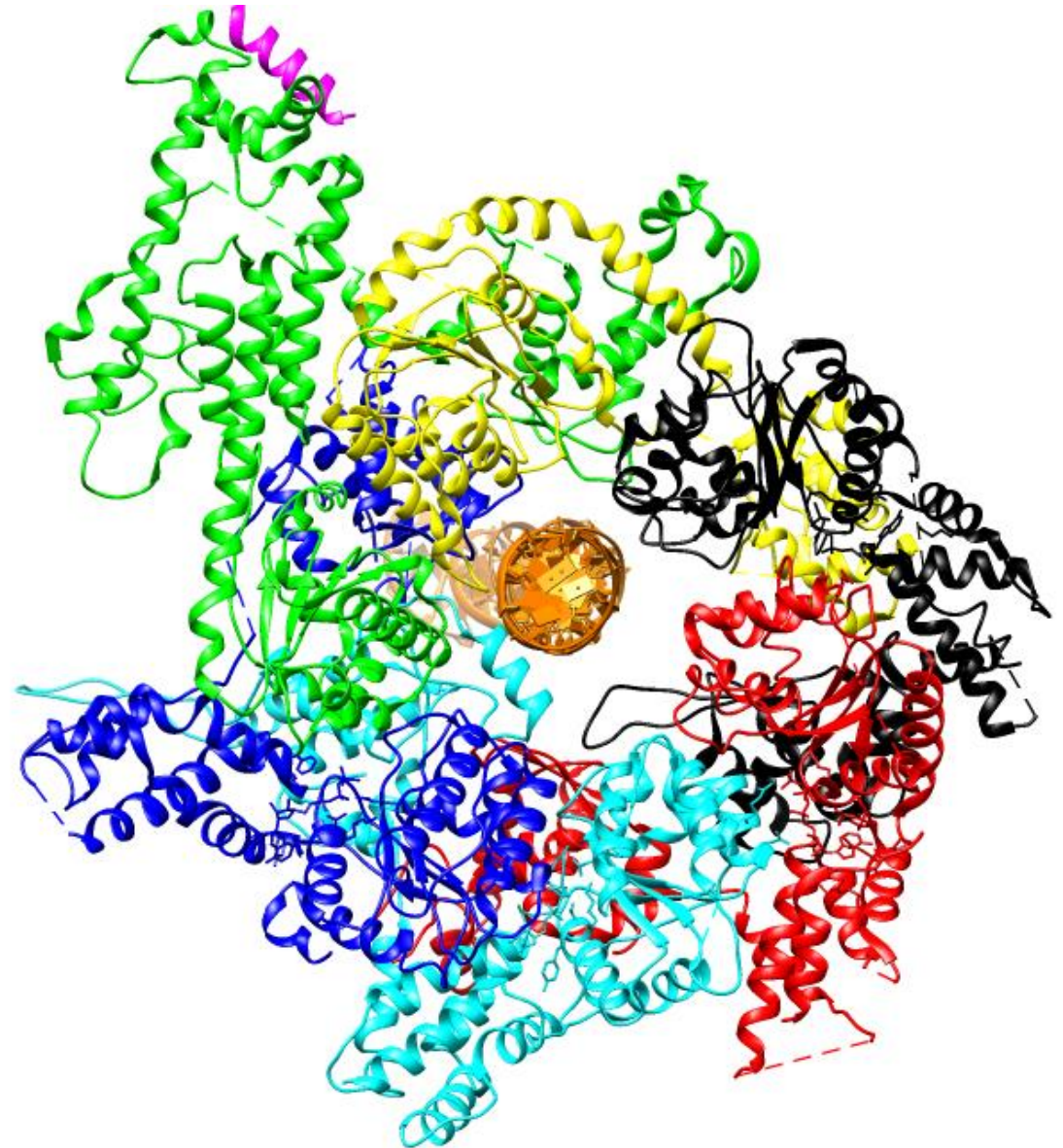
DNA
Mcm2-7
Cdt1
Cdc6
ORC1
ORC2
ORC3
ORC4
ORC5
ORC6



Štruktúra ORC - 5V8F

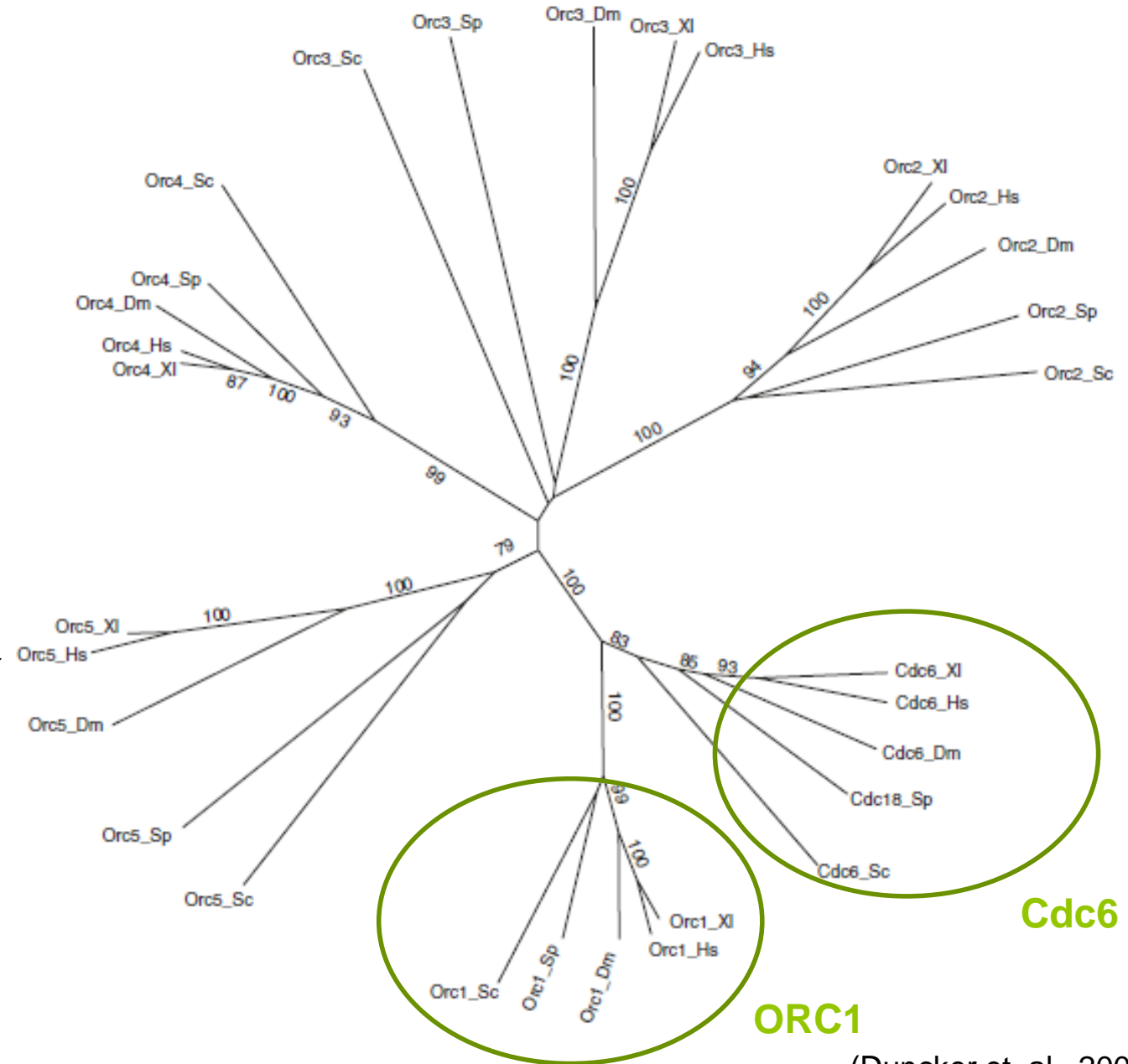
- organismus: *S. cerevisiae*
- Cryoelektronová mikroskopie – 3,9 Å

DNA
Mcm2-7
Cdt1
Cdc6
ORC1
ORC2
ORC3
ORC4
ORC5
ORC6

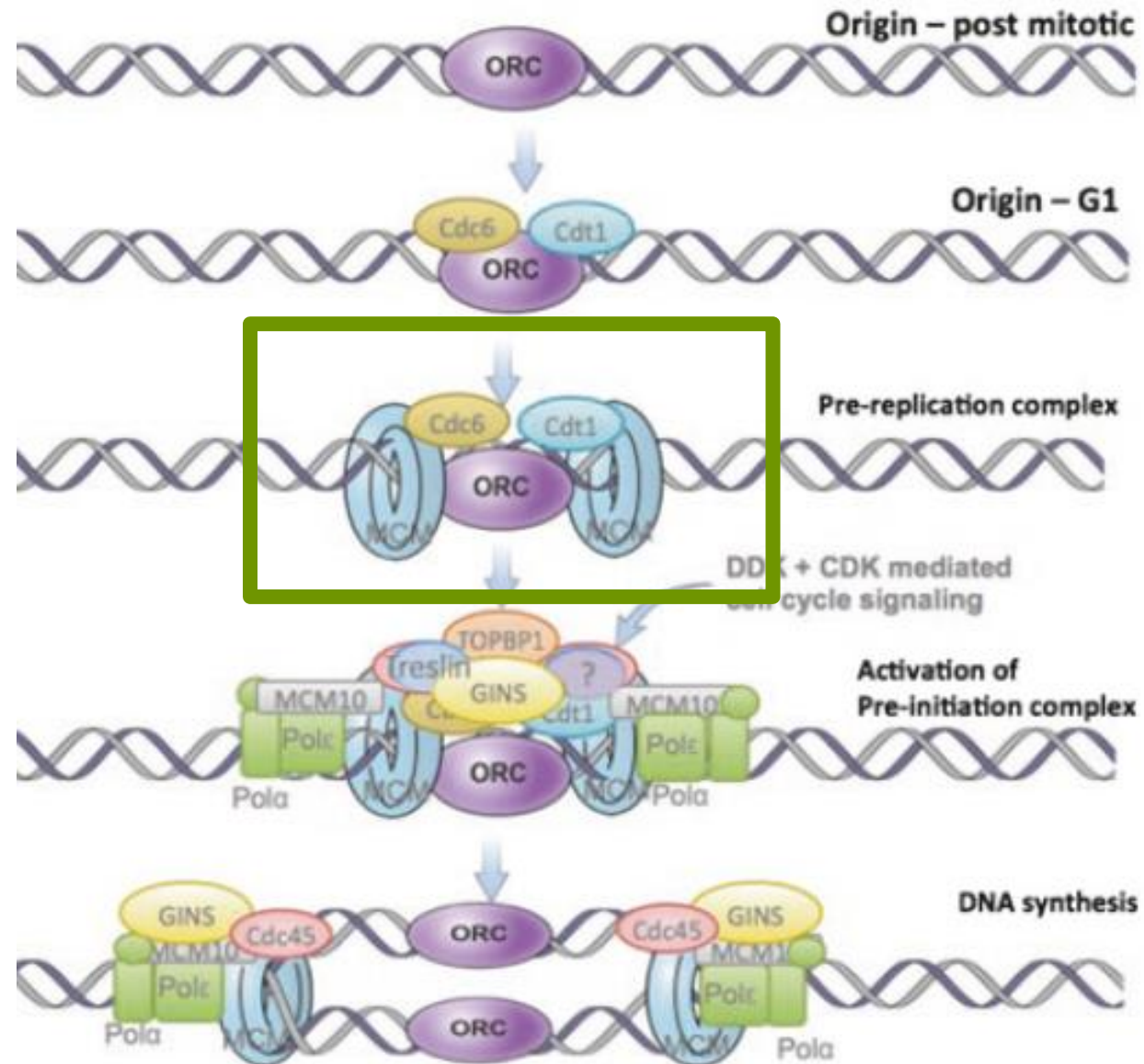


Evolúcia ORC

- Bakterie: **DnaA**
 - Štruktúrne podobné
- Archaea: ORC
- **ORC1 – Cdc6**
- **ORC1 – Sir3**
 - N-koncových 214 aa (BAH doména)
(50%identita, 63% podobnosť)
 - Sir3 – úloha v transkripčnom umlčovaní
- **ORC6 – TFIIB**
 - C-koniec
 - Koevolúcia proteínov v replikácii a transkripcii?

