

Proteínové komplexy v DNA replikácii

CG030 Struktura a funkce proteinových komplexů

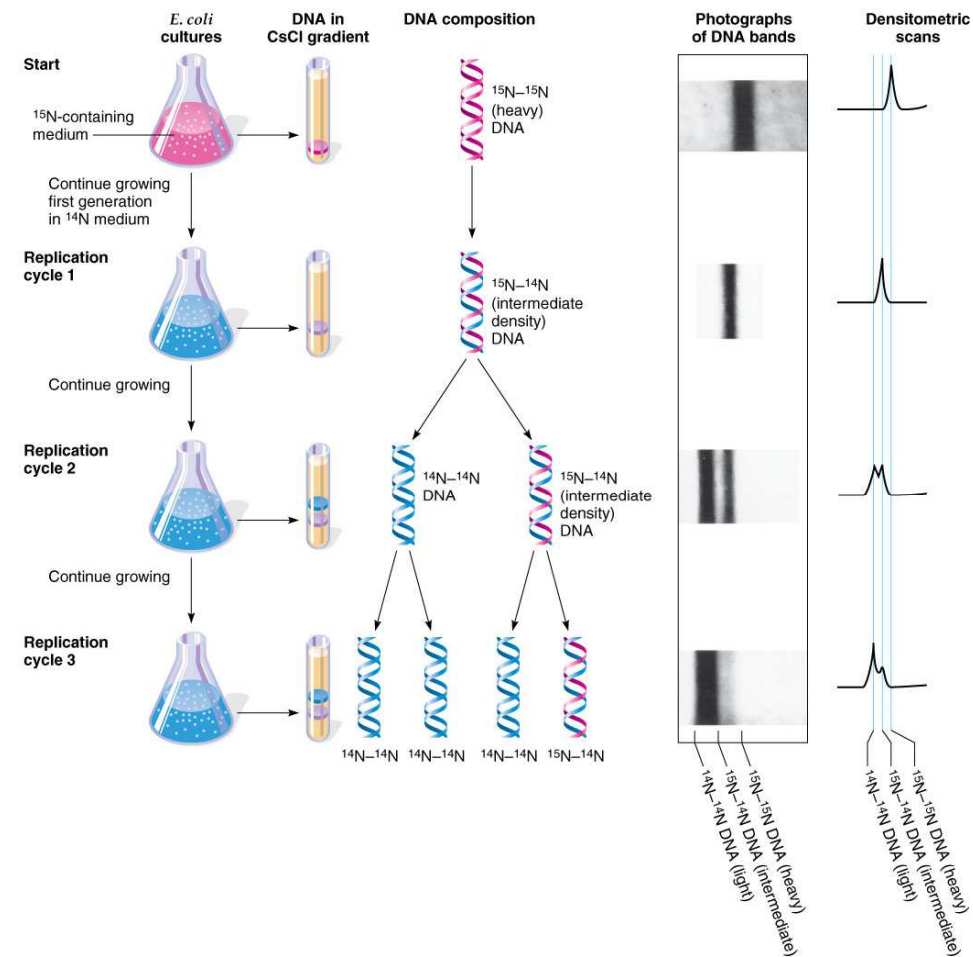
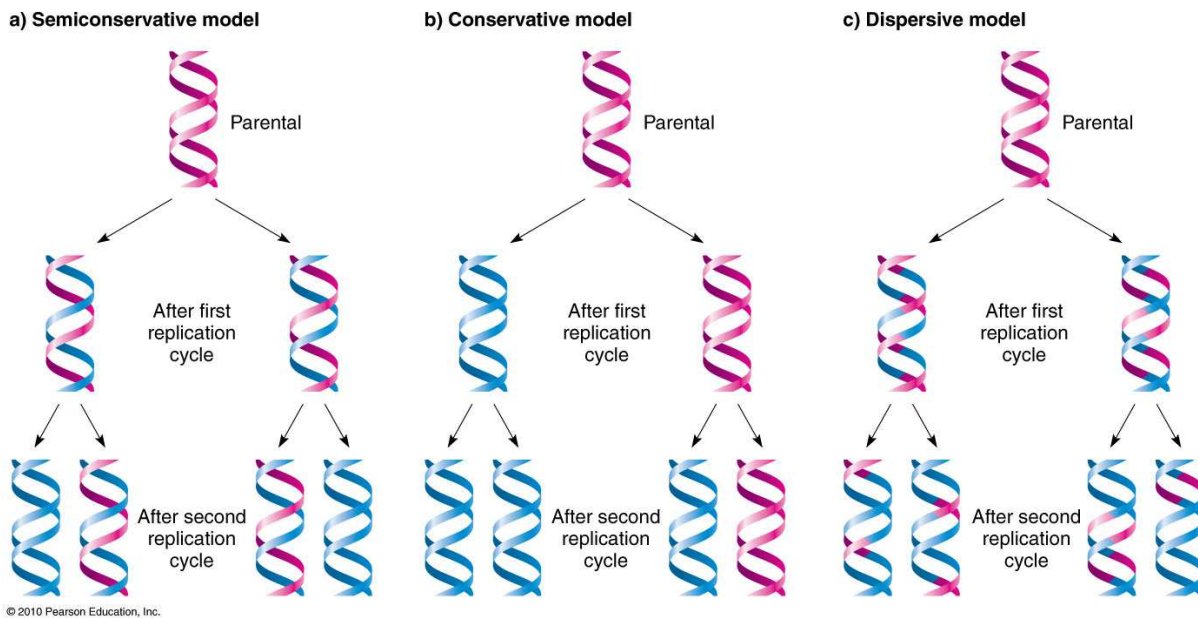
Barbora Štefanovie, Ph.D.

31.3.2022

- Mechanizmy DNA replikácie sú vysoko konzervované
- Replikácia DNA je **semikonzervatívna**

(Watson and Crick, 1953, Nature)

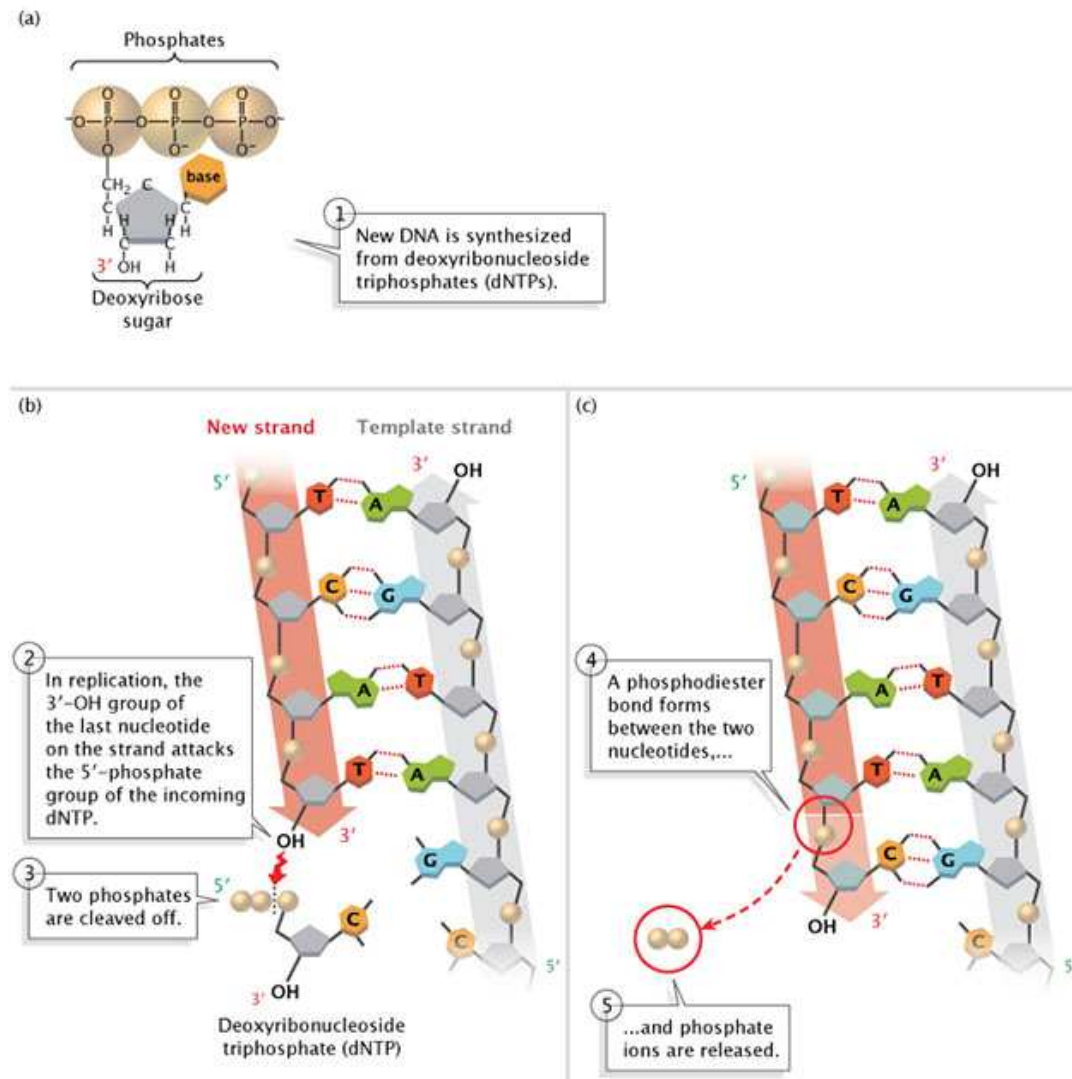
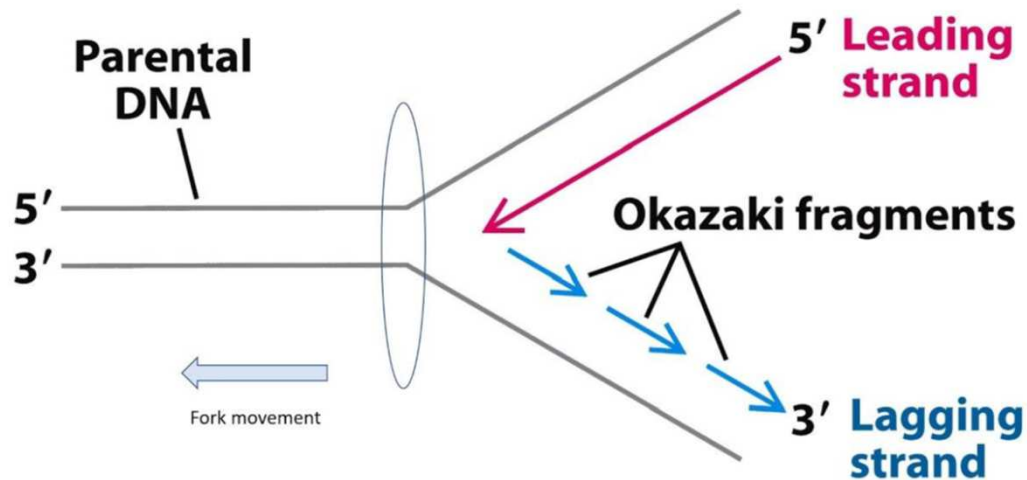
(Meselson and Stahl, 1958, Nature)



DNA replikácia 5' → 3'

- kontinuálna vs. diskontinuálna replikácia (leading vs lagging strand)
- Okazakiho fragmenty

(Okazaki et al, 1968, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.)



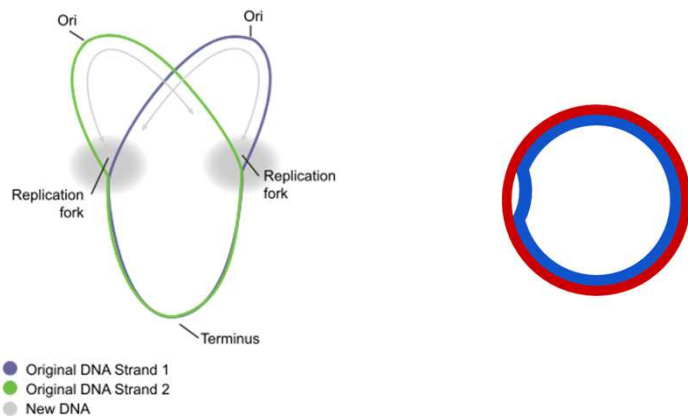
DNA replikácia v číslach

Prokaryota (**E.coli**)

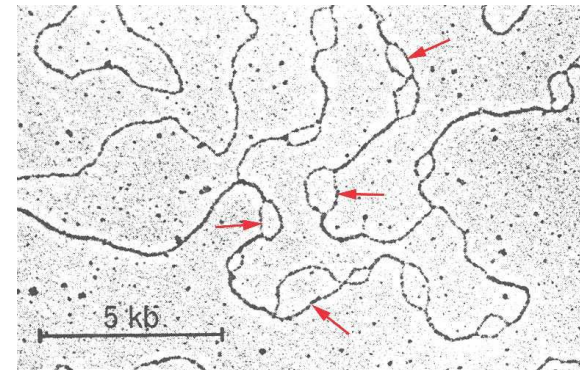
- Genóm 4.5×10^6 bp
- Presnosť 10^{-9} - 10^{-11} errors/bp
- Rýchlosť ~ 60 kb/min
- Počiatok replikácie: 1
- 30 min/celý genóm

Eukaryota (**človek**)

- Genóm 3×10^9 bp (700 x väčší)
- Presnosť 10^{-6} errors/bp
- Rýchlosť ~ 1 -2 kb/min
- Počiatok replikácie: 30000-50000/b.cyklus
- 8h/celý genóm



Figures from: [Daniel Yuen at David Tribe Derivatives](#) and [Catherinea228](#)



Dr. B. Fristensky and N. Brien, <https://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/l12/l12.html>

Fáze DNA replikácie

1. iniciácia

- začiatok už v M/G1 (licensing), rozpletenie dvojšroubovice DNA, vznik replikačnej vidlice a naviazanie enzymatického komplexu