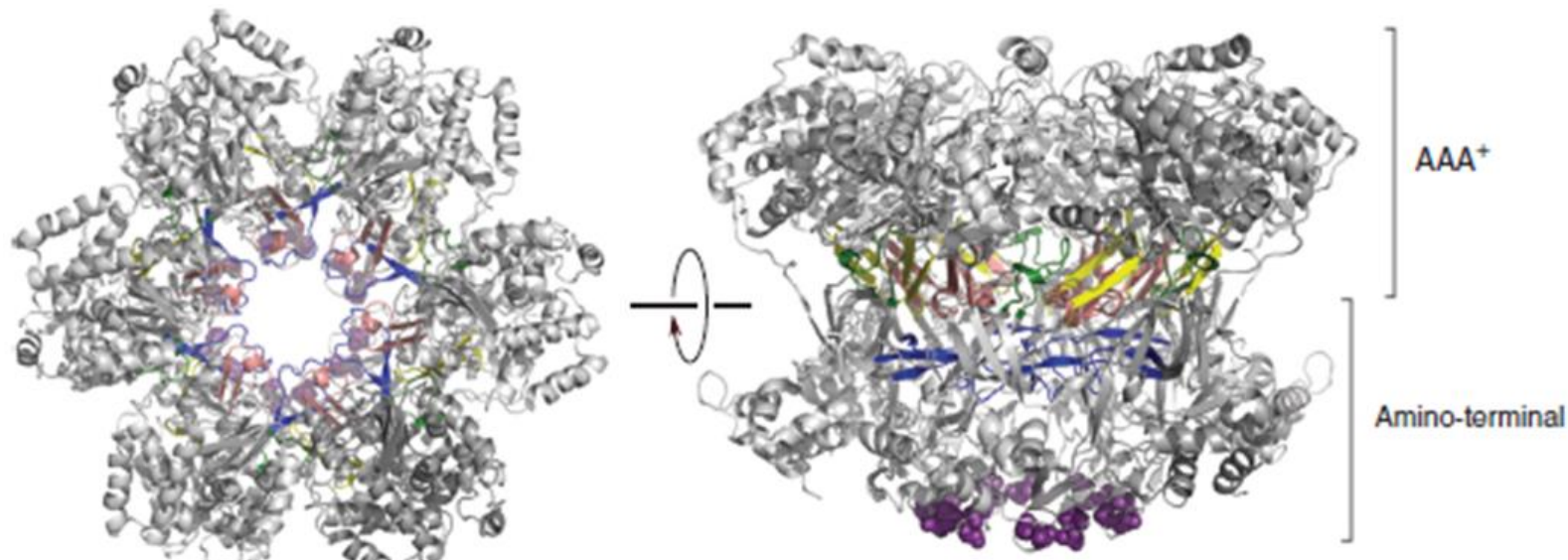


Iniciácia



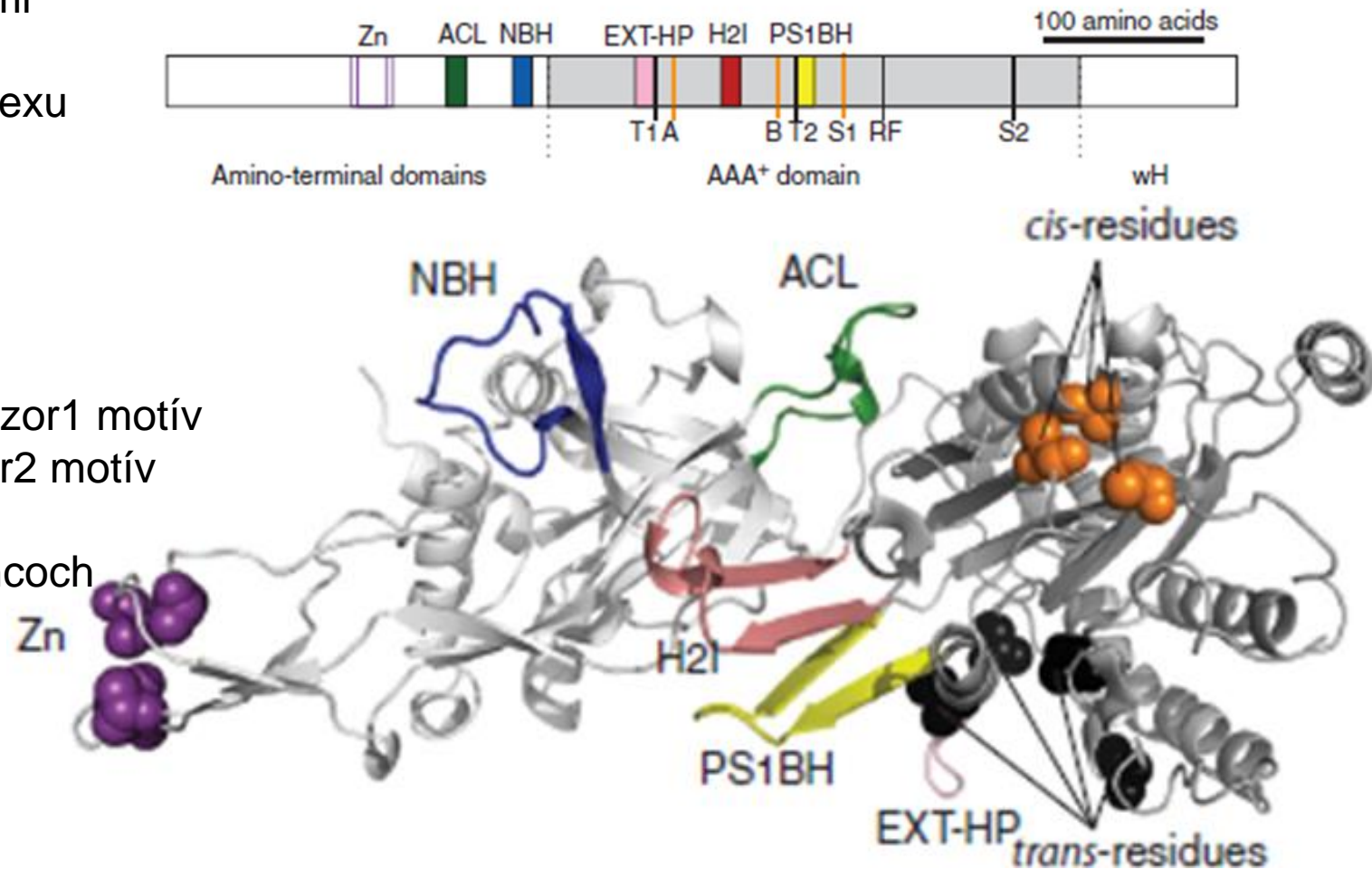
MCM2-7 komplex

- **Minichromosome maintenance 2-7**
 - U *archaea* 6 identických podjednotiek
 - Podjednotky: 5-3-7-4-6-2 ring
 - Rodina AAA+ ATPáz
 - **3'-5' helikáza**
 - Sama o sebe nemá helikázovú aktivitu
 - potrebuje **cdc45** a **GINS**
 - Iniciácia (preRC) + elongácia (CMG)
 - **Postupuje s replikačnou vidlicou**
- **Loading:**
 - Pomocou ORC-CDC6 komplexu a Cdt1 v G1
 - Po loadingu je MCM komplex **SUMOylovaný** (až do S fáze) – zabráni skoršej aktivácii
 - **Aktivácia počas S fáze**
 - Tvorba dvojitého hexameru
 - Fosforylácia pomocou **CDK a DDK protein kináz**
 - MCM už nie je sumoylovaný ale **fosforylovaný**
 - Aktivácia nie naraz, nie všetky
 - Záloha v prípade pozastavených replikačných vidlíc
 - **Stochastické**



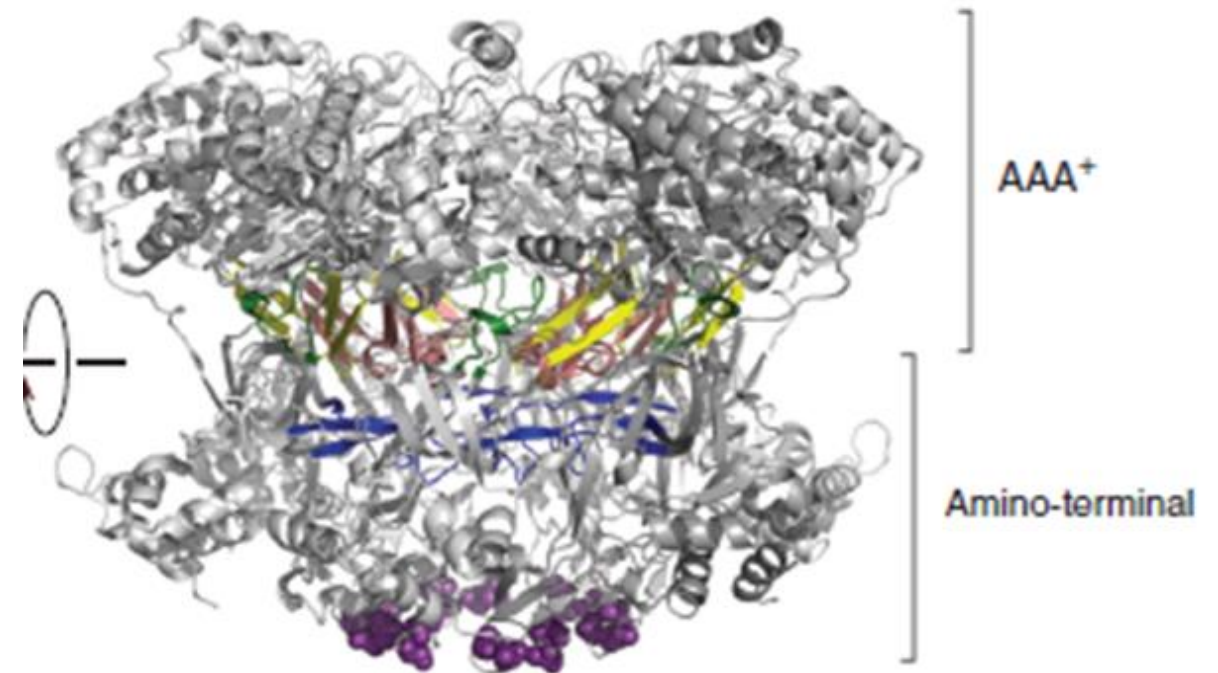
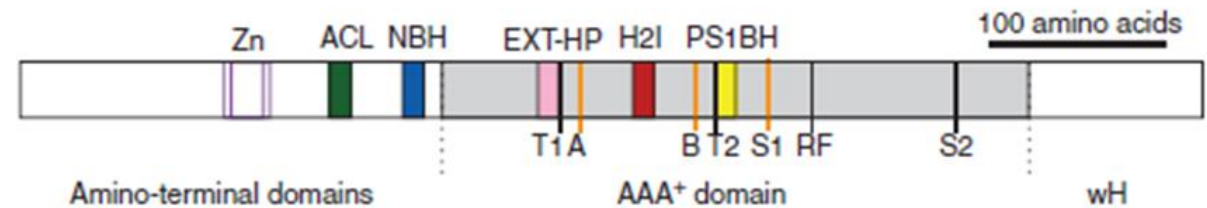
MCM2-7 complex – štruktúra podjednotiek

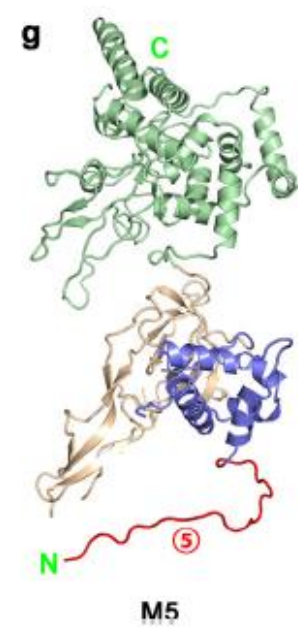
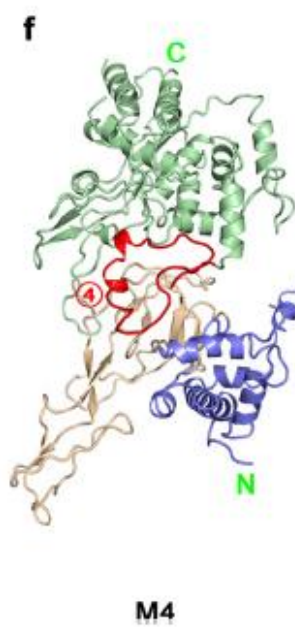
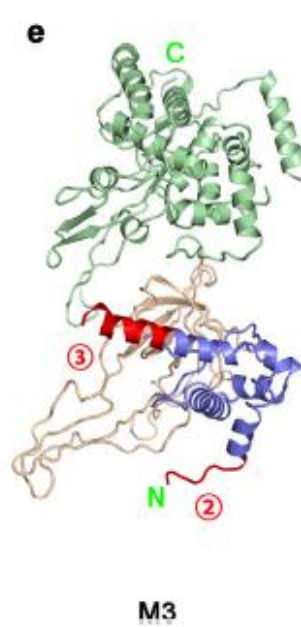
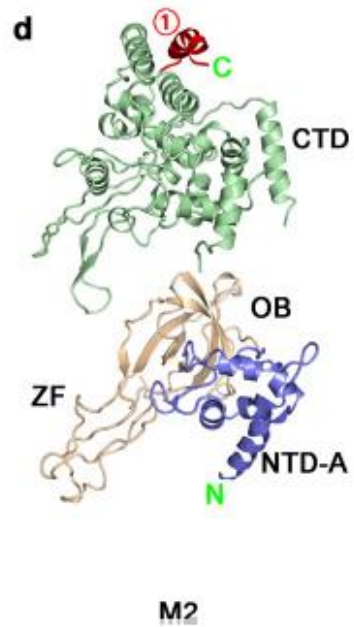
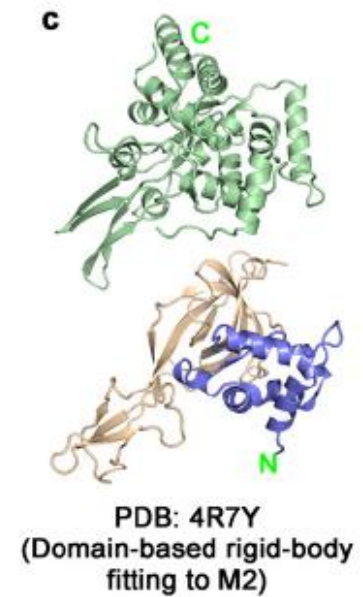
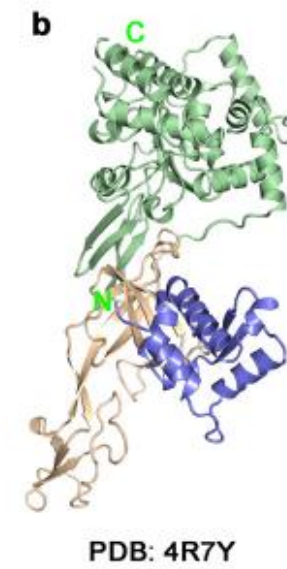
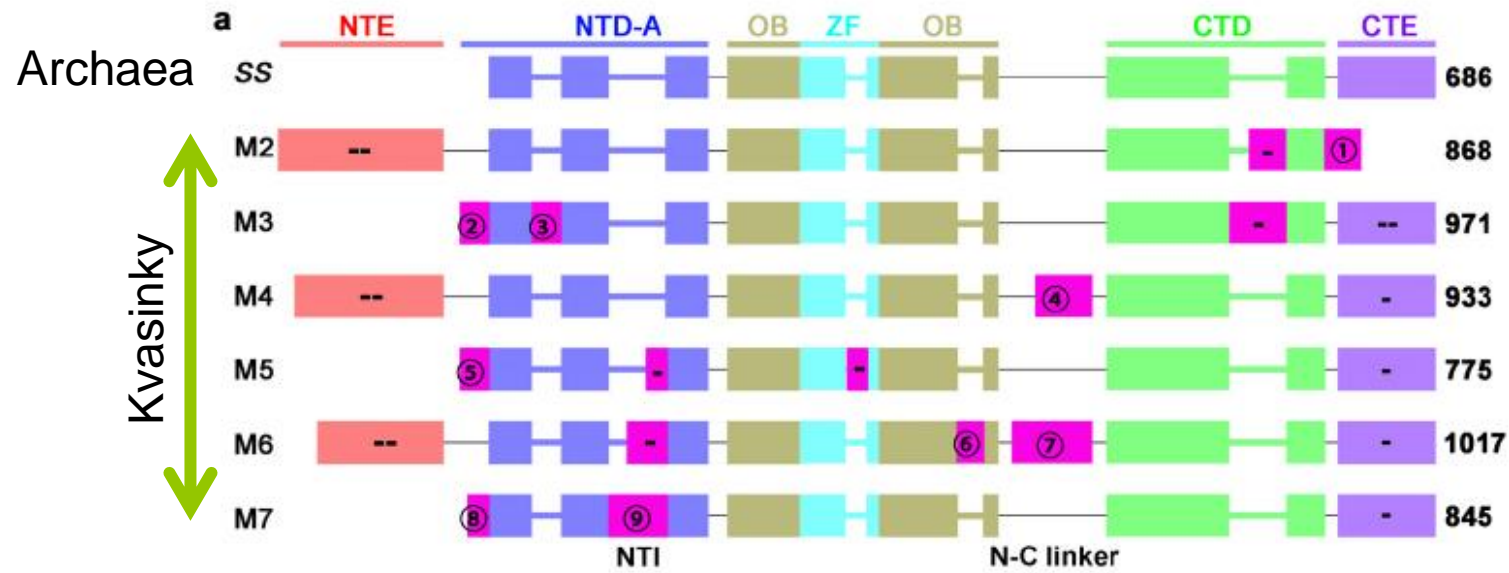
- **N-koncová doména**
 - interakcia medzi MCM podjednotkami
- **Zinc-binding motif**
 - stabilizácia N-koncov a tým aj komplexu
- **Allosteric communication loop**
 - komunikácia medzi podjednotkami
- **N-koncový β -hairpin**
 - Interakcia s DNA
- **AAA+ ATPázová doména**
 - Cis-acting: WalkerA, WalkerB a Sensor1 motív
 - Trans acting: argininový prst, Sensor2 motív
- **Degenerovaná Winged Helix**
- Posttranslačné modifikácie na N a C koncoch



MCM2-7 complex – štruktúra podjednotiek

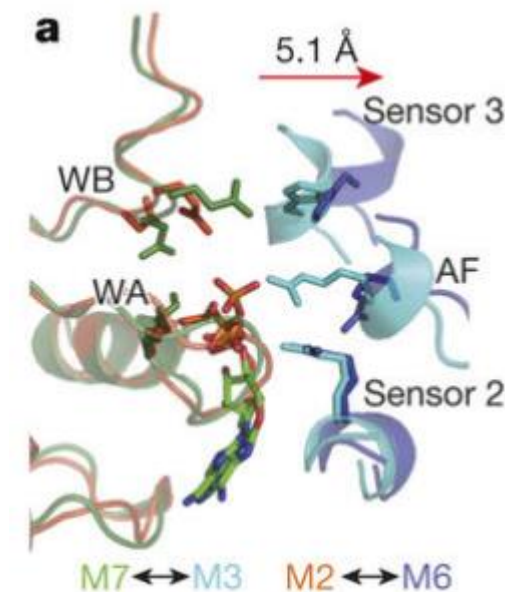
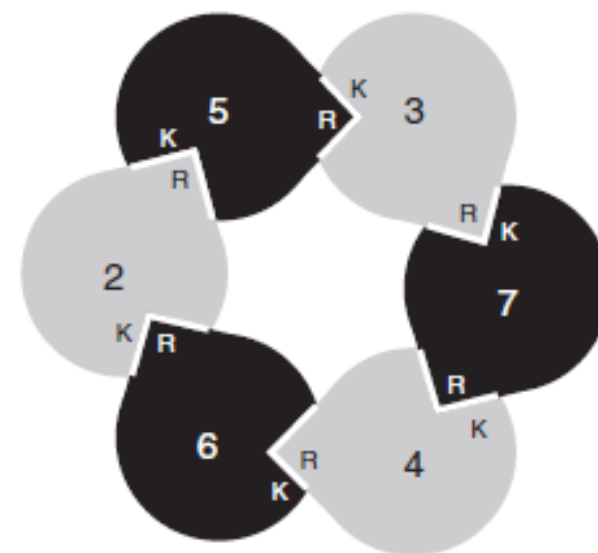
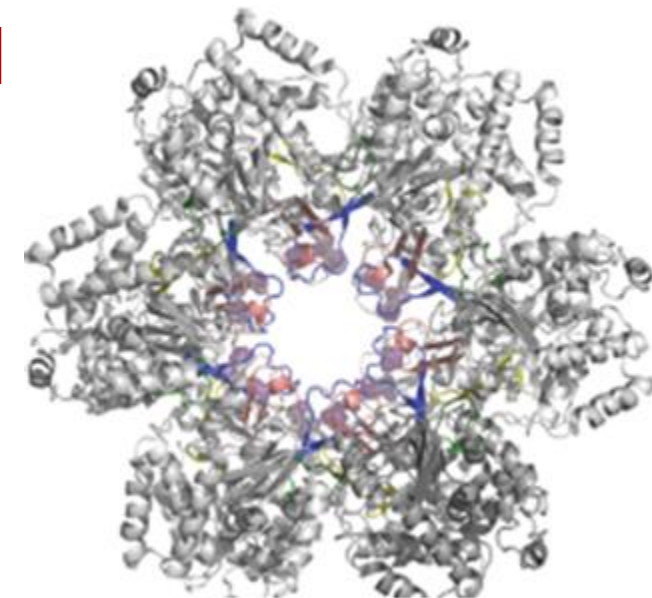
- **N-koncová doména**
 - interakcia medzi MCM podjednotkami
- **Zinc-binding motif**
 - stabilizácia N-koncov a tým aj komplexu
- **Allosteric communication loop**
 - komunikácia medzi podjednotkami
- **N-koncový β -hairpin**
 - Interakcia s DNA
- **AAA+ ATPázová doména**
 - Cis-acting: WalkerA, WalkerB a Sensor1 motív
 - Trans acting: argininový prst, Sensor2 motív
- **Degenerovaná Winged Helix**
- Posttranslačné modifikácie na N a C koncoch





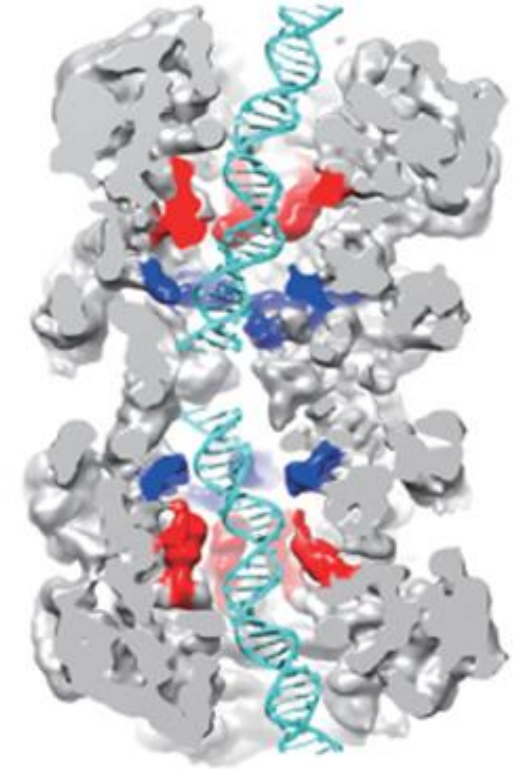
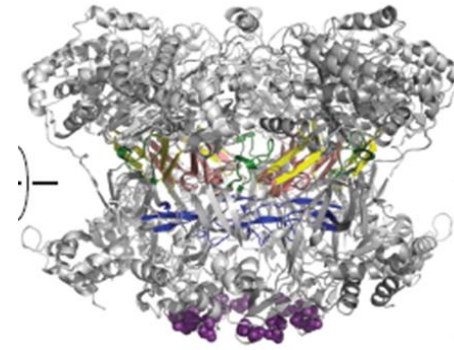
ATPázová aktivita MCM komplexu