2. elongácia

- pridávanie nukleotidov a postup replikačnej vidlice

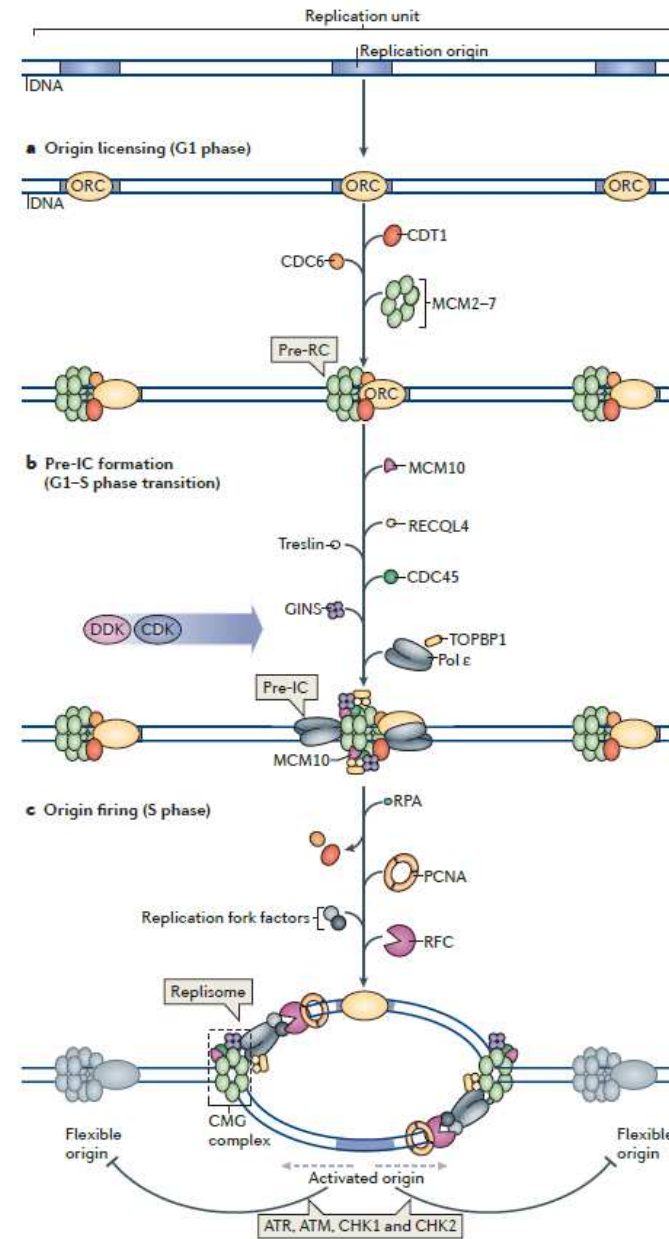
(topologický stres, ťažko replikovatelné lokusy, proteíny na DNA, transkripcia, poškodená DNA)

3. terminácia

- ukončenie replikácie

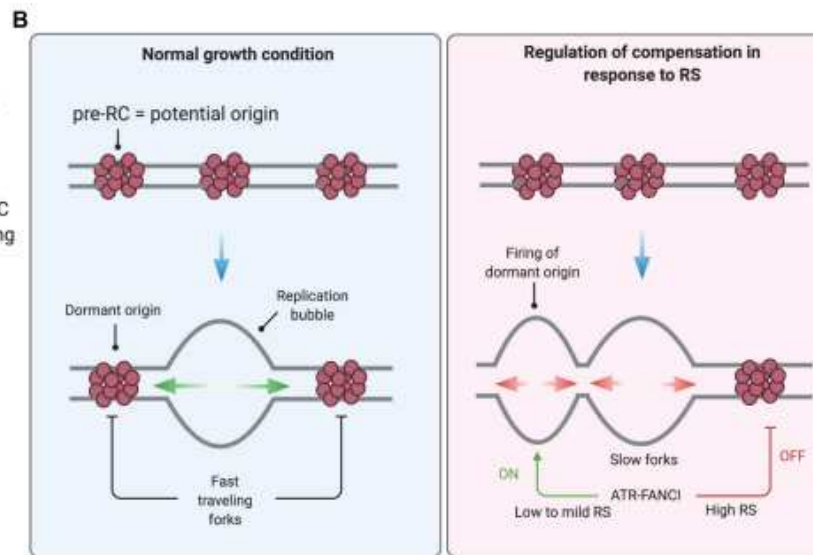
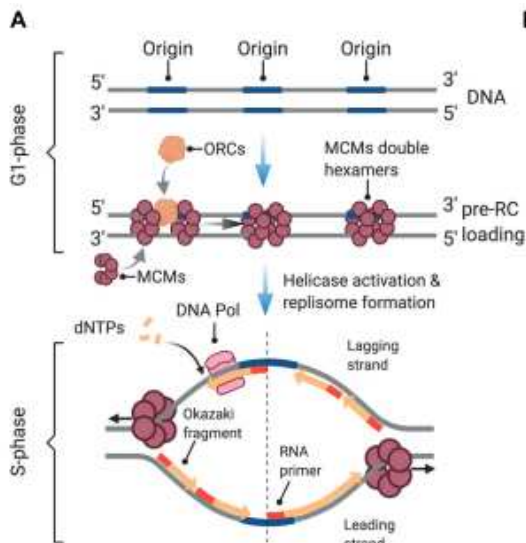
Proteínové komplexy v DNA replikácii

- ORC1-6
- MCM2-7 helikáza
- pre-RC –ORC1-6, CDC6, CDT1, MCM2-7
- pre-IC –MCM2-7, DDK, CDKs, TOPBP1, GINS, CDC45, Treslin
- Replizóm –primáza, polymerázy, RPA, PCNA, RFC
- Histon remodelačné komplexy
- Chromatin remodelačné komplexy



Origin licencing /Origin firing

- koniec M fáze a G1 fáza
- kvasinky –ARS, niekoľko stoviek počiatkov
- vyššie eukaryota –DNA topológia, štruktúra a prostredie chromatinu, desiatky tisíc počiatkov
- ORC –konzervovaný, zabezpečuje väzbu MCM2-7 helikázy do počiatkov replikácie
- MCM2-7 helikáza v neaktívnej forme (dvojitý hexamér) = origin licencing
- aktivovaných len 10-20% (cicavce) MCM2-7 = origin firing



Técher and Pasero_2021_Cell

- **Origin licencing** = označenie všetkých potenciálnych počiatkov
- **Origin firing** = výber aktívnych počiatkov, na ktorých dôjde k vytvoreniu replikačnej vidlice a následnej syntéze DNA
- ostatné počiatky –backup pre prípad spomalenia alebo zastavenia susedných replikačných vidlíc (replikačný stres, poškodenie, transkripcia, ťažko replikovateľné lókusy,...)
- mechanizmy, ktoré zabraňujú nedostatočnej alebo naopak nadmernej DNA replikácii

Počiatky replikácie

- **ARS** Autonomously Replicating Sequences
- v kvasinkách *S.cerevisiae* a príbuzných druhoch *Saccharomycotina*
- miesta, do ktorých sa viaže ORC (pomocou WH domén a AT hookov)
- 100-200 bp
- A element (11 bp) vysoko konzervovaný 5' T/A T T T A Y R T T T T/A 3' (Y –pyrimidín, R-purín)

Vyššie eukaryota –konzervovanosť sa vytratila

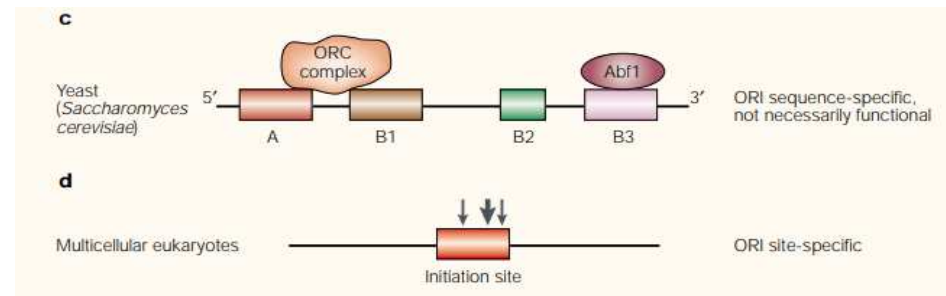
- bohaté na A/T –ľahká väzba proteínov (narušenie vodíkových väzieb), rozhoduje epigenetika
- G-kvadruplexy, počiatky transkripcie, DNÁza-hypersenzitívne oblasti

- **Early replicating regions:**

H3K4me1/2/3, H3K9ac, H3K18ac, H3K36me3, a H3K27ac
euchromatin

- **Late replicating regions:**

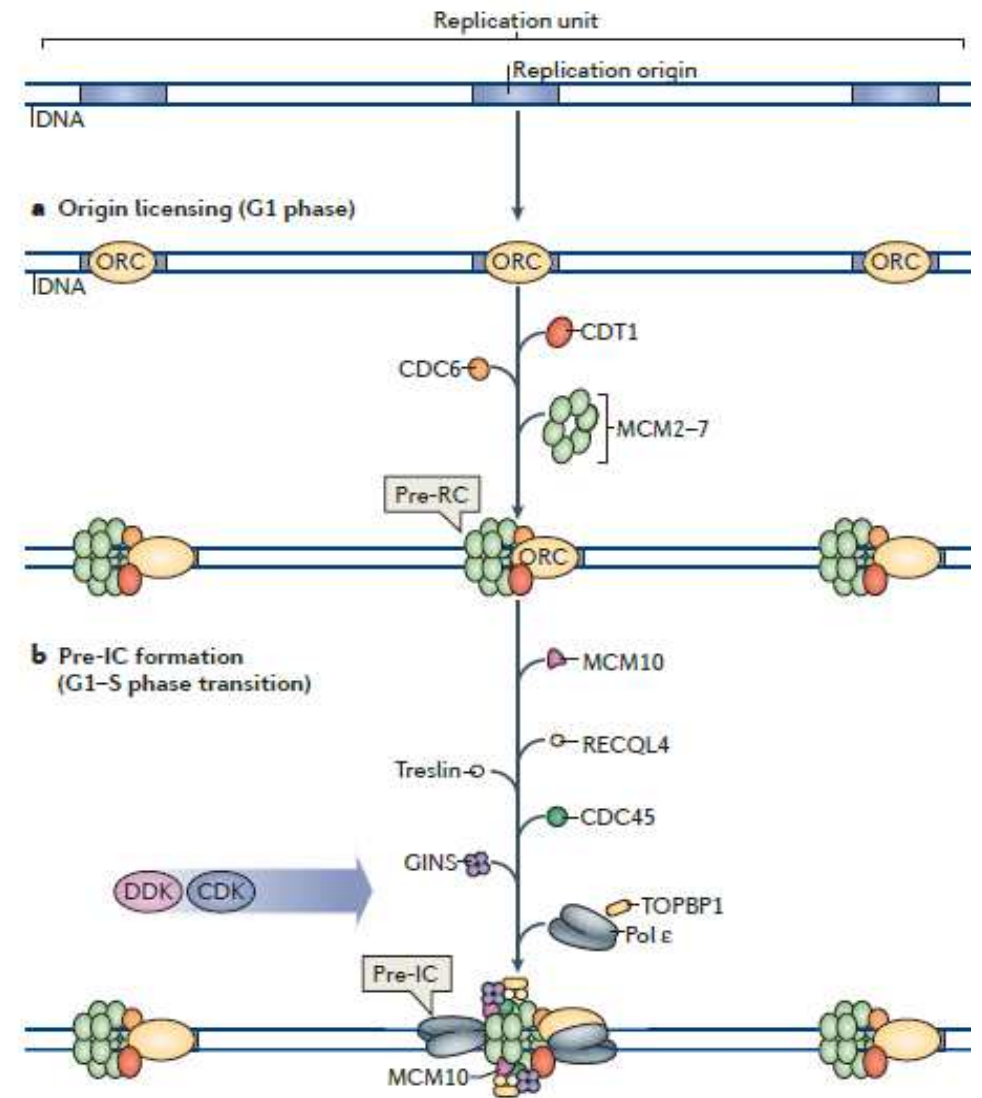
H3 a H4 hypoacetylácia, H3K9 a H3K27 metylácia
často tkanivovo-špecifické



Méchalí, 2001_NatRev_Genetics

Iniciácia

1. naviazanie MCM2-7 helikázy vo forme dvojitého hexaméru na DNA označenú pomocou ORC (origin recognition complex)
2. naviazanie ďalších pomocných faktorov a vytvorenie preiniciačného komplexu (pre-IC)
3. preskupenie MCM komplexu (inaktívna/aktívna helikáza)
4. „priming“ DNA replikácie



ORC Origin Recognition Complex

- viaže sa na DNA v počiatkoch replikácie, remodeluje DNA, rekrutuje Cdc6 a MCM2-7 helikázu na DNA

- ATPáza (AAA+ rodina)

ORC1-5 - pentamérny kruh

- evolučne príbuzné

- AAA+ modul, C-term. HTH doména (WH, prvý kontakt s DNA)

- otvorená (aktívna) vs. uzavretá (auto-inhibovaná) konfigurácia

- ORC1 BAH doména (viaže sa na H4K20me2 = esenciálna interakcia pre asociáciu s chromatinom)