- AAA+ ATPázy
- Aktivné miesta **medzi podjednotkami**
 - Jedna podjednotka: Walker A a Walker B motívy
 - Druhá podjednotka: Arginin finger
- V jednom hexamere MCM 6 aktívnych miest
- Loading komplexu: 2-6 ATPáza
- Loading druhého hexameru
a tvorba dvojitého hexameru MCM komplexov:
 - 4-7, 6-4, 5-2 a 3-5 ATPázy



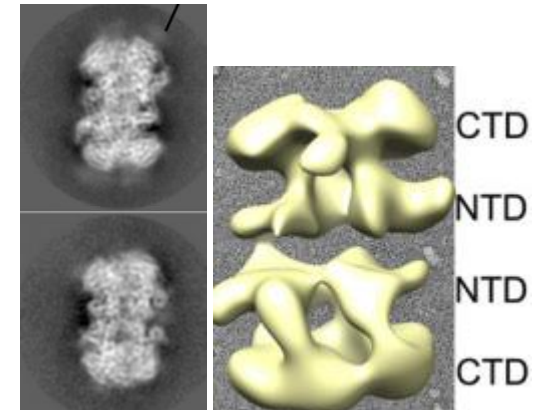
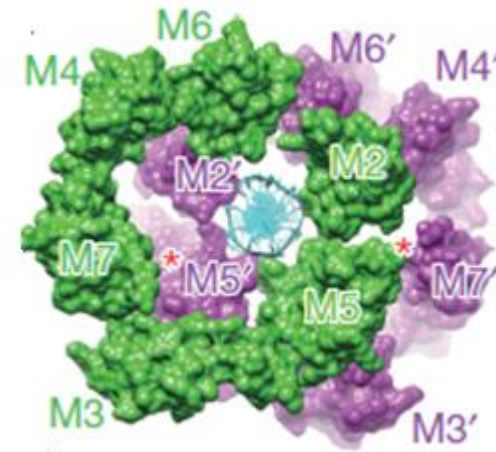
Mcm – dvojitý hexamer

- Dva hexamery sa spoja **až po väzbe na DNA**
 - U archaea sa dva hexamery môžu spojiť už mimo DNA
 - ORC rekrutuje MCM komplexy po jednom
 - Dva MCM komplexy sa potom spoja pomocou **N-terminálnych domén**
 - **Zinkové prsty** stabilizujú interakciu medzi dvomi MCM komplexmi
 - Loading aj dimerizácia MCM komplexov vyžaduje ATP

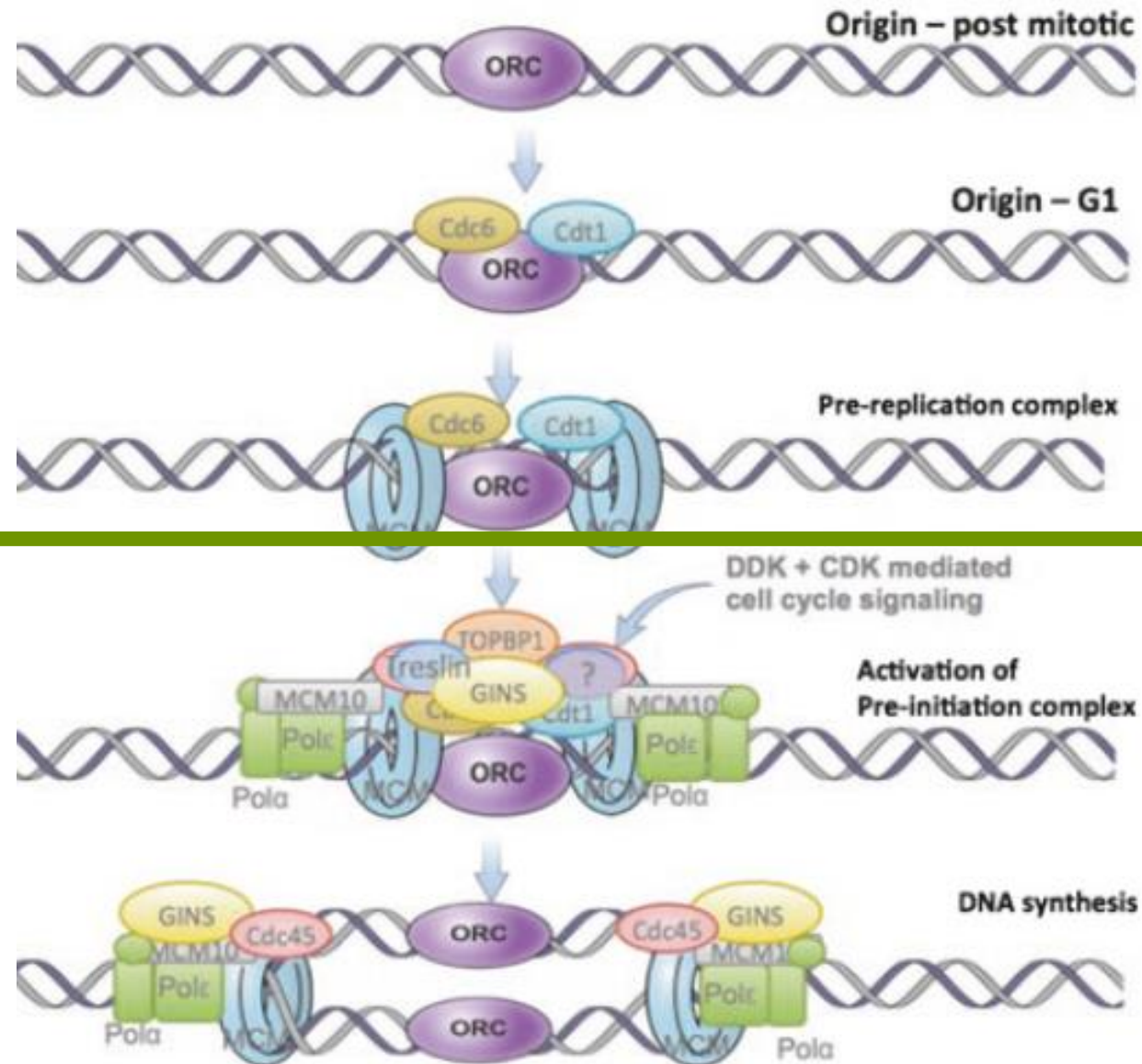


- **Centrální pór MCM komplexu**

- 23Å – vojde sa ss aj dsDNA
- **Pozitívny náboj**
- Väzba na DNA pomocou bazických AMK v **OB fold**
- **Kink DNA**



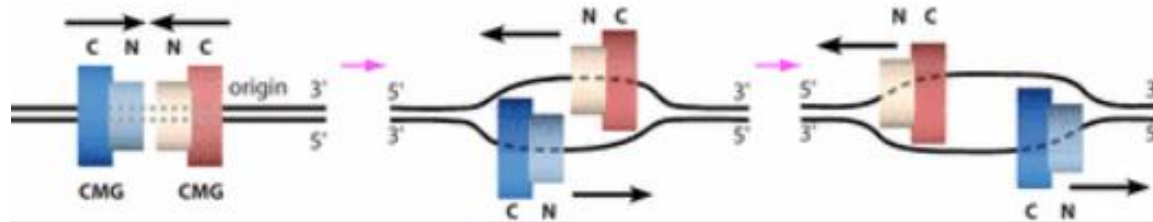
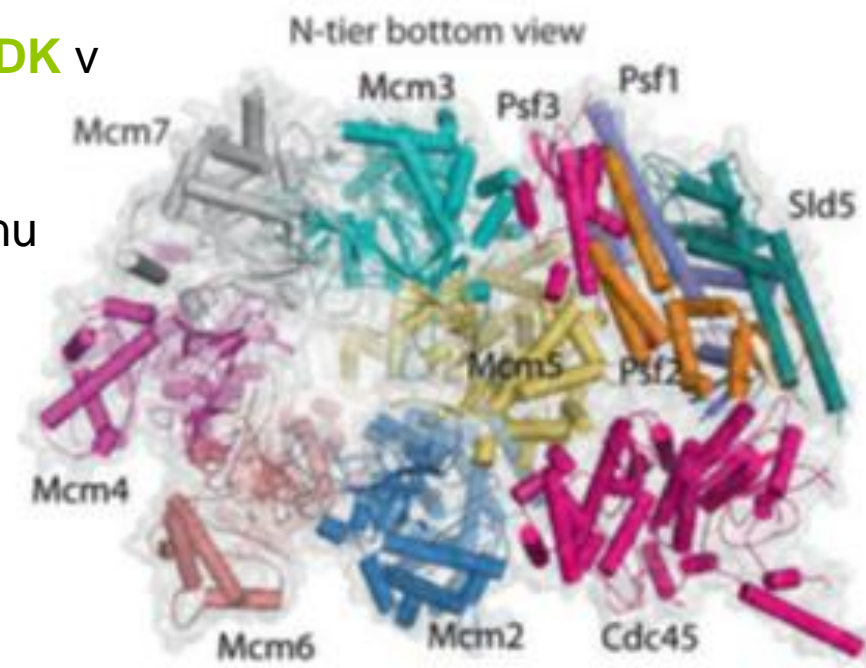
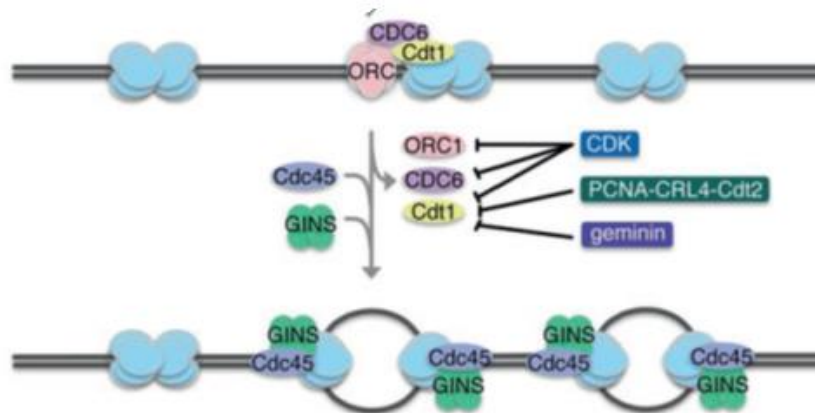
Iniciácia



CMG

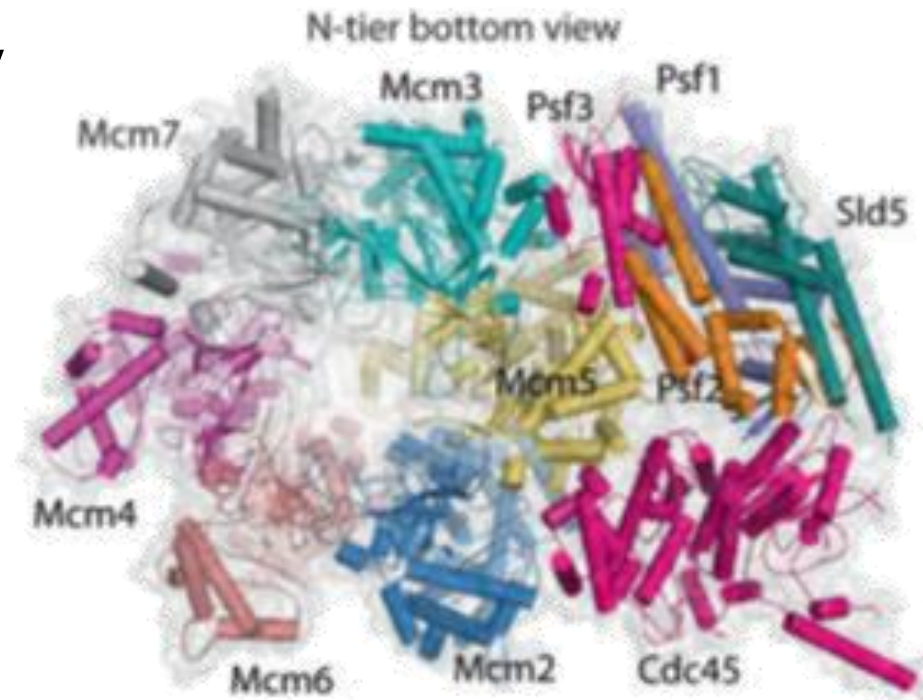
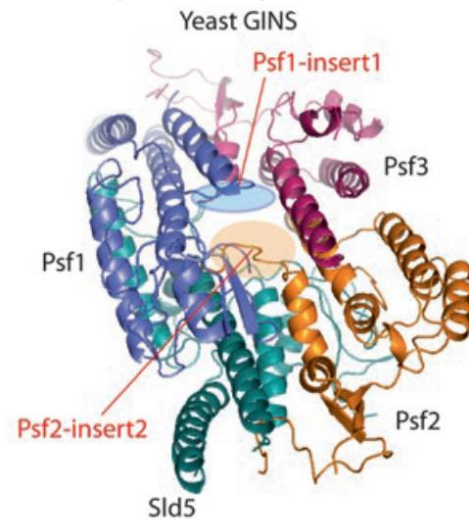
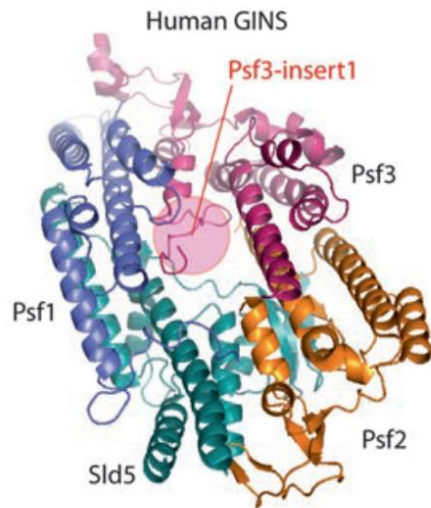
CMG obsahuje:

- MCM hexamer
- GINS komplex
- Cdc45
- Zloženie a aktiváciu CMG komplexu iniciujú dve kinázy, **CDK a DDK** v S-fázi
- Cdc45 a GINS sa viaže na MCM komplex na N-terminálnu doménu
- Helikázová aktivita na dsDNA
- Cdc45 a GINS spôsobuje:
 - Remodeláciu MCM dvojitého hexamru
 - Vyššiu affinitu MCM dvojitého hexameru k DNA
- CMG ostáva naviazaná na DNA až po termináciu replikácie
- Pri terminácii replikácie je CMG komplex ubikvitinylovaný



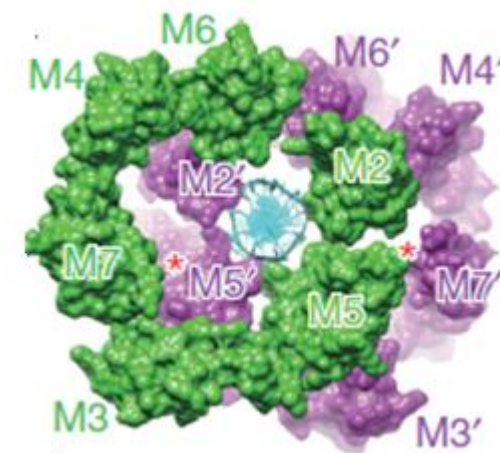
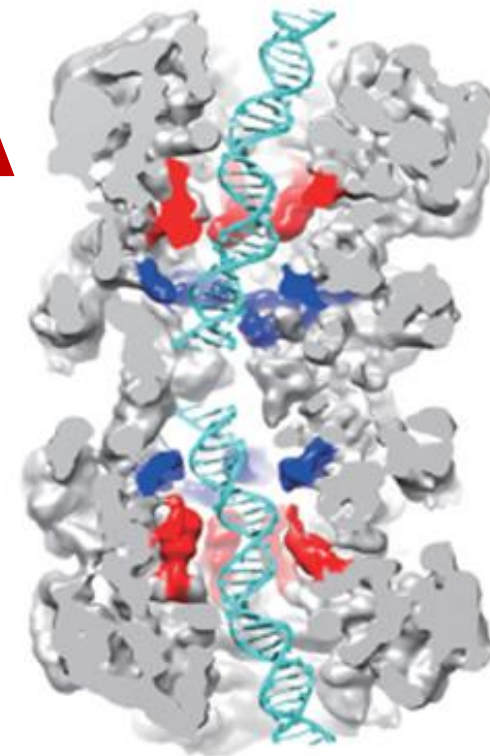
GINs

- Potrebný pre aktiváciu MCM komplexu
- Má centrálny pór, ale príliš malý pre ssDNA
- Slúži ako **scaffold** pre replizóm
- Interaguje s Mcm3/5 na N-koncoch a s Cdc45
- Rekrutuje ďalšie proteiny replizómu (napr. DNA Pol α , DNA Pol ϵ)
- GINs ani Cdc45 nemajú ATPázovú aktivitu
 - Aktivácia MCM2-7 komplexu pomocou zmeny štruktúry



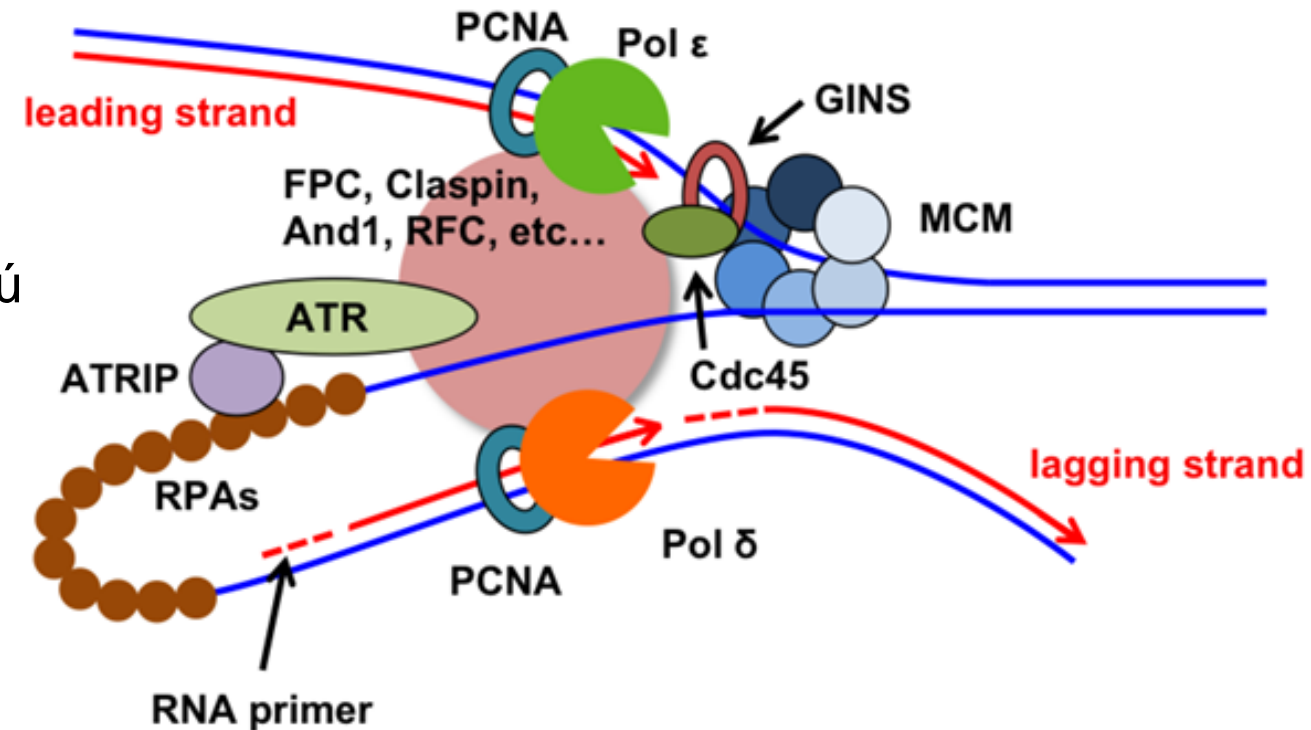
CMG – helikázová aktivita - HYPOTÉZA

- Veľkosť centrálného póru není jednotná – od 25 do 40Å
- **Kink** v centrálnom póru deformuje DNA
- Aktivácia MCM komplexu:
 - MCM komplex musí byť vo forme **dvojitého hexameru**
 - Cdc45 a GINS komplex
- Po aktivácii dvoch MCM komplexov sa C-terminálne domény a N-terminálne domény mierne pootočia a to spôsobuje ďalšiu deformáciu DNA
- Po aktivácii sa vytvorí otvor medzi Mcm2 a Mcm5 v oboch MCM komplexoch
- ds DNA → ss DNA
- ss DNA opúšťa komplex cez medzeru medzi Mcm2 a Mcm5



Elongácia

- **na vedúcom a opožďujúcom sa vlákne**
- 3 DNA polymerázy z 13 sa u eukaryot zúčastňujú replikácii
 - DNA **Pol α** , **Pol δ** , a **Pol ϵ**
- **CMG helikáza** rozplieťa dsDNA na dva ssDNA vlákna
- Na ssDNA nasadá **RPA**, ktorá ju chráni pred nukleázami a stabilizuje v ss forme
- Tvorba **RNA/DNA primerov** na templáte na oboch ssDNA vláknach pomocou komplexu **primázy** a Pol α
- DNA polymerázy predlžujú primery
- Primery sa vyštiepia, medzery sa dosyntetizujú
- **Ligáza** spojí ešte nespojené konce novo syntetizovaného reťazca
- **Topoizomerázy I a II** relaxujú DNA



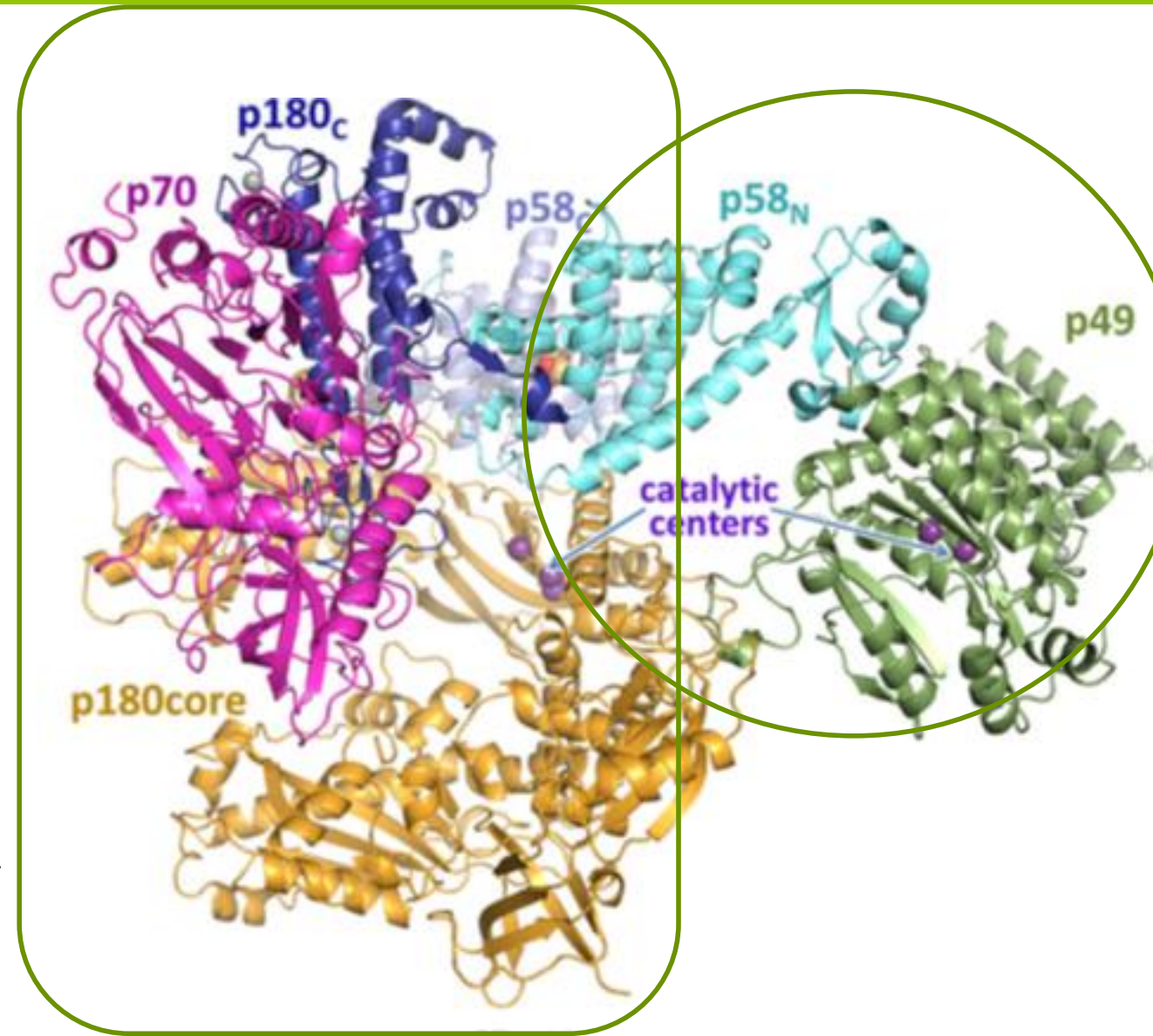
RPA

- Viaže ssDNA
- Zabraňuje tvorbe sekundárnych štruktúr ssDNA
- Chráni ssDNA pred endonukleázami
- Úloha v replikácii a v oprave DNA
- **Heterotrimer**
- Väzba na DNA pomocou šiestich **OB foldov**
- Viaže **Rf-C (specifita pre PCNA)**