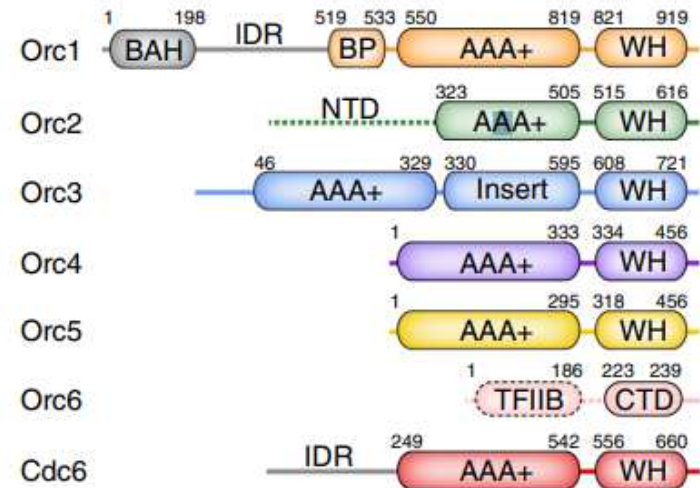
ORC6

- odlišný pôvod, viaže sa na okraj pentaméru -interakcia s ORC3

-DNA sa viaže do centra pentaméru a dochádza k jej ohybu

→rekrutovanie MCM2-7

Domain architecture of DmORC subunits and Cdc6



upravené zo Schmidt and Bleichert_ 2020_NatComm

BAH = bromo-adjacent homology domain

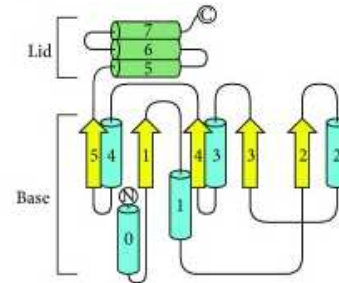
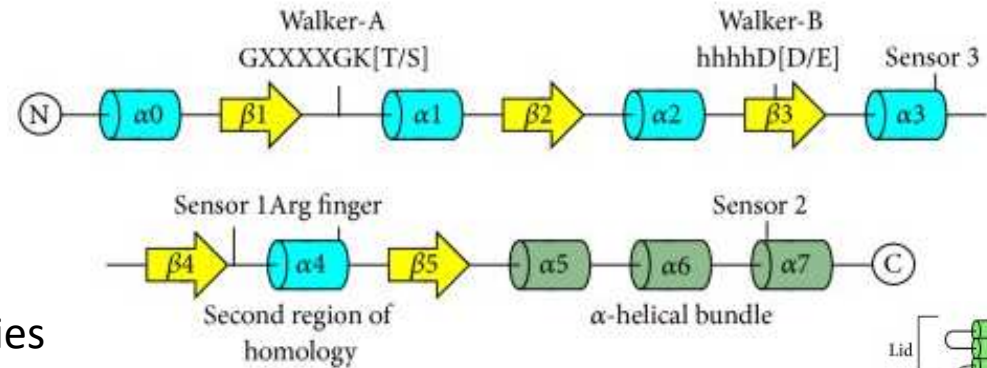
IDR = intrinsically disordered region

BP = basic patch

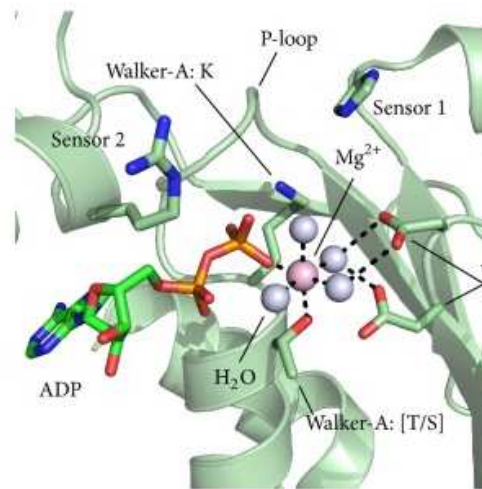
TFIIB = transcription factor IIB-like domain

AAA+ modul

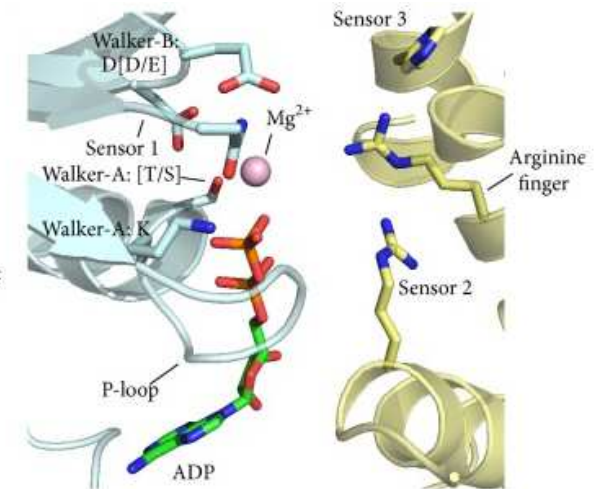
- ATPases Associated with diverse cellular Activities
- proteinová rodina, spoločný konzervovaný modul cca 230 aa
- využívajú chemickú energiu z hydrolýzy ATP ku konformačným zmenám, ktoré následne pôsobia jako mechanická sila na iné makromolekulárne substráty
- translokázy, helikázy,...
- Walker A -GXXXXGK[T/S]
- Walker B -hhhhD[D/E], h = hydrofóbná aa
- SRH = second region of homology
- Sensor 1, AF (Arginine Finger) –hydrolýza ATP
- Sensor 2 a 3



Pyrobaculum aerophilum



(b) Cdc6: ADP:Mg²⁺ (PDB: 1FNN)

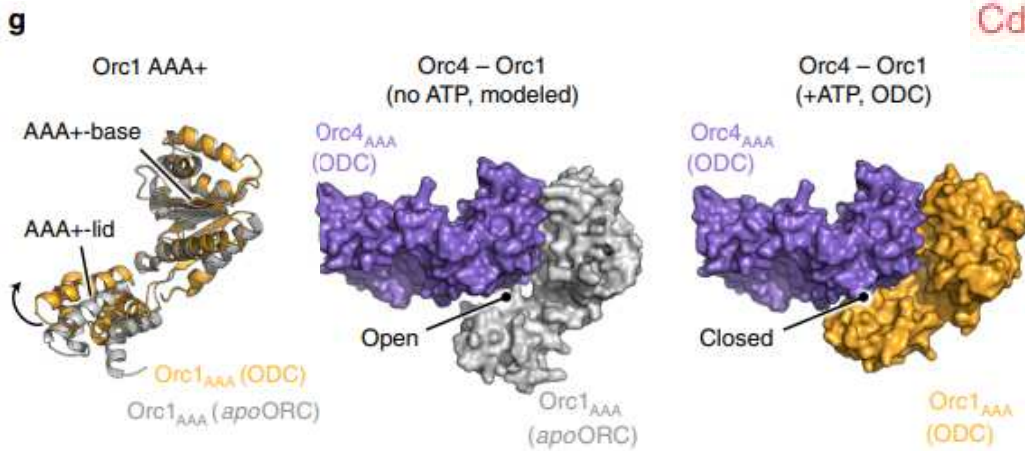
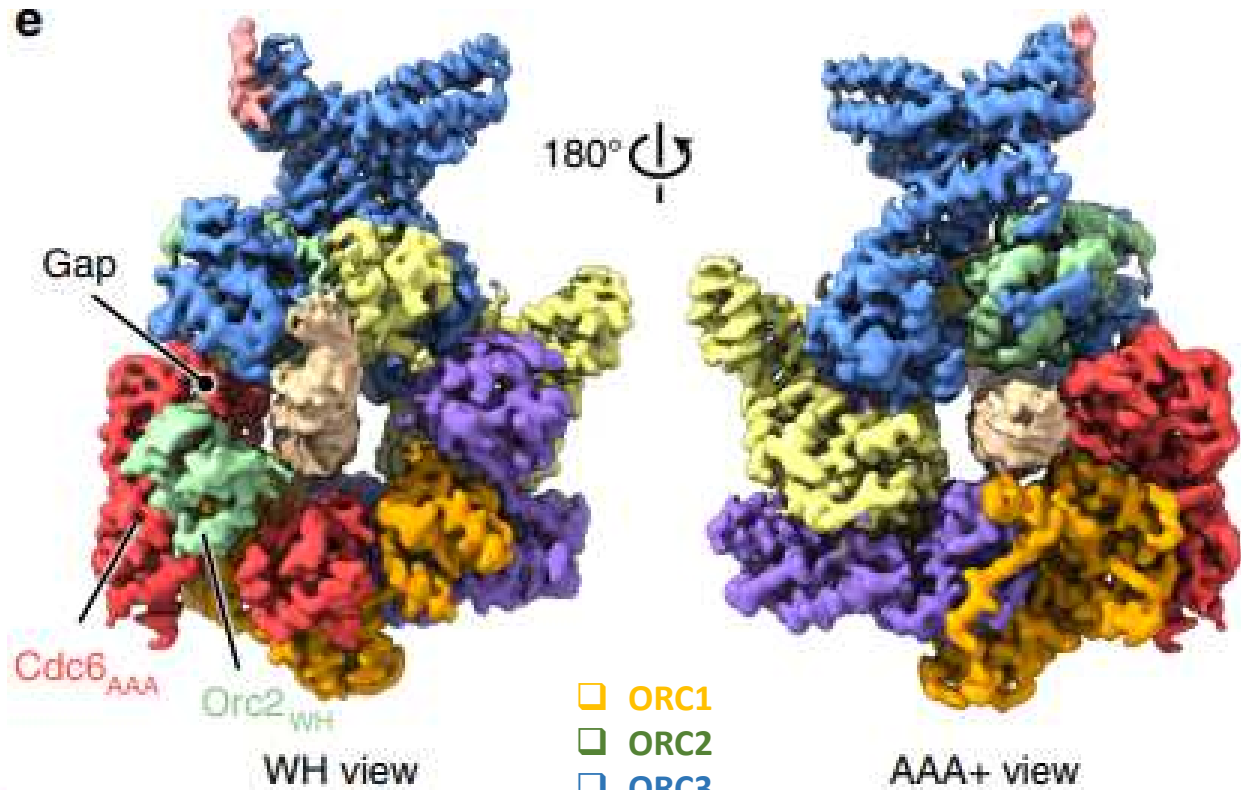
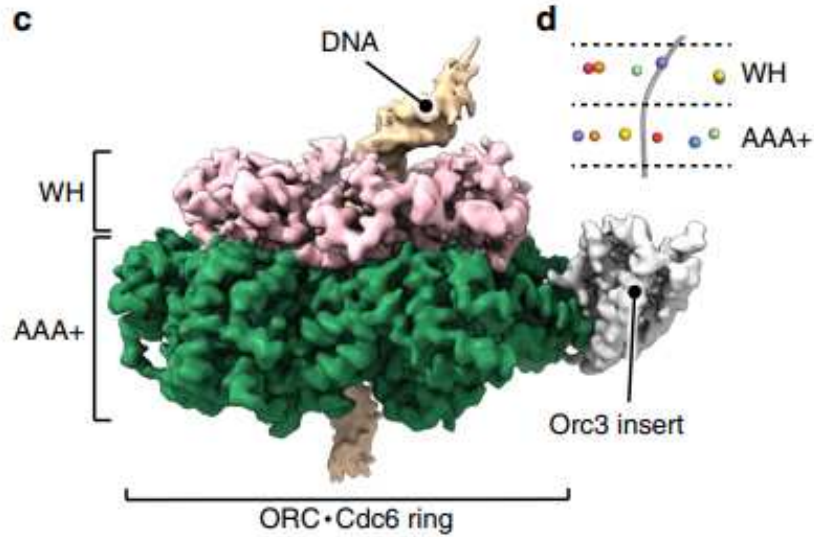


(c) MCM: ADP:Mg²⁺ (PDB: 4R7Y)

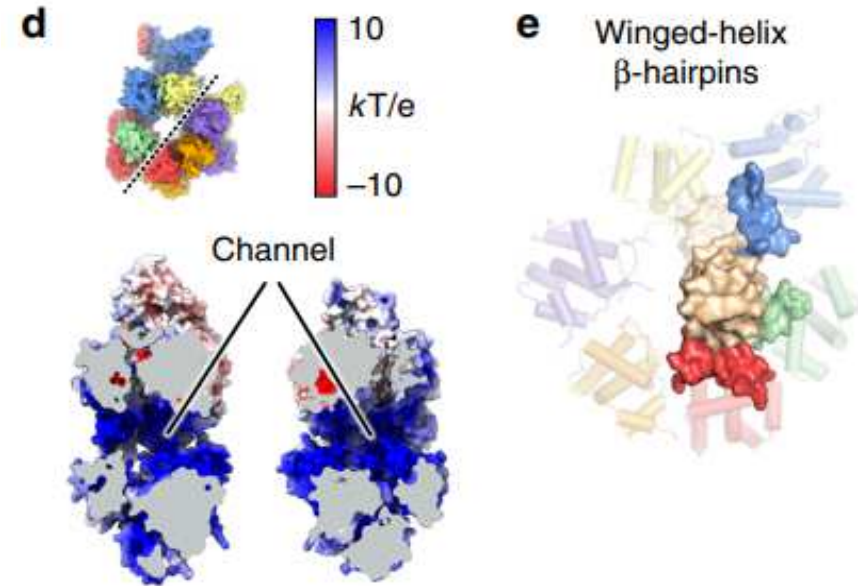
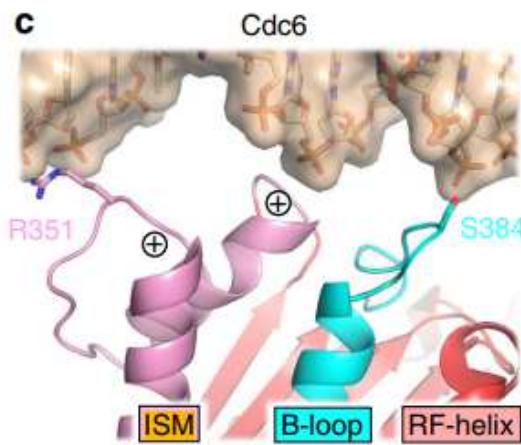
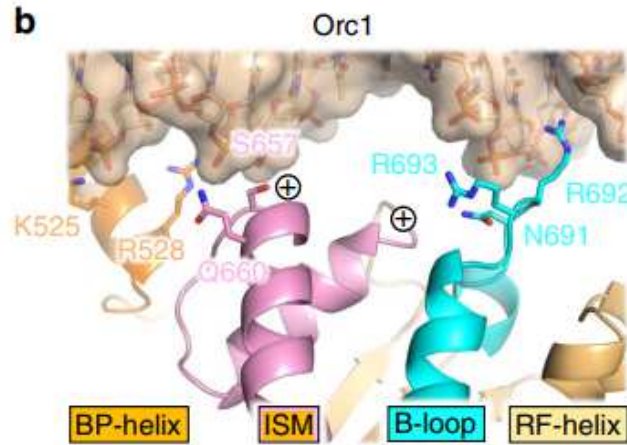
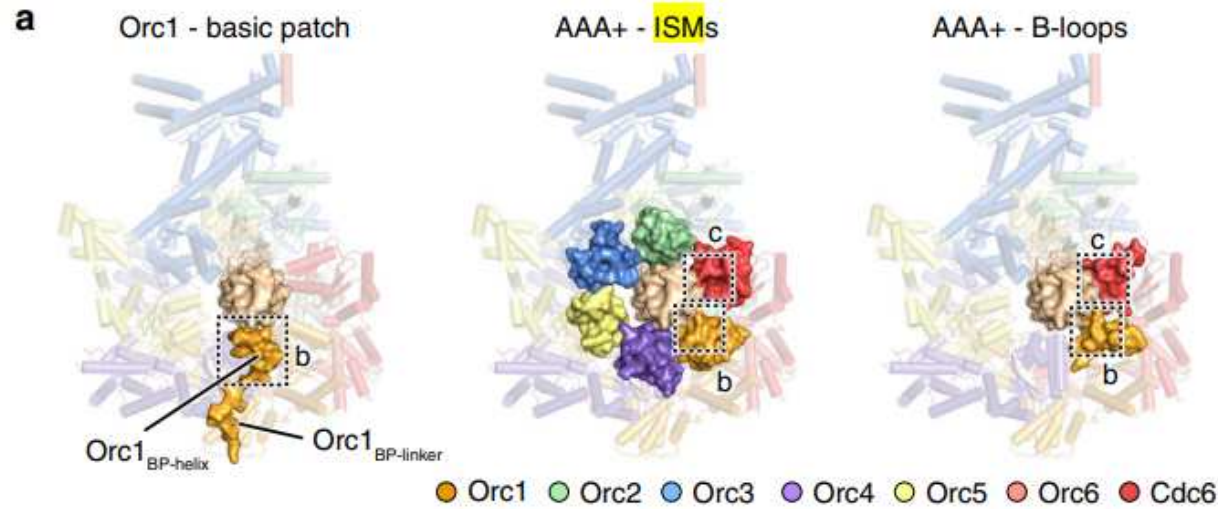
Miller et al_2016_Archea (Vancouver B.C.)

ORC *D. melanogaster*

cryo EM



ORC *D. melanogaster*



ISM = initiator-specific motif

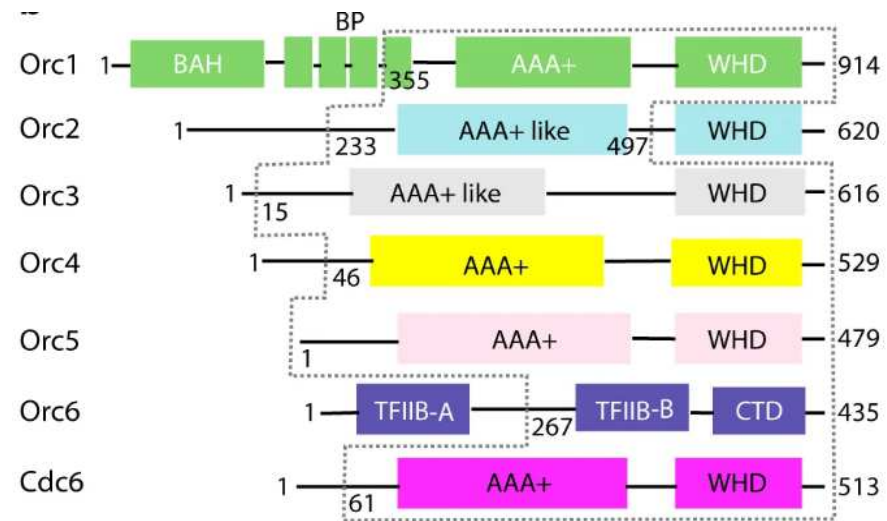
RF = arginine finger

BP = basic patch – binds DNA backbone

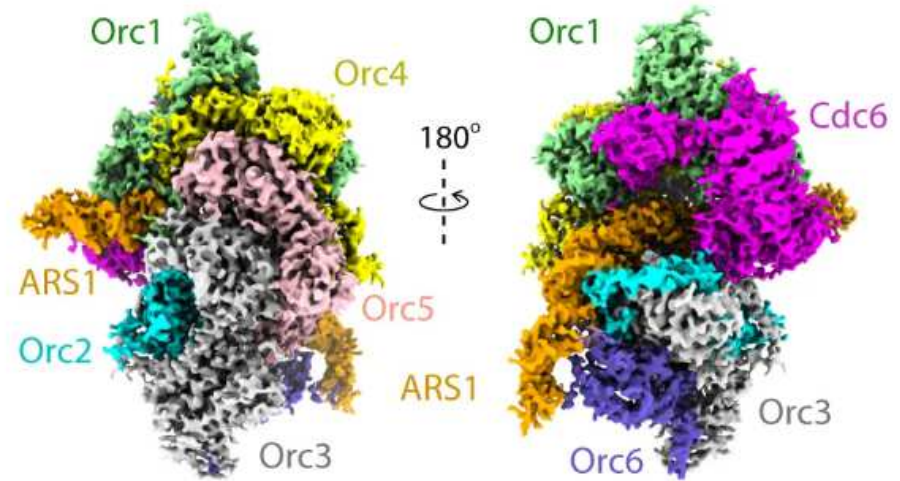
B loops – Orc1, Cdc6

– extended DNA binding site, off-center position of the DNA in the ORC-Cdc6 channel

ORC *S.cerevisiae*



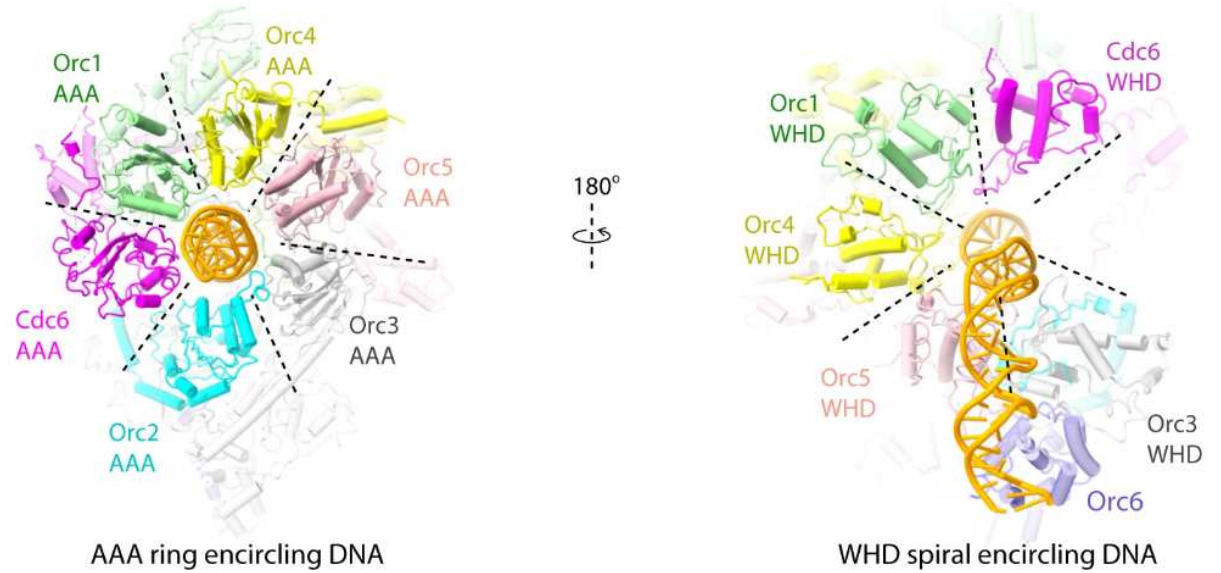
c



Front view (AAA side)

Back view (WHD side)

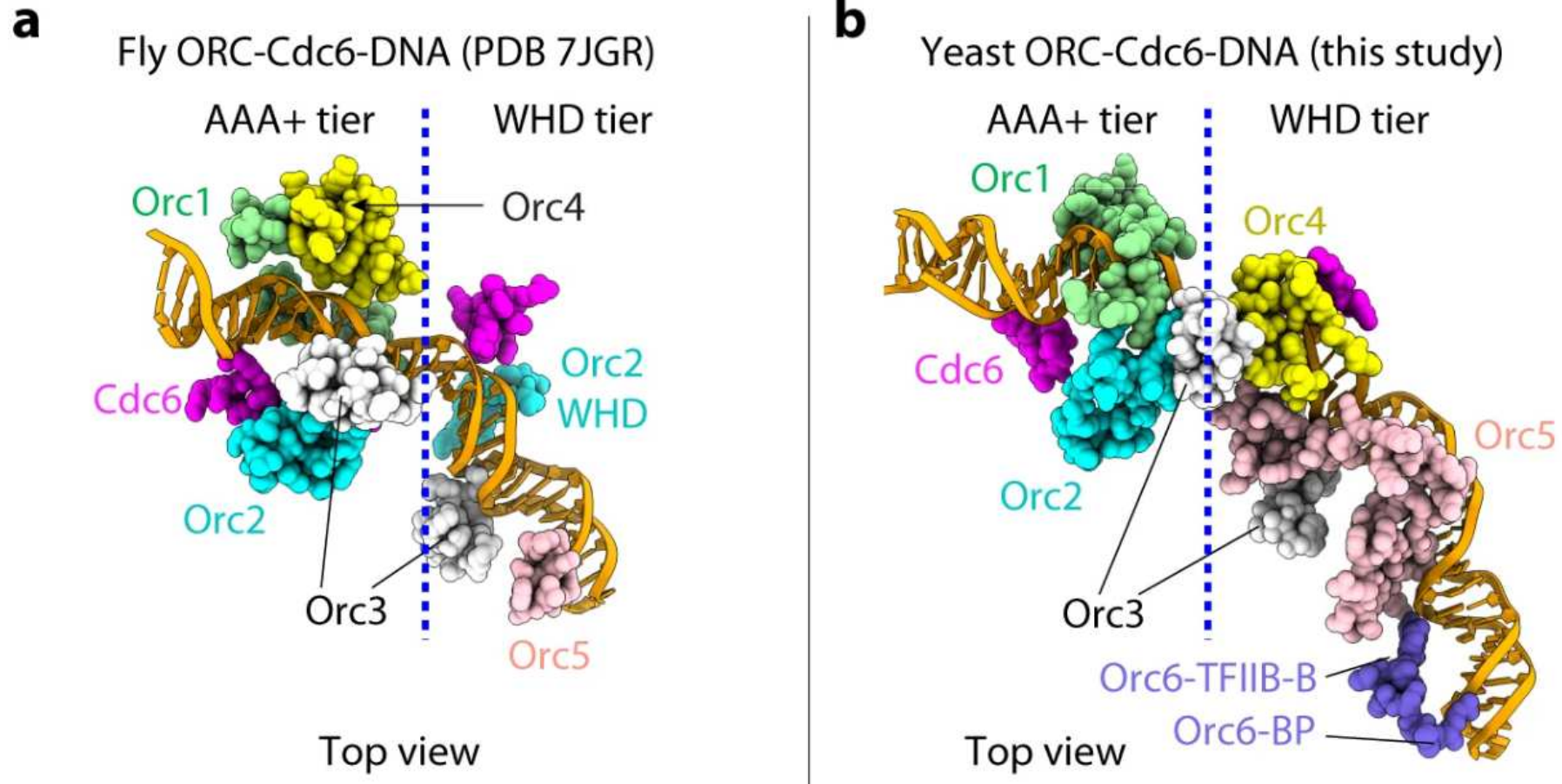
d



AAA ring encircling DNA

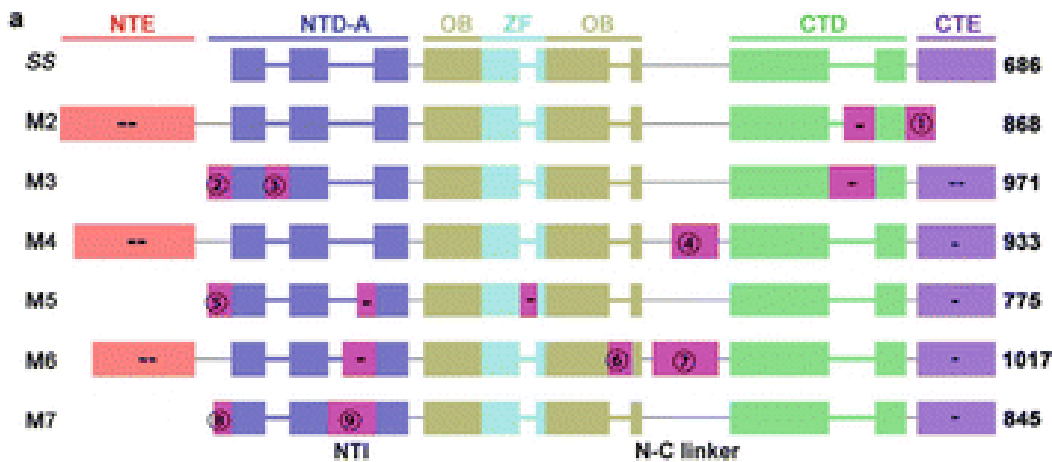
WHD spiral encircling DNA

Comparison of DNA binding by ORC complex *D.melanogaster* vs *S.cerevisiae*



MCM2-7

- MiniChromosome Maintenance
- Archaea: 6 identických podjednotiek, hneď aktívna



SS, *Sulfolobus solfataricus*

Zhai and Tye_ 2017_DNARep

- Eukaryota: podjednotky: 5-3-7-4-6-2 ring
- sama o sebe nemá helikázovú aktivitu
- potrebuje cdc45 a GINS

- rodina AAA+ ATPáz
- 3' → 5' helikáza
- iniciácia (preRC) + elongácia (CMG)
- postupuje s replikačnou vidlicou

Loading:

- pomocou ORC-Cdc6 komplexu a Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) v G1
- po väzbe je MCM2-7 komplex SUMOylovaný –zabránenie predčasnej aktivácie

Aktivácia počas S fázy

- fosforylácia pomocou CDK a DDK protein kináz
- MCM2-7 už nie je sumoylovaný, ale fosforylovaný
- aktivácia postupne, len v niektorých počiatkoch
- záloha v prípade pozastavených replikačných vidlíc