DNA Pol α

- Nízka procesivita
- Bez proofreadingovej aktivity
 - Nemá 3'-5' exonukleázovú aktivitu
- Pol α asociovaná s **primázou**, s ktorou tvorí heterotetramerický komplex
- Inicializuje syntézu DNA na oboch reťazcoch
- Pre svoje fungovanie potrebuje CMG helikázu a RPA
- Na CMG helikázu sa Pol α naviaže pomocou **Ctf4 homotrimeru (scaffold)**, ktorý je v kontakte s GINS podkomplexom CMG helikázy



Pol α a primáza - štruktúra

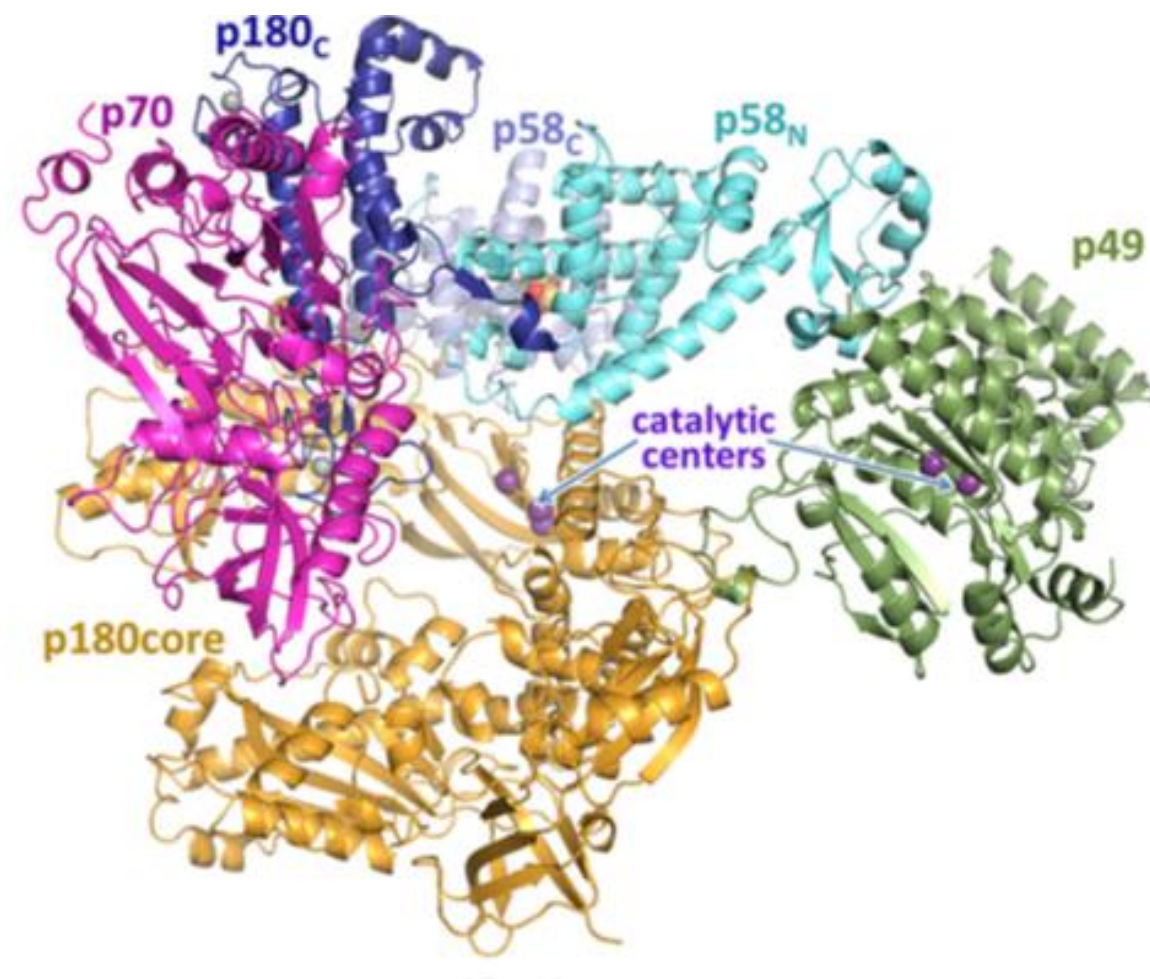
- **Primázový pokomplex:**

- Pri1 (katalytická) a Pri2 (kvasinky), **p49** (**katalytická**) a **p58** (človek)
- Vytvorí 2-10 nukleotidov dlhý **RNA primer** na tempátovej DNA

- **Polymerázový podkomplex:**

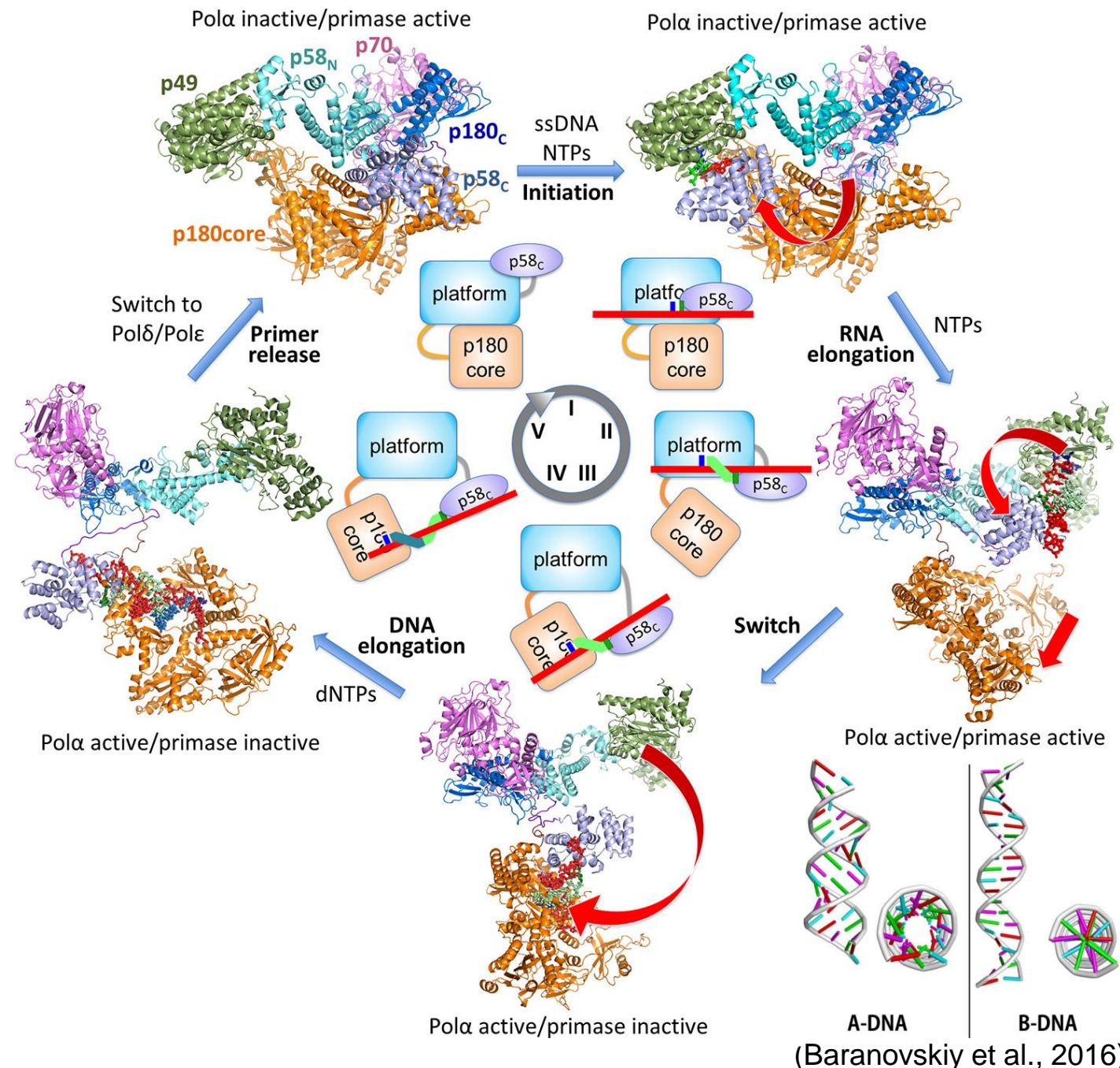
- Pol1 (katalytická) a Pol12 (kvasinky), **p180** (**katalytická**) a **p70** (človek)
- Predĺži RNA primer vytvorený primázovým komplexom na 30 nukleotidov dlhý RNA-DNA hybridný primer

- **Flexibilné linkery** pre konformačné zmeny

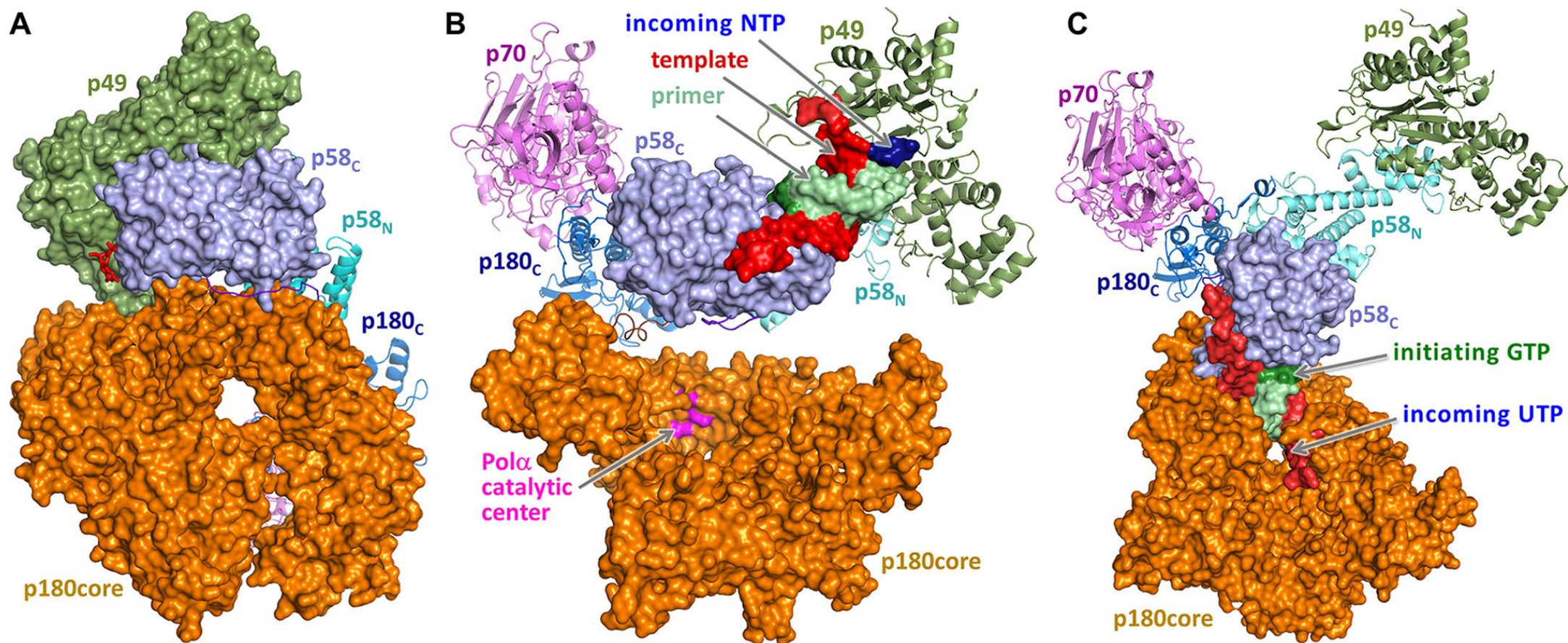


Príprava primerov

1. Ako prvé sa **p58C** priblíži k **p49** a iniciuje sa syntéza RNA primeru
 2. Pri elongácii RNA primeru **p58C** pohybujúci sa spolu s RNA primerom vytlačí **p180**
 3. Keď dĺžka primeru dosiahne 9nk **p58** inhibuje **p49**
 4. Takto vytlačená **p180** je v takej pozícii, že sa môže naviazať na 9nk dlhý RNA primer
 5. Pol α predĺži primer
 6. Keď primer dosiahne dĺžku cca. 30nk, Pol α sa vymení za Pol δ alebo Pol ϵ
- Pol α špecificky rozpoznáva RNA/DNA komplex vytvorený primázou a začne polymerizovať RNA primer pridávaním dNTP.
 - Po nasyntetizovaní určitej dĺžky DNA Pol α stratí kontakt s RNA/DNA A-šróbovicou a uvoľní sa z DNA