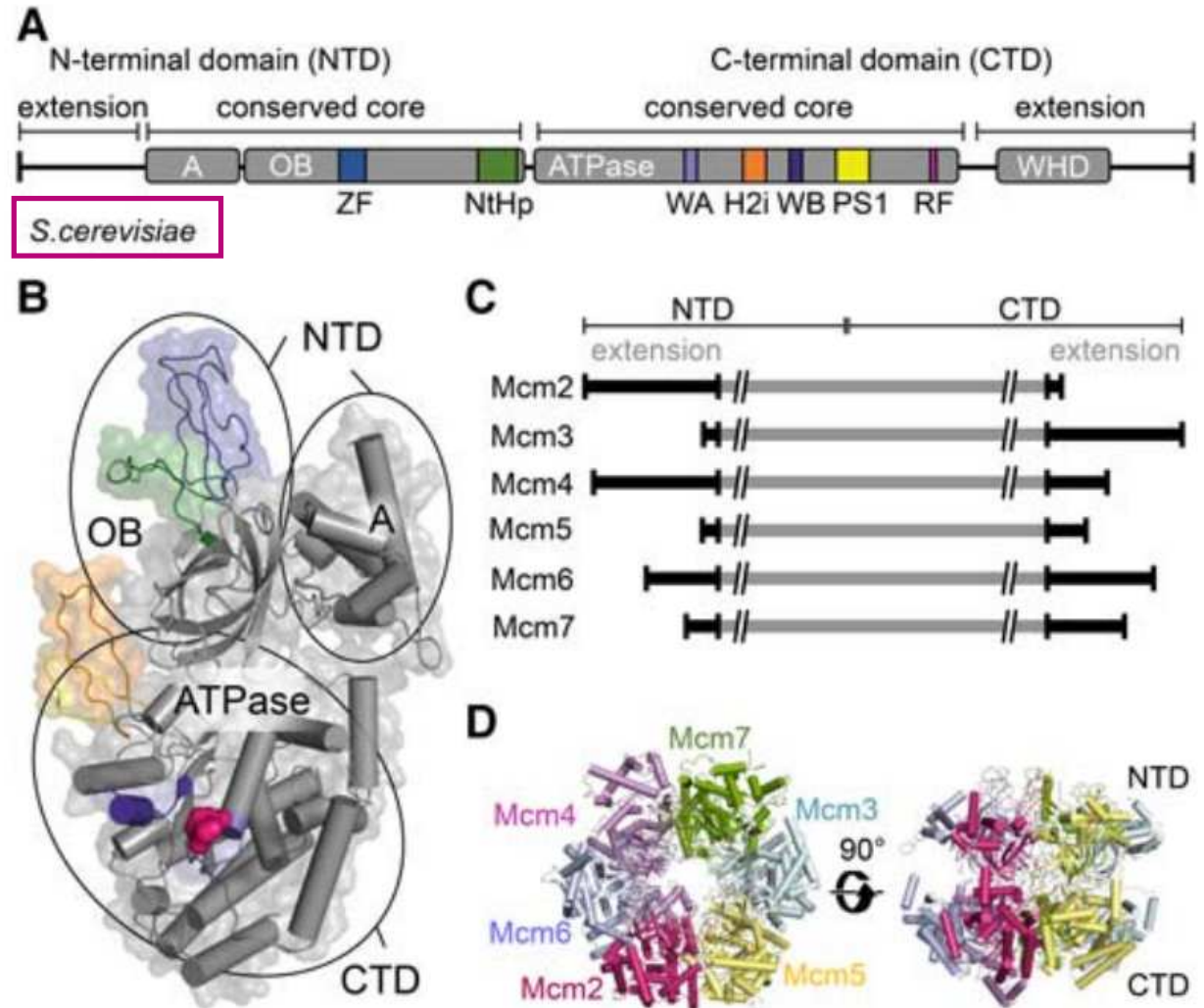
MCM2-7 –štruktúra podjednotiek

N-koncová doména NTD

- interakcia medzi MCM podjednotkami
- **A** - α -helixy, regulácia helikázovej aktivity
- **OB fold** –väzba na ssDNA
- **Zinc-binding motif** -stabilizácia N-koncov a komplexu
- **N-koncový β -hairpin** -interakcia s DNA

C-koncová doména CTD

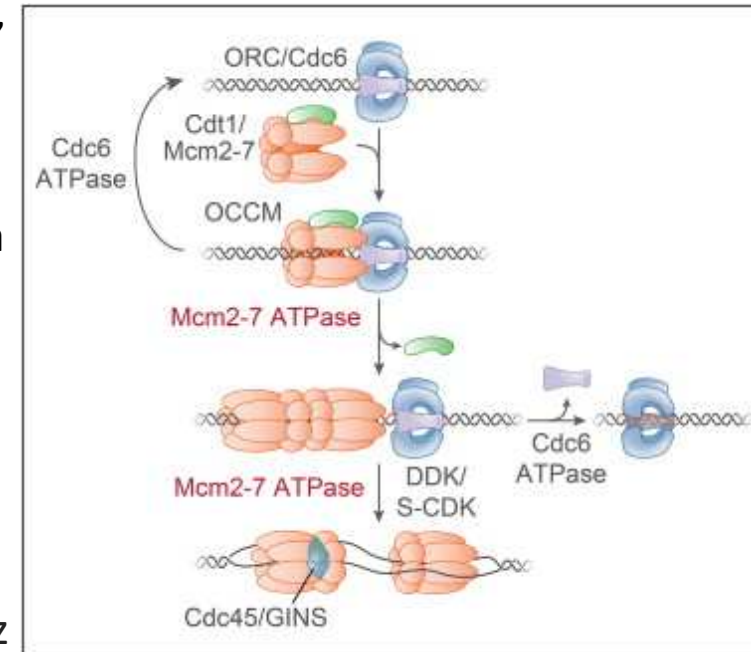
- **AAA+ ATPázová doména**
- evolučne konzervovaná
- Walker A** (väzba ATP), **H2i -helix 2 insertion β hairpin** (väzba DNA), **Walker B** (hydrolýza ATP), **PS1 -presensor 1** (väzba DNA), **RF -arginine finger**
- **Degenerovaná Winged Helix**
- proteín-interakčné motívy



Aktivácia MCM helikázy

S.cerevisiae:

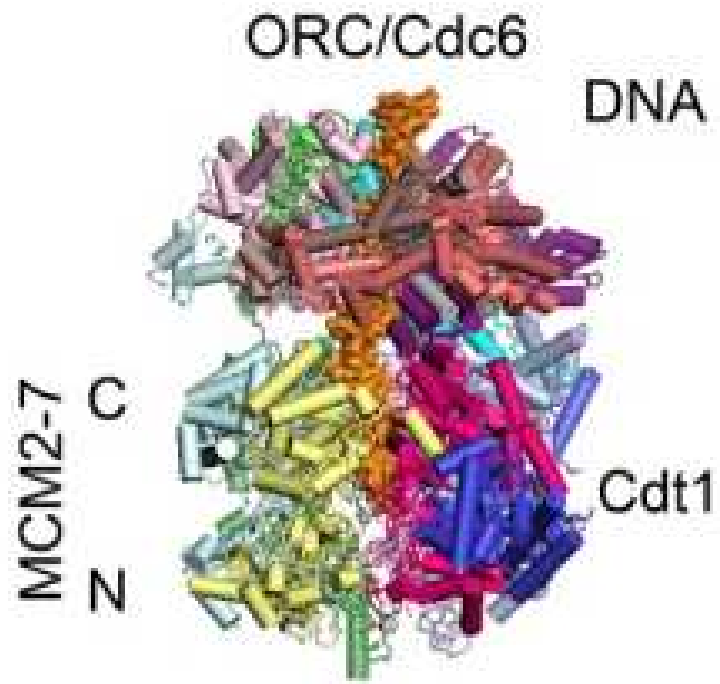
- Cdt1 –väzba na N-koncové regióny Mcm2, Mcm6 a Mcm4 = stabilizácia, single hexamer (SH) je naviazaný na ORC-Cdc6 v replikačných počiatoch = ORC–Cdc6–Cdt1–MCM2–7 (**OCCM**) komplex
- uvoľnenie Cdc6 a Cdt1
- naviazanie druhého MCM2/7 komplexu (za pomoci Cdc6, Cdt1 a ORC) a tvorba „head-to-head“ dvojitého hexaméru (**DH**) = pre-replikačný komplex (pre-RC)
- pre-RC nemá helikázovú aktivitu až do S-fáze
- na rozhraní G1 a S-fáze –aktivácia pomocou DDK (Dbf4-dependent kinase), S-CDK (S-phase-specific cyclin-dependent kinase) a ďalších faktorov = tvorba **dvoch** aktívnych Cdc45–Mcm2–7–GIN5 (**CMG**) helikáz (pre-iniciačný komplex)
- aktivácia pre-iniciačného komplexu –oddelenie DH do dvoch aktívnych helikáz, naviazanie polymeráz do replikačnej vidlice = vznik aktívneho replizómu



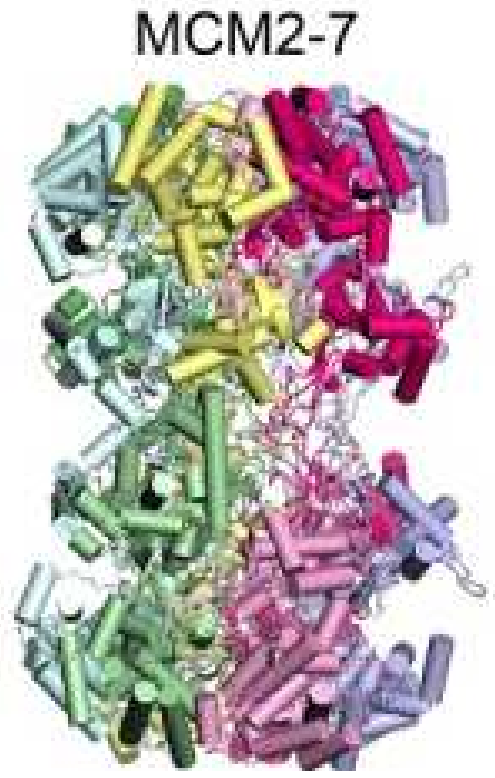
Kang et al_ 2014_MolCell

A

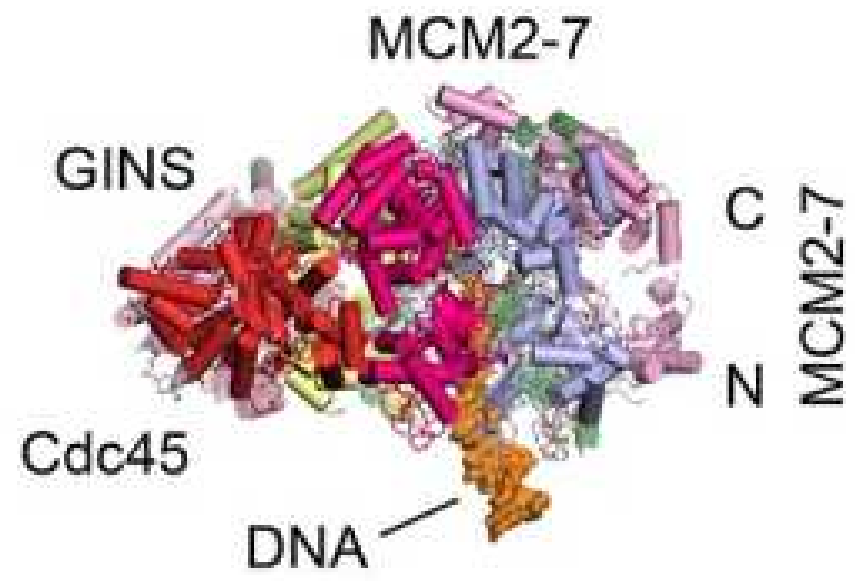
OCCM

**B**

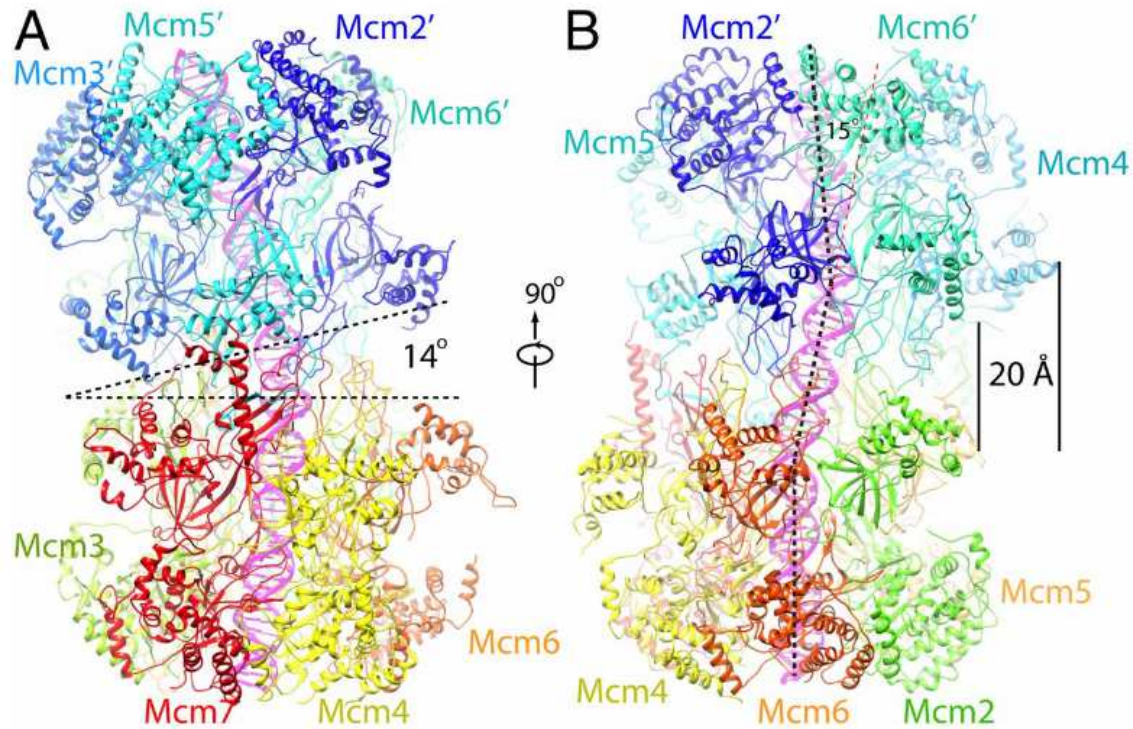
DH

**C**

CMG

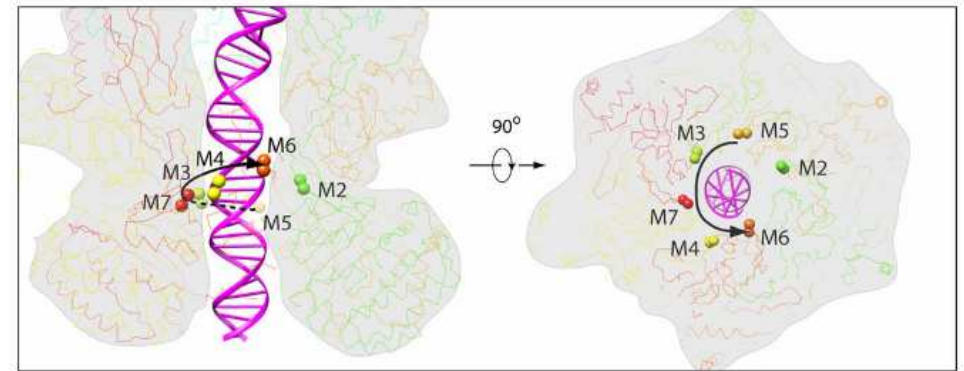


MCM2-7 –cryo-EM štruktúra, *S.cerevisiae*

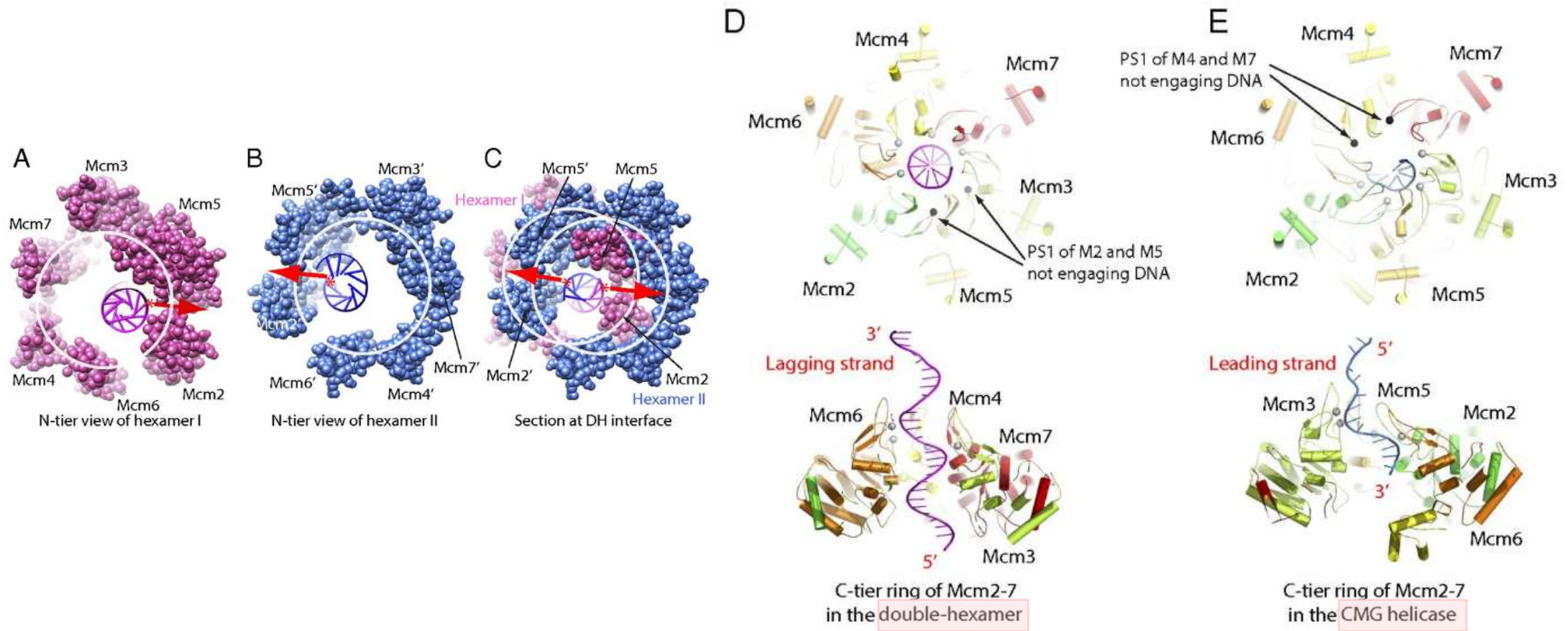


Kontakty s DNA:

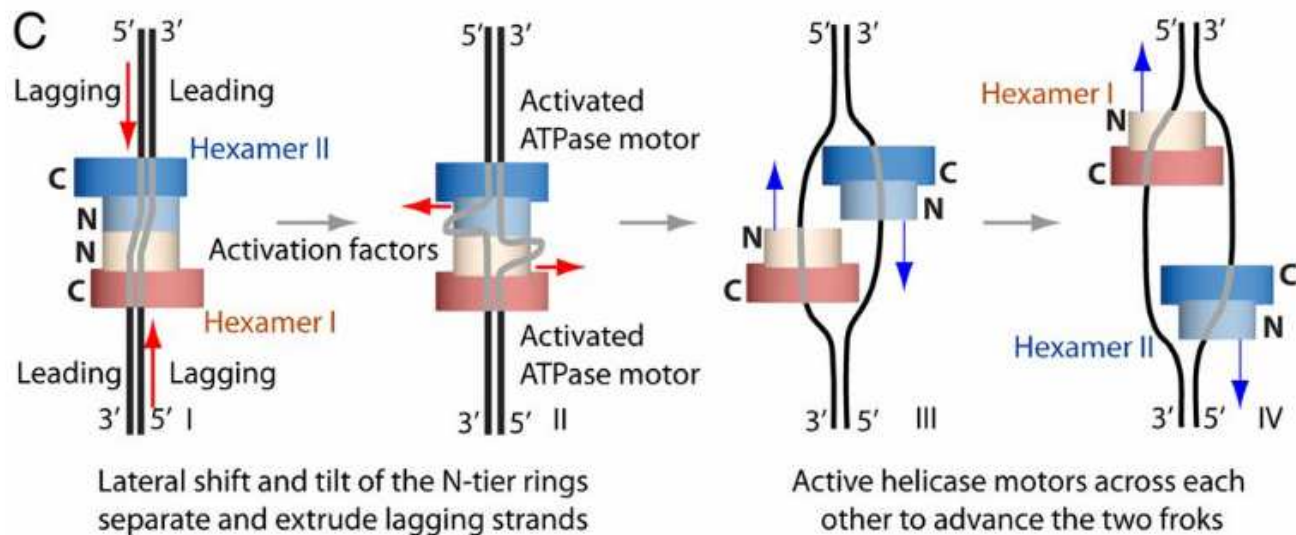
- ZF (zinc finger)
- H2I (helix 2 insertion loop)
- PS1 (presensor 1)



MCM2-7 –cryo-EM štruktúra, *S.cerevisiae*

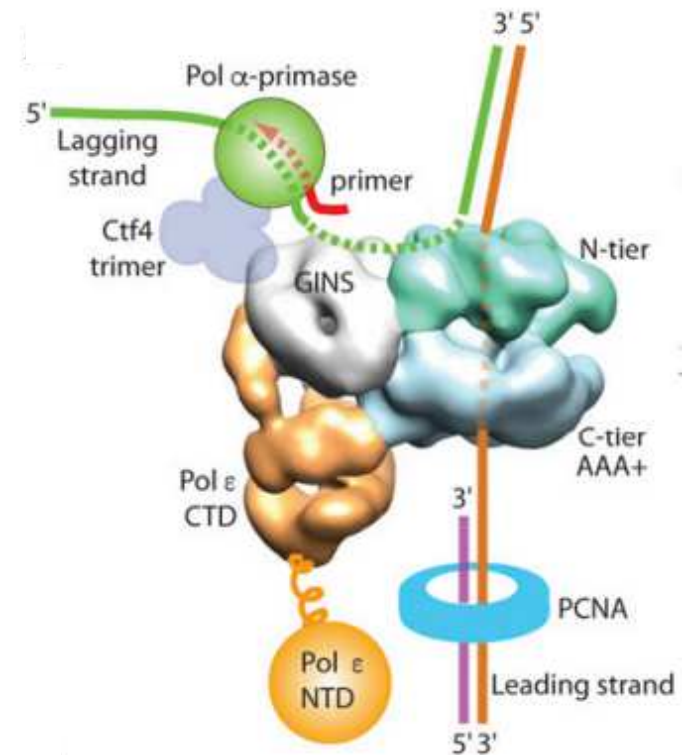


A lagging-strand DNA extrusion model



Noguchi et al_2017_PNAS

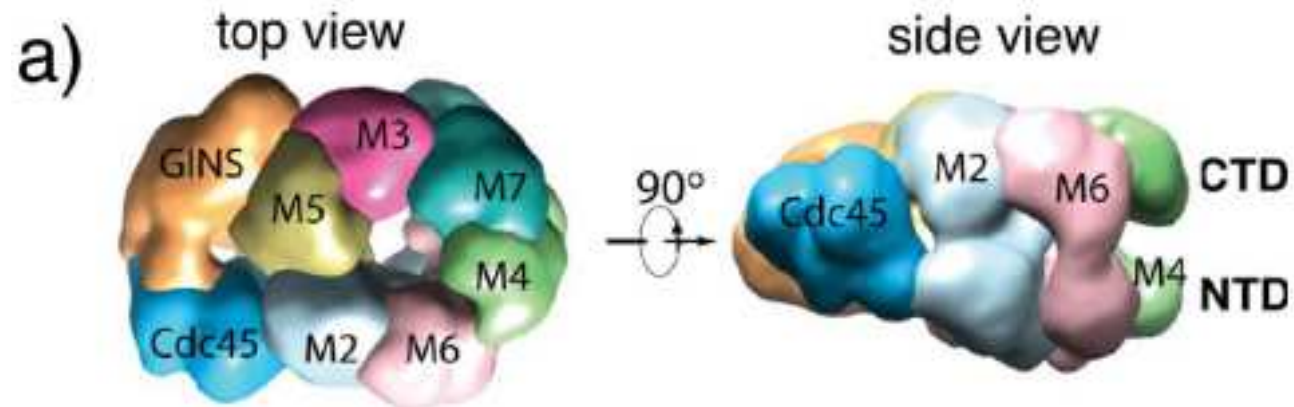
- I. – konformačné zmeny spôsobené naviazaním aktivačných faktorov – presunutie lagging-strandu
- II. - naklonenie a posunutie N-vrstiev MCM2-7 kruhov, vytlačenie lagging-strandu cez Mcm2-Mcm5 „brány“
- III. - 2 aktívne helikázy putujú proti sebe v smere 3'-5'
- IV. - obojsmerný pohyb replikačnej vidlice



Georgescu et al_2016_PNAS

CMG komplex

- MCM hexamér
- GINS komplex
- Cdc45



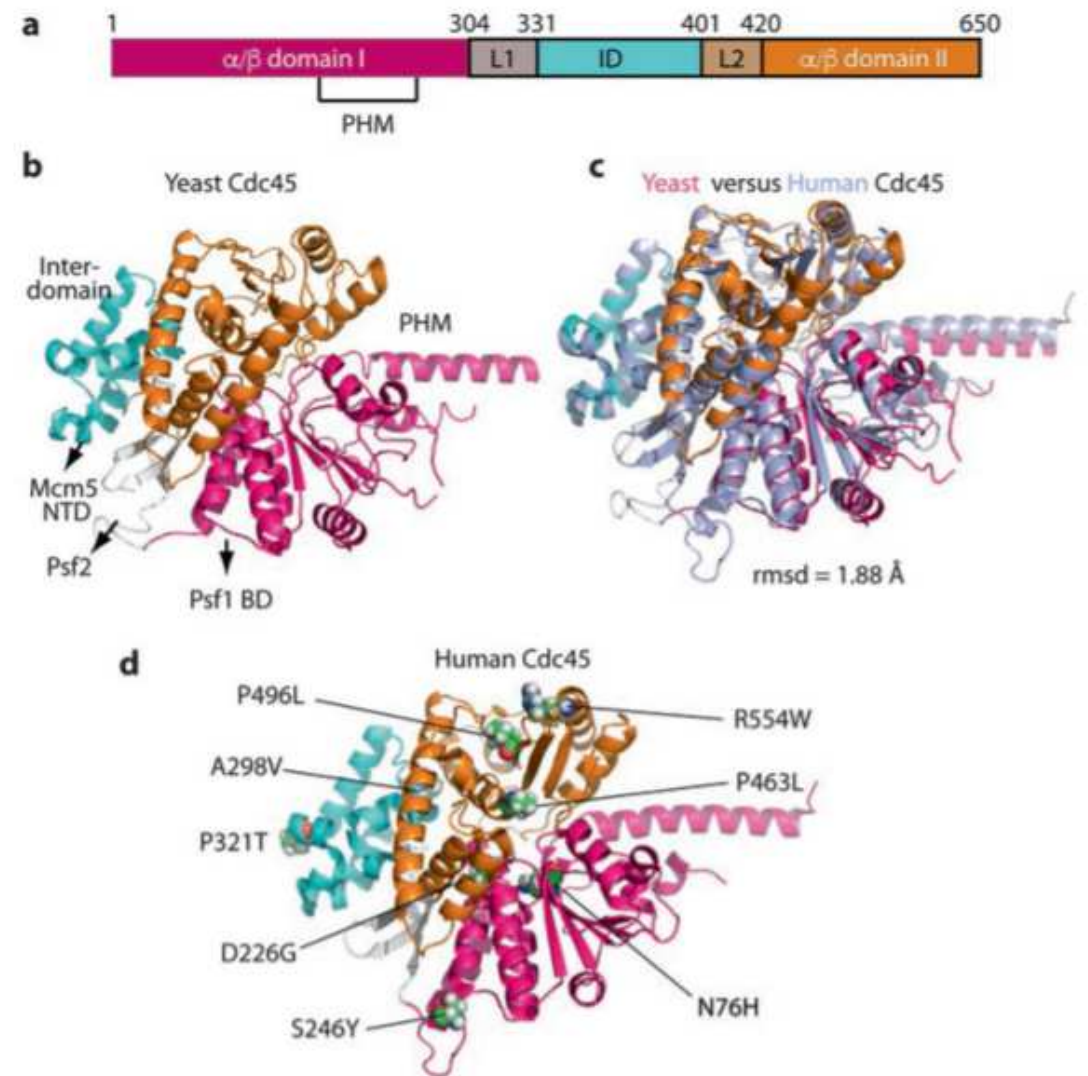
Sun et al_ 2016_Nucleus

- Cdc45 a GINS sa viaže na NTD MCM komplexu
- helikázová aktivita na dsDNA
- Cdc45 a GINS spôsobuje:
 - remodeláciu MCM dvojitého hexaméru (DH)
 - vyššiu affinitu MCM DH k DNA
- CMG ostáva naviazaný na DNA až do terminácie replikácie –ubikvitinácia = degradácia