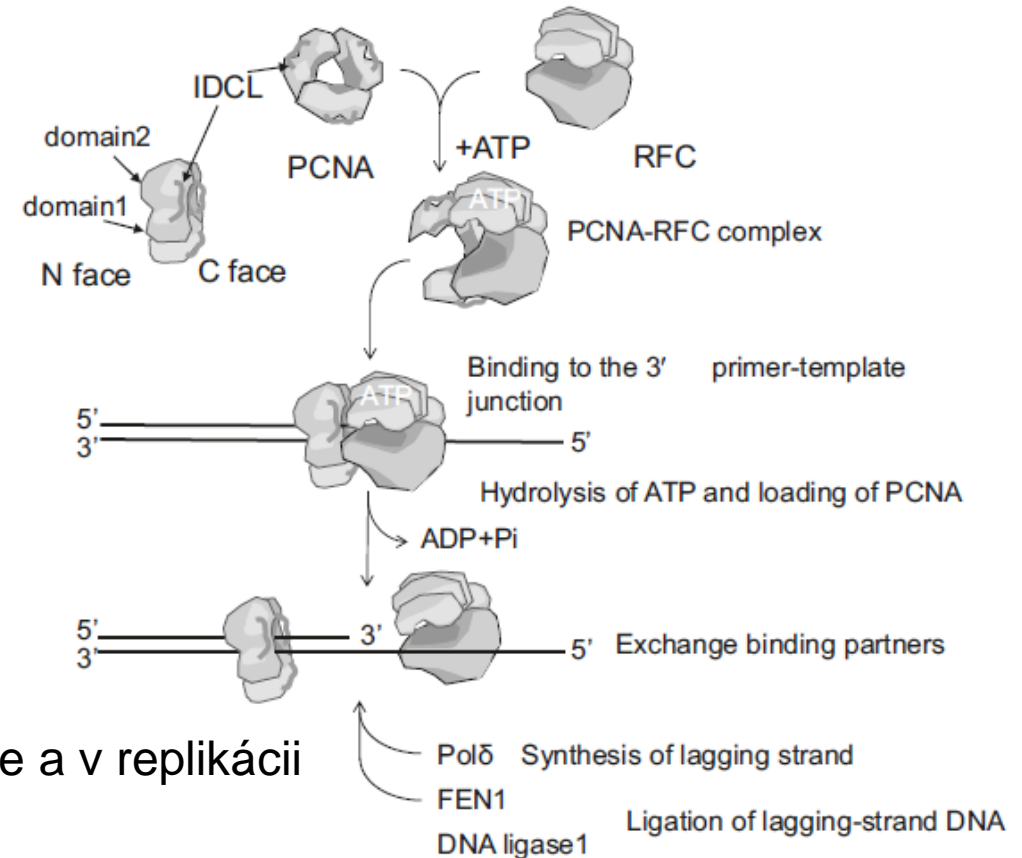


Príprava primerov



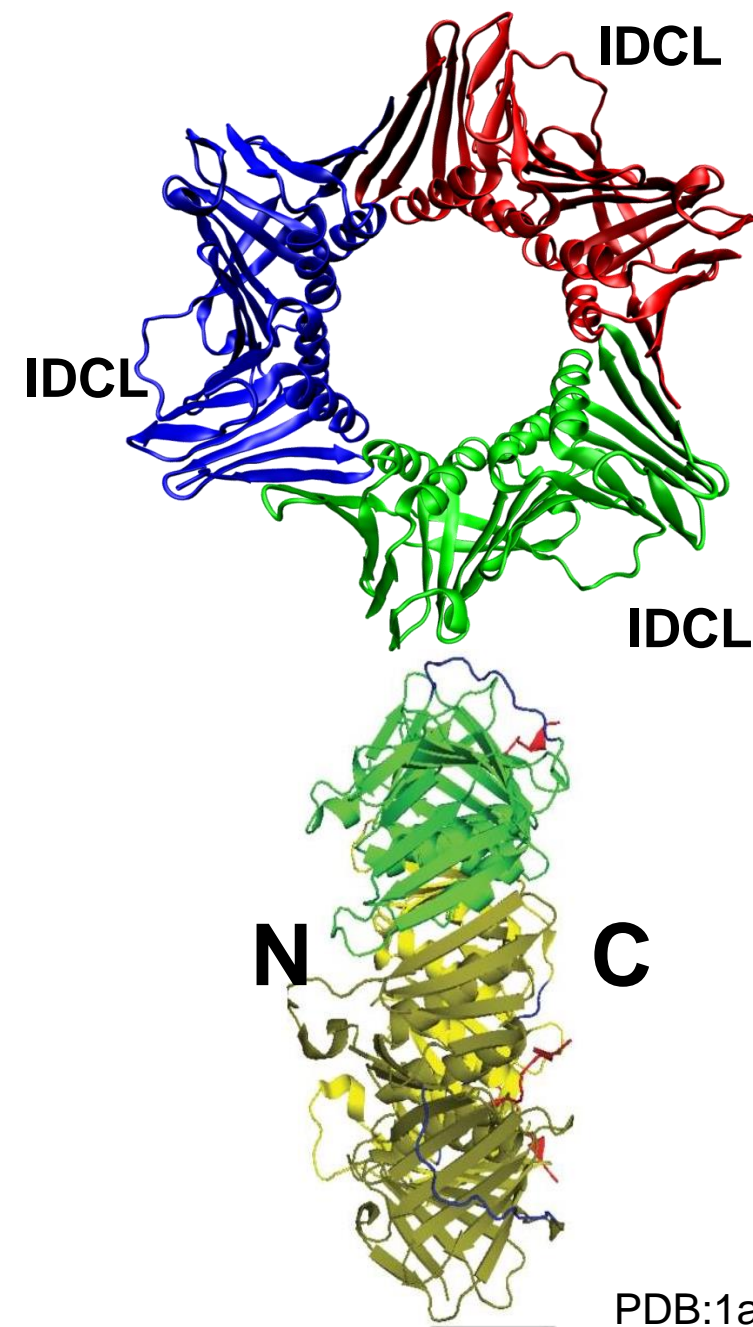
PCNA

- Proliferačný antigen bunecného jadra
- **PCNA a Rf-C** (R_eplikačný f_aktor C) objavené ako esenciálne proteiny pre replikáciu SV40 v ľudských bunkách
- **Rf-C** je potrebný k uchyteniu PCNA k DNA
 - ATPázová aktivita – AAA+ ATPáza
 - 1 veľká (RFC1) a 4 malé podjednotky (RFC2-5)
 - Rozpoznáva 3' koniec primeru
 - Spôsobuje konformačnú zmenu PCNA
 - otvára jej kruhovú formu za hydrolýzy ATP
- PCNA je **konzervovaná** od archaea až po eukaryota
- Úloha v oprave DNA, v kontrole bunecného cyklu, v epigenetike a v replikácii
- **Kĺzavá svorka** na DNA
- **Scaffold** protein
- **Úloha v replikácii:**
 - Upevňuje polymerázu k DNA
 - Zabraňuje predčasné uvolnenie polymerázy z DNA
 - Esenciálna pre výmenu Pol α za Pol δ/ϵ
 - Výmena DNA polymeráz pri pozastavených replikačných vidlíc
- PCNA je z chromozómu odstránený na začiatku G2 fáze pomocou **ELG1-Rf-C**



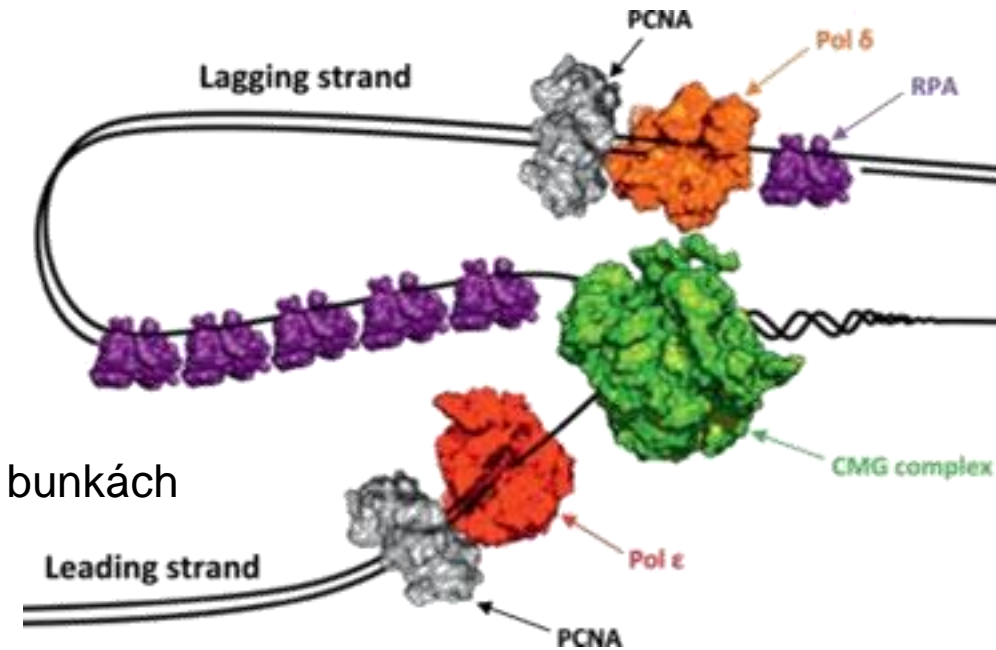
PCNA

- Homotrimer
- Každá podjednotka má **IDCL** (Inter-domain connecting loop)
 - Potrebný pre väzbu interakčných partnerov (Pol δ , p21, DNA ligáza ...)
- **C-terminálna časť**: interakcia s Pol ϵ , Rf-C, ...
- **Vnútoraná časť**: pozitívne nabitú šroubovice – kontakt s DNA
- **PIP box** (PCNA interacting peptide):
 - Q-X-X- Ψ -X-X- Θ - Θ
 - Motív interagujúci s PCNA IDCL
 - Obsahujú ho proteiny interagujúce s PCNA
 - DNA polymerázy, Dnmt1, p21, Fen1, DNA ligáza...
- **APIM** (AlkB homologue 2 PCNA interacting motif)
 - Proteiny zúčatňujúce sa opravy DNA
- **PCNA kód**
 - Posttranslačné modifikácie PCNA určujúce vazebných partnerov a funkciu PCNA