Cdc45

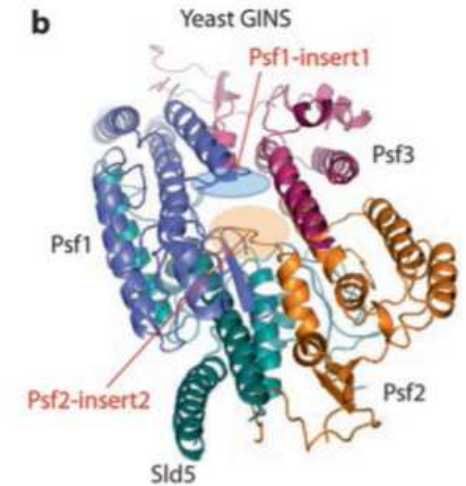
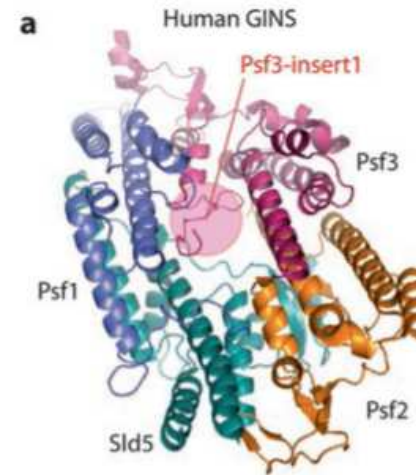
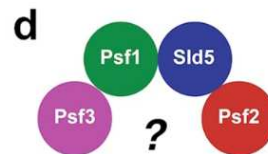
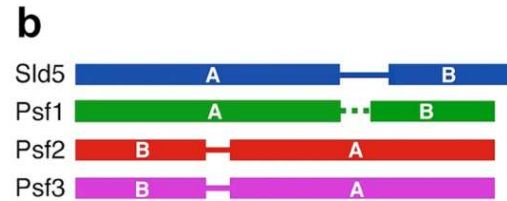
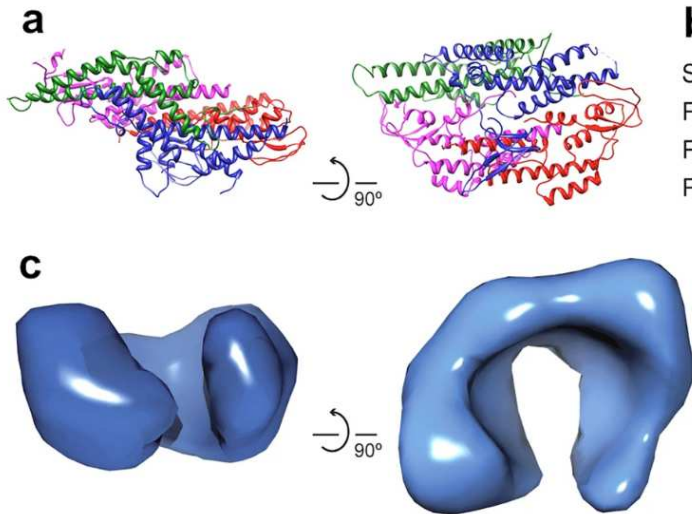
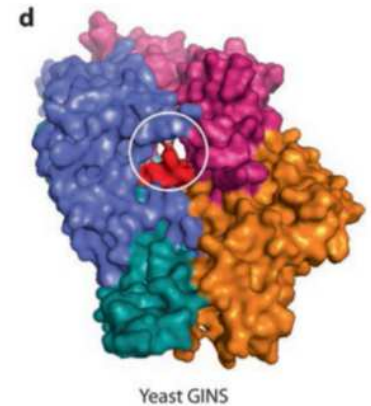
Cell Division Cycle 45

- konzervovaný
- dve **RecJ-like α/β** domény oddelené krátkou helikálnou inter-doménou (ID)
- **ID** stabilizuje NTD domény Mcm2 a Mcm5
- **protruding helical motif (PHM)**- stabilizácia Pol2
- viaže sa na M2 a M5 podjednotky MCM komplexu
- Meier-Gorlin syndróm



GINs

- akronym z prvých písmen japonských čísel 5-1-2-3 (go-ichi-ni-san) = 4 proteínové podjednotky komplexu: Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3
- vyskytuje sa aj u Archaea
- aktivácia MCM komplexu pomocou zmeny štruktúry
- má centrálny pór, ale príliš malý pre ssDNA
- interaguje s Mcm3/5 na N koncoch a s Cdc45
- slúži ako „scaffold“ pre replizóm
- rekrutuje ďalšie proteiny replizómu (napr. DNA Pol α , DNA Pol ϵ ...)
- GINs ani Cdc45 nemajú ATPázovú aktivitu



Elongácia

- na vedúcom a opožďujúcom sa vlákne
- 3 DNA polymerázy z 13 sa u eukaryot zúčastňujú replikácie
- DNA Pol α , Pol δ a Pol ϵ
- CMG helikáza rozplietá dsDNA na dve ssDNA vlákna
- na ssDNA nasadá RPA , ktorá ju chráni pred nukleázami a tvorbou sekundárnych štruktúr
- tvorba RNA/DNA primerov na templátoch na oboch ssDNA vláknach pomocou komplexu Primáza-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

• Replication Protein A

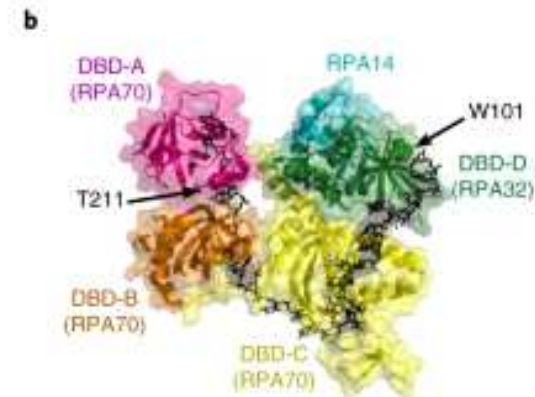
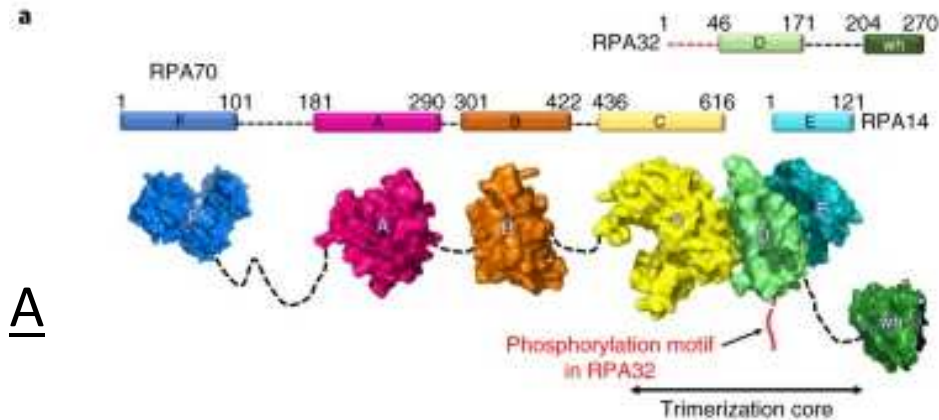
- zabraňuje tvorbe sekundárnych štruktúr ssDNA
- chráni ssDNA pred endonukleázami
- úloha v replikácii a v oprave DNA
- heterotrimér 1:1:1

RPA70 (70kDa subunit)

RPA32 (32kDa subunit)

RPA14 (14kDa subunit)

- väzba na DNA pomocou šiestich **OB foldov** A-E (oligonucleotide/oligosaccharide binding motívov)
- viaže RFC (špecifita pre PCNA)

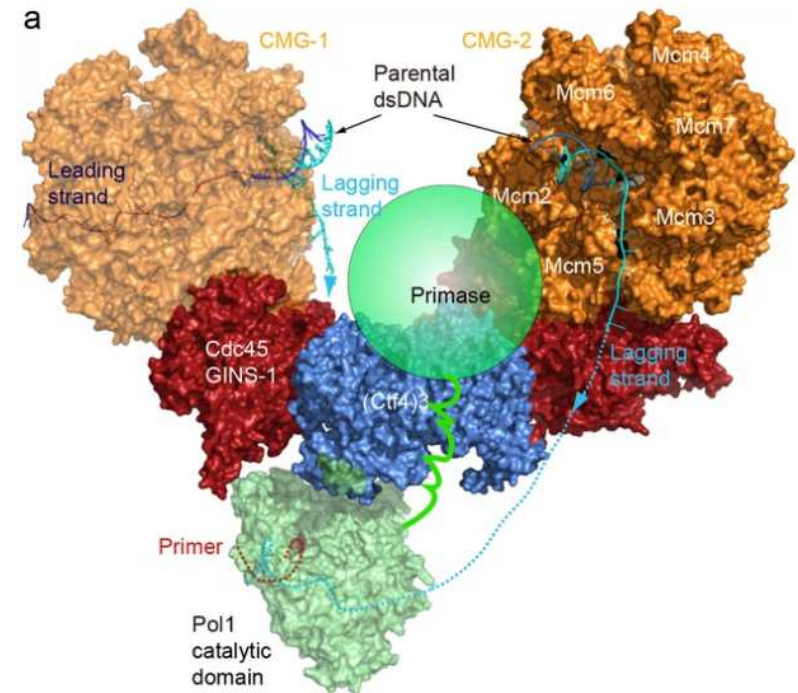
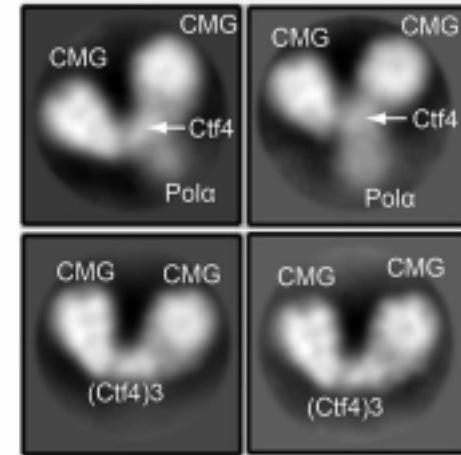


Ustilago maydis

Pokrhel et al_2019_NSMB

DNA Pol α

- nízka procesivita
- bez proofreadingovej aktivity = nemá 3'-5' exonukleázovú aktivitu
- Pol α asociovaná s **primázou**, s ktorou tvorí heterotetramér
- inicializuje syntézu DNA na oboch reťazcoch
- pre aktivitu potrebuje CMG helikázu a RPA
- na CMG helikázu sa viaže pomocou **Ctf4 homotrimeru** (Chromosome Transmission Fidelity 4), ktorý je v kontakte s GINS



Primozóm = Pol α -primáza

- **Primázový podkomplex:**

- kvasinky: Pri1 -katalytická a Pri2

- človek: **p49 -katalytická** a **p58**

- vytvorí 2-10 nukleotidov dlhý **RNA primer** na templátovej DNA

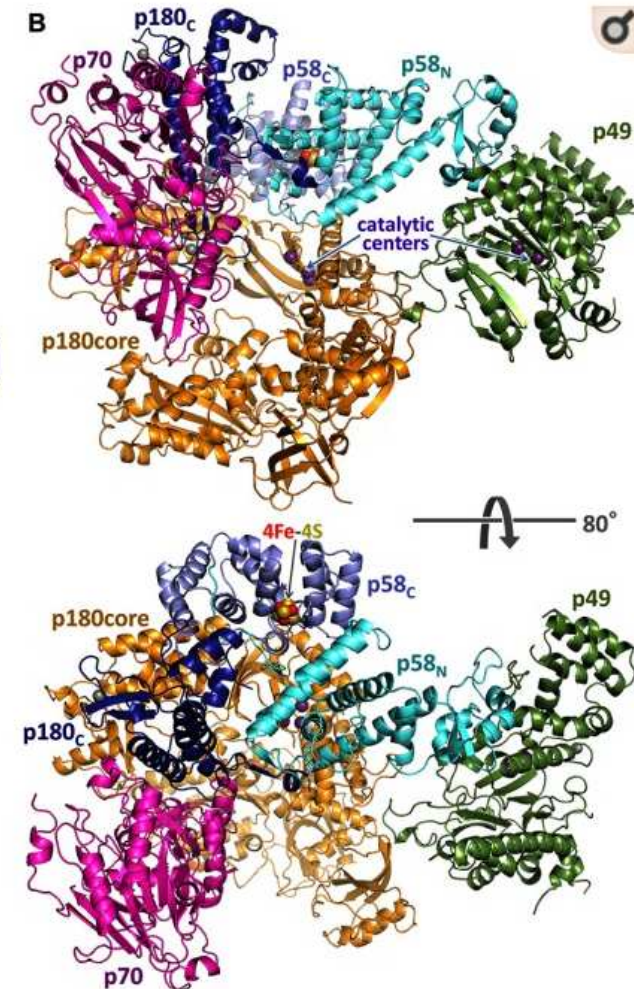
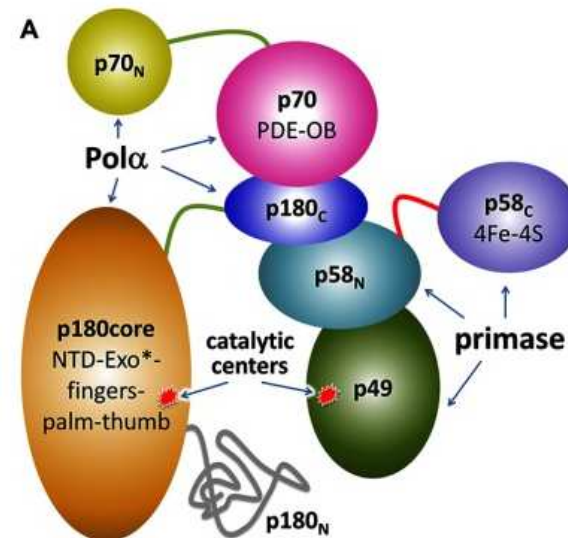
- **Polymerázový podkomplex:**