DNA polymerázy ϵ a δ

- **Aktivita:**
 - 5'-3' DNA polymerázová
 - 3'-5' exonukleázová
 - Mutácie v exonukleázovej doméne polymeráz nájdené v nádorových bunkách
- Po DNA putuje pomocou PCNA
- **Výmena polymerázy** α za δ alebo ϵ po syntéze primeru
 - Pol α má afinitu k A-helixu RNA/DNA a z B-helixu DNA/DNA disociuje
 - Rf-C loaduje PCNA na koniec primeru a na PCNA sa naviaže Pol δ alebo ϵ
- Pol δ syntetizuje opožďujúci sa reťazec
- Pol ϵ syntetizuje vedúci reťazec
- Pol δ a Pol ϵ nemajú 5' - 3' exonukleázovú aktivitu, ktorou by vedeli vyštíepiť primery. Túto úlohu vykonáva **RNAza H1 a FEN-1**.
 - Polymerázy po tom medzery zaplnia
 - **DNA ligáza** zliguje nespojené konce

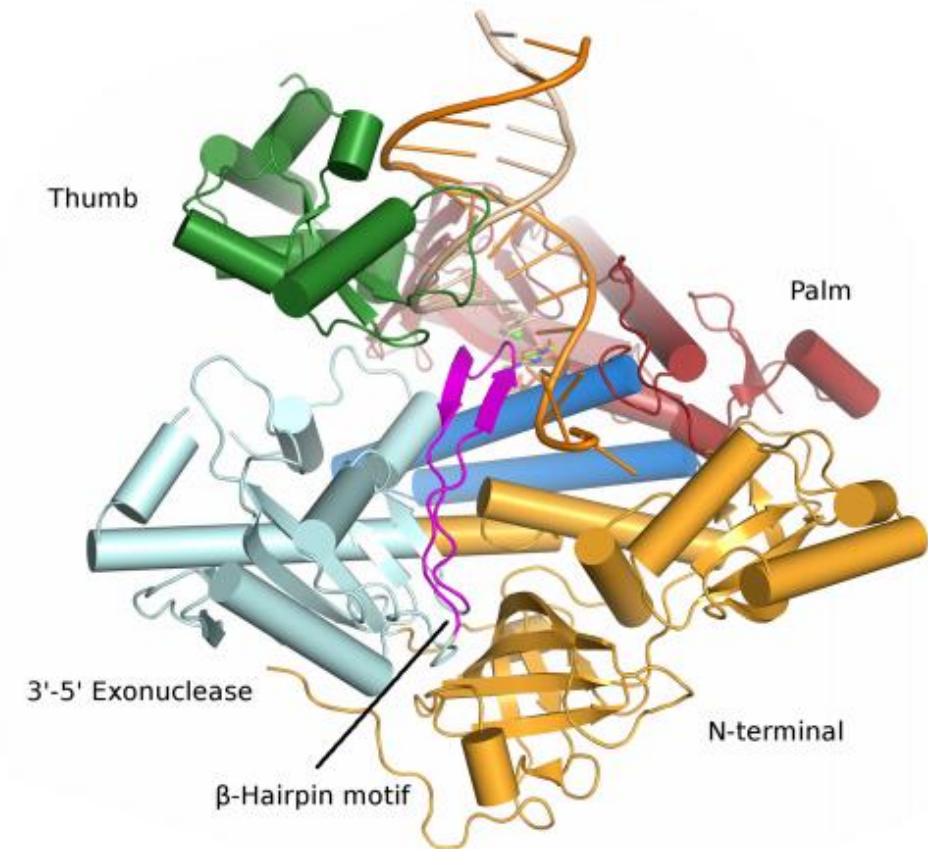


Pol δ



- Katalytická podjednotka polymeráz: tvar ľudskej ruky
- „Dlaň“ je vysoko konzervovaná – polymerázová aktivita
- „Palec“ drží DNA na mieste a zvyšuje procesivitu
- N-terminálna doména:
 - OB fold
 - ssDNA vazobná oblasť
 - RNA vazobná oblasť
- Veľký β -hairpin motív
 - Premiestňuje DNA z polymerázovej časti do exonukleázovej
- Exonukleázová doména: 3´-5´proofreading
 - Oprava chýb pri replikácii
 - Maturácia Okazakiho fragmentov
- Syntetizuje DNA na opožďujúcom sa reťazci až po ďalší primer (vytvorený DNA Pol α)

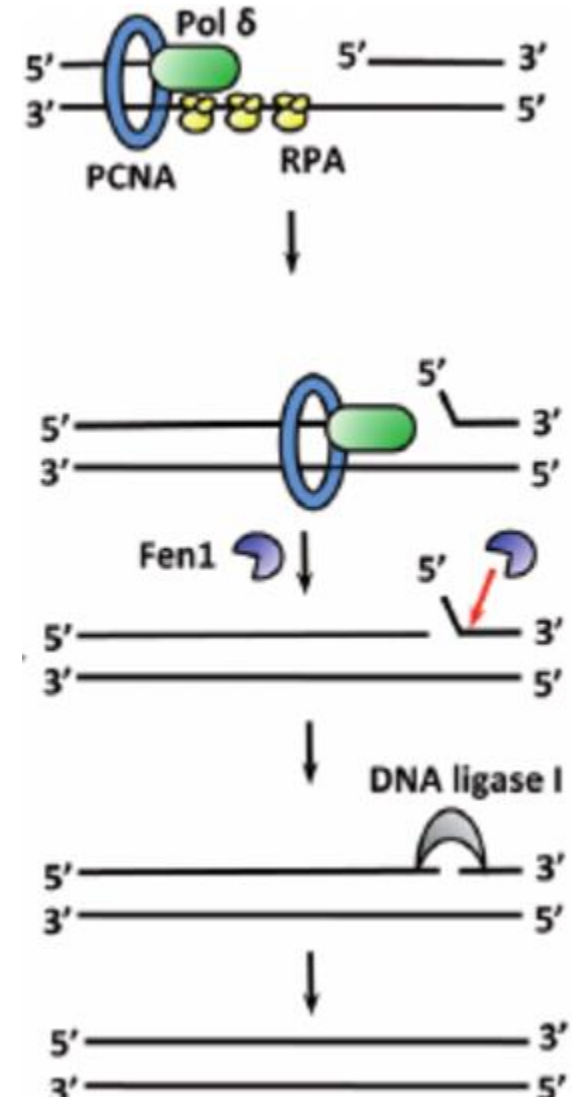
Katalytická podjednotka Pol δ



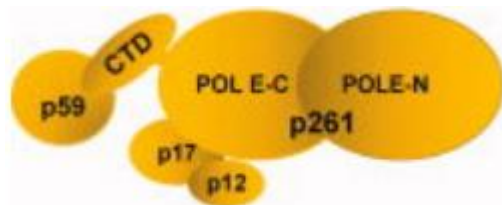
Pol δ



- Syntetizuje DNA na opožďujúcom sa reťazci až po ďalší primer (vytvorený DNA Pol α)
- Po strete s ďalším primerom dosyntetizuje ešte pár nukleotidov a vytesní kus RNA primeru
- Vyčnievajúci 5' koniec RNA primeru je po tom rozpoznaný Fen1 nukleázou, ktorá vyštíepi RNA primer
- DNA ligáza spojí Okazakiho fragmenty

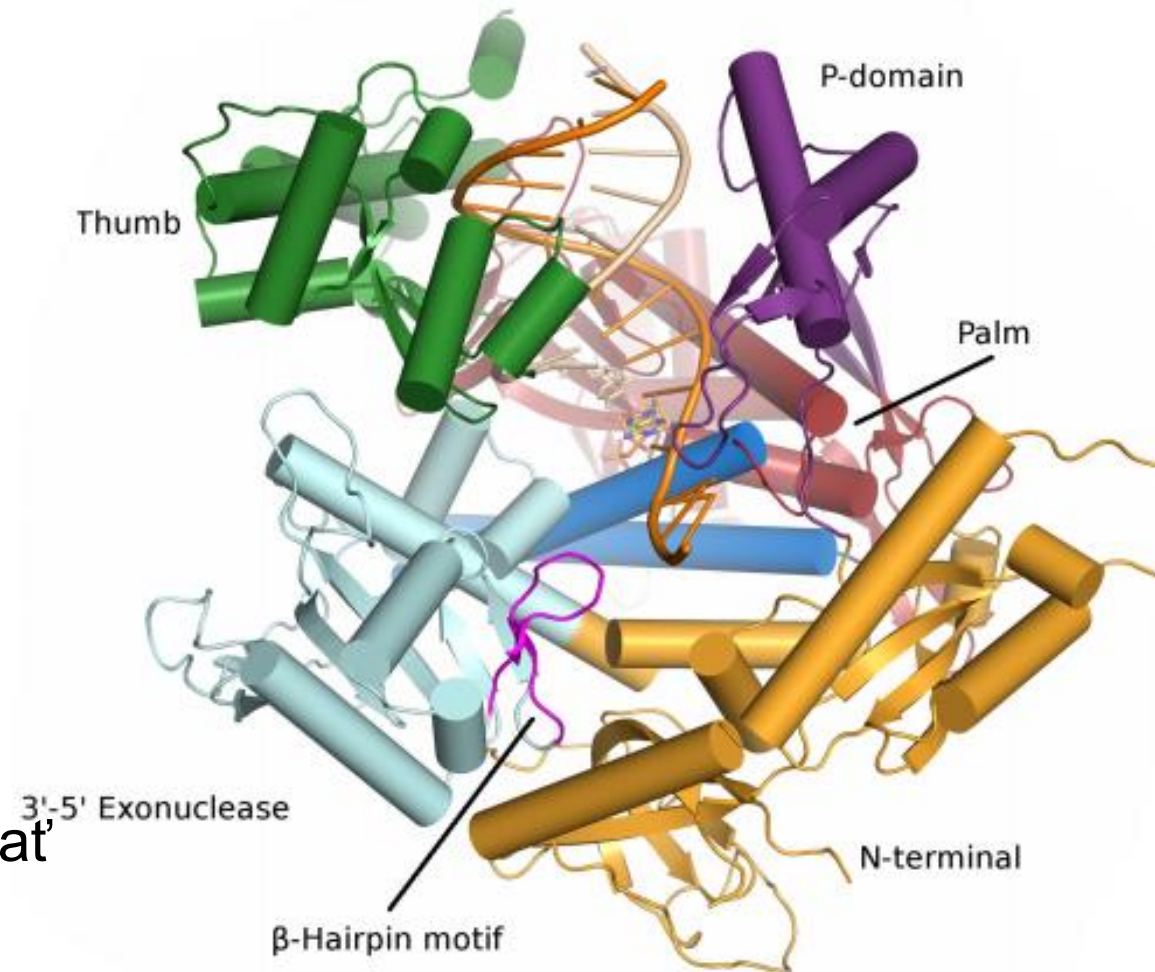


Polε



- Objavená v 1990 ako tretia DNA polymeráza esenciálna pre replikáciu *S. cerevisiae*
- Dvojnásobná veľkosť oproti Polδ
- Najväčšia podjednotka (**p261**) obsahuje
 - **Katalytickú N-koncovú časť**
 - **C-koncovú časť bez katalytickej aktivity** pre protein-proteinové interakcie
- Pre svoju aktivitu nepotrebuje PCNA
 - „Dlaň“ Polε(380aa) je omnoho väčšia ako u Polα(175aa) alebo Polδ(203aa)
- **P-doména:** zvyšuje procesivitu
- **β hairpin je príliš malý** – nedokáže kontaktovať DNA ako u Polδ a prenášať ju na exonukleázovú časť
 - Jeho úlohu zastáva P-doména???

Katalytická podjednotka Polε



Terminácia

- Keď sa 2 replikačné vidlice stretnú
- Na konci S-fáze, ale v skutočnosti sa replikony terminujú v priebehu S-fáze
- Veľkosť replikonu: 31kbp, rýchlosť replikačnej vidlice: 1,5 kbp/min
 - za 10 minút od začiatku replikácie sa dva replikačné vidlice stretnú a dojde k terminácii replikácie
- **RFB**(replication fork barrier):
 - Špecifické miesta genomu, ktoré dokážu zastaviť replikačnú vidlicu
 - Pri replikácii rDNA
- ORC sa na konci S-fáze disociuje z komplexu (okrem *S.cerevisiae*)
- Odstránenie CMG:
 - Mcm7 je polyubikvitovaný na K48.
 - Cdc48 rozpozná polyubikvitovaný CMG komplex a oddelí ho od chromatinu
- PCNA je z chromozómu odstránený na začiatku G2 fáze pomocou ELG1-Rf-C

Ďakujem za pozornosť