- kvasinky: Pol1 -katalytická a Pol12

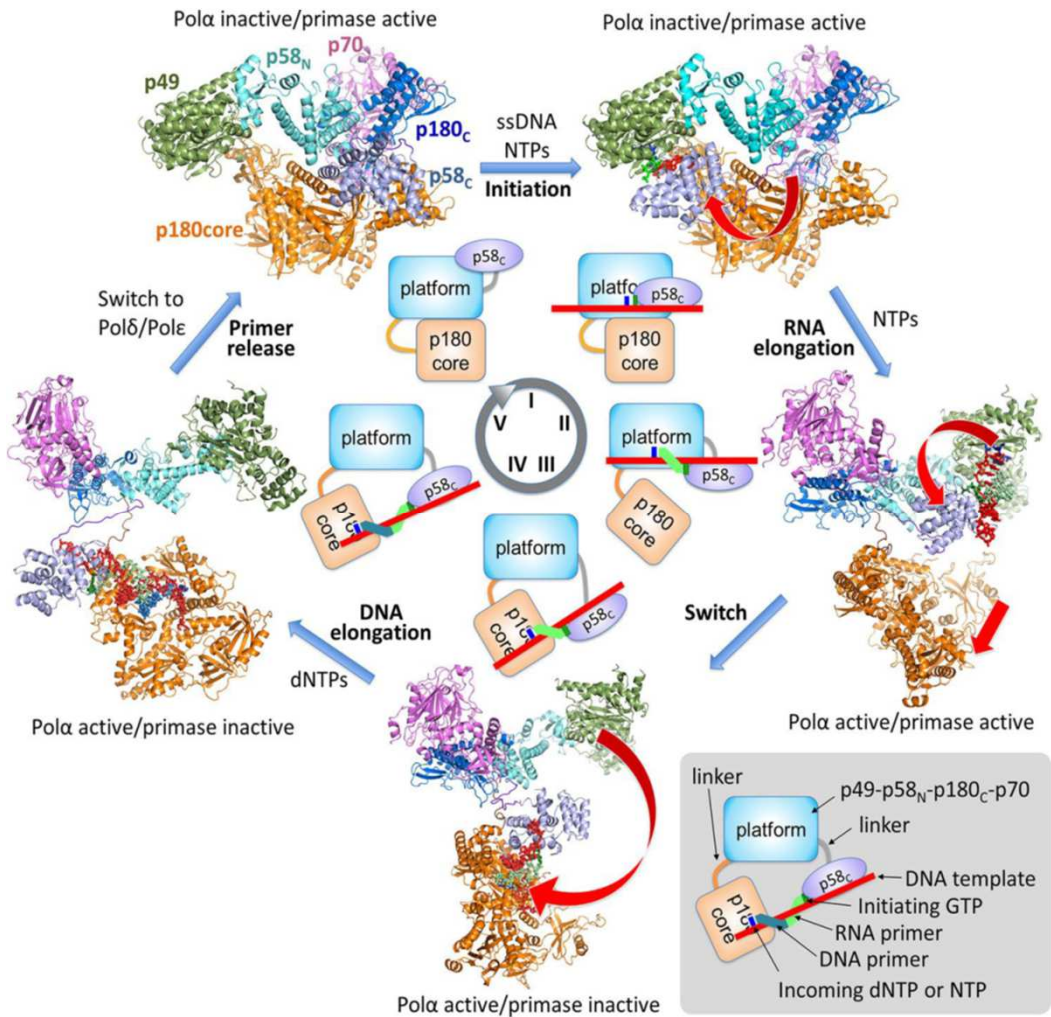
- človek: **p180 -katalytická** a **p70**

- predĺži RNA primer vytvorený primázovým komplexom RNA-DNA = hybridný primer

- flexibilné linkery** pre konformačné zmeny



Syntéza primerov

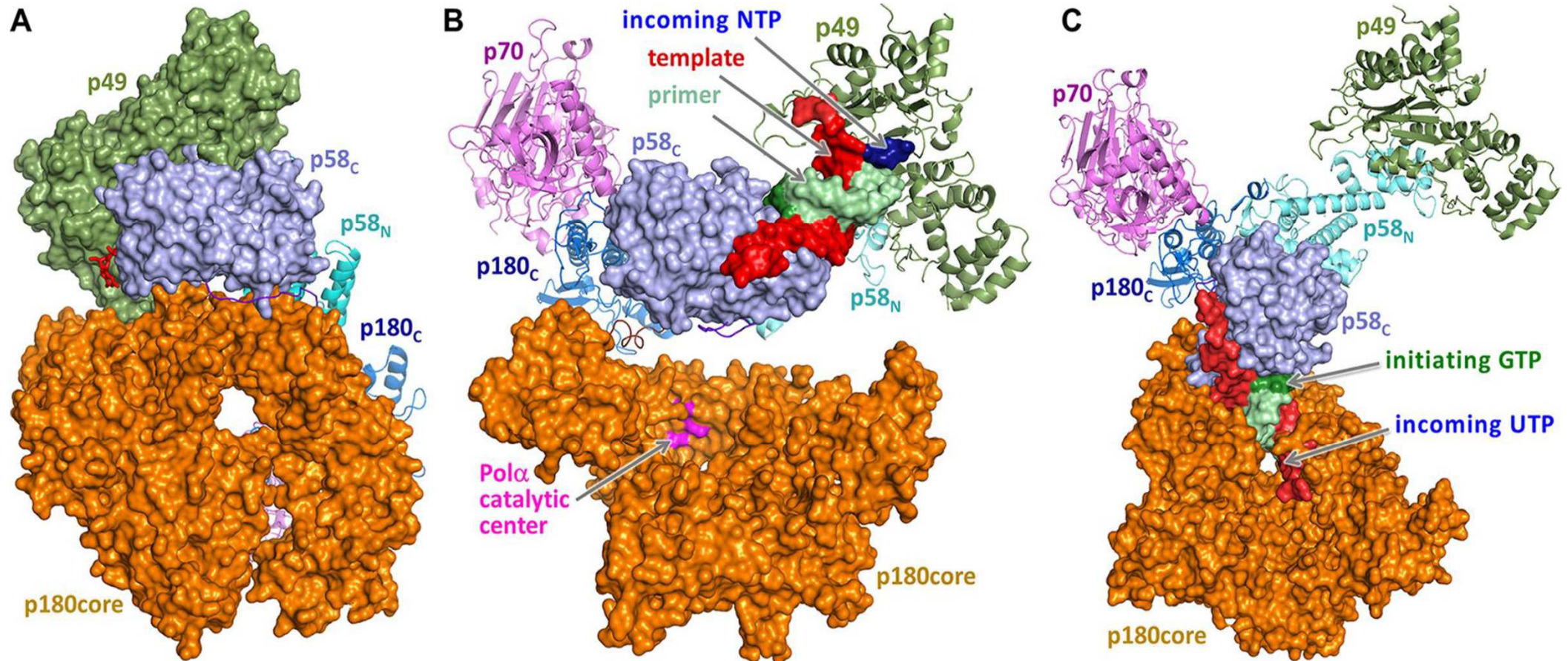


Baranovskiy et al_2016_J Biol Chem

1. p58C sa priblíži k p49 –iniciácia syntézy RNA primeru
2. pri elongácii RNA primeru p58C pohybujúca sa spolu s RNA primerom vytlačí p180
3. keď dĺžka primeru dosiahne 9 nts p58 inhibuje p49
4. takto vytlačená p180 je v pozícii, že sa môže naviazať na 9 nts dlhý RNA primer
5. Polα predĺži primer
6. Keď primer dosiahne dĺžku cca. 30 nts, Polα sa vymení za Polδ alebo Pole

- Polα špecificky rozpoznáva RNA/DNA komplex vytvorený primázou a začne polymerizovať RNA primer pridávaním dNTP
- po nasyntetizovaní určitej dĺžky DNA Polα stratí kontakt s RNA/DNA A-šroubovicou a uvoľní sa z DNA

Syntéza primerov



PCNA a RFC

- objavené ako esenciálne proteíny pre replikáciu SV40 v ľudských bunkách

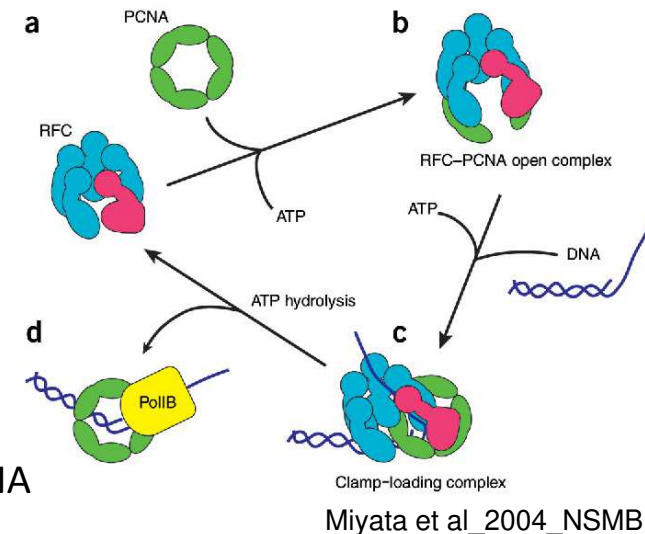
- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
 - konzervovaný od Archaea až po eukaryota
 - kĺzavá svorka na DNA

- RFC (Replikačný Faktor C)
 - potrebný k uchyteniu PCNA na DNA
 - ATPázová aktivita AAA+ ATPáza
 - 1 veľká (RFC1) a 4 malé podjednotky (RFC2-5)
 - rozpoznáva 3' koniec primeru
 - spôsobuje konformačnú zmenu PCNA
 - otvára kruhovú formu za hydrolyzy ATP

- úloha v replikácii, v oprave DNA, v kontrole bunkového cyklu, v epigenetike

- v replikácii:

- upevňuje polymerázu k DNA
- zabraňuje predčasné uvoľnenie polymerázy z DNA
- esenciálne pre výmenu Pol α za Pol δ/ϵ
- výmena DNA polymeráz pri pozastavených replikačných vidlíc
- PCNA je z DNA odstránený na začiatku G2 fáze pomocou ELG1 RFC-like komplexu



PCNA

- homotrimér
- 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 , RFC, ...
- **vnútorná časť**: pozitívne nabitú šrouboviciu – kontakt s DNA

PIP box (PCNA Interacting Peptide):

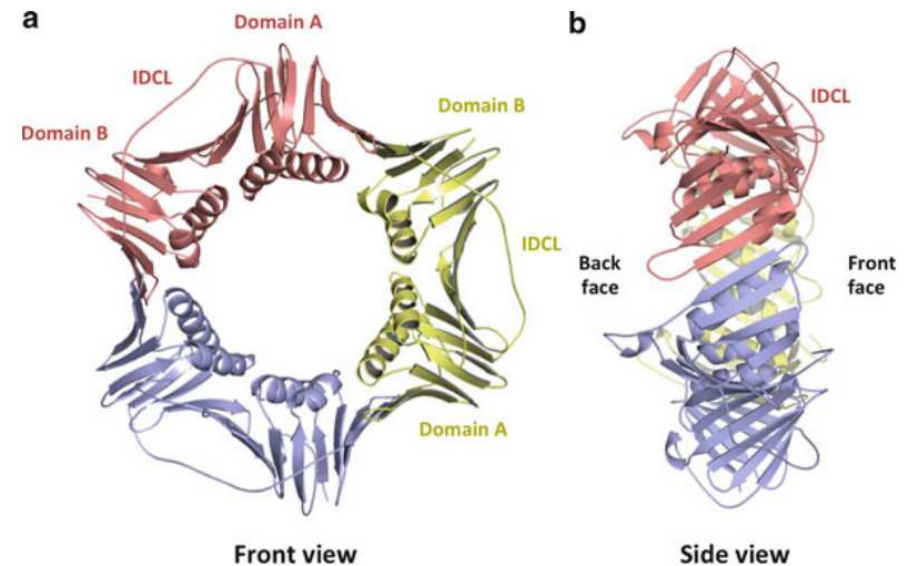
- Q-X-X-L/M/I-X-X-F/Y-F/Y
- motív interagujúci s PCNA IDCL
- obsahujú ho proteíny interagujúce s PCNA
- DNA polymerázy, Dnmt1, p21, Fen1, DNA ligáza...

APIM (AlkB homologue 2 PCNA Interacting Motif)

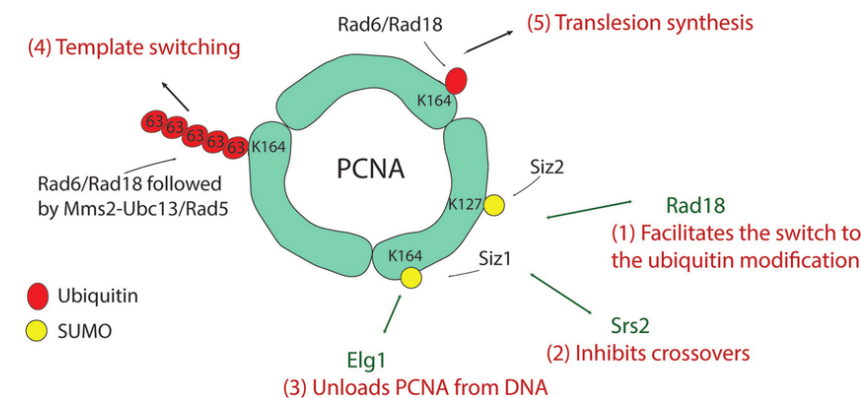
- proteíny zúčastňujúce sa opravy DNA

PCNA kód

- posttranslačné modifikácie PCNA určujúce väzbových partnerov a funkciu PCNA



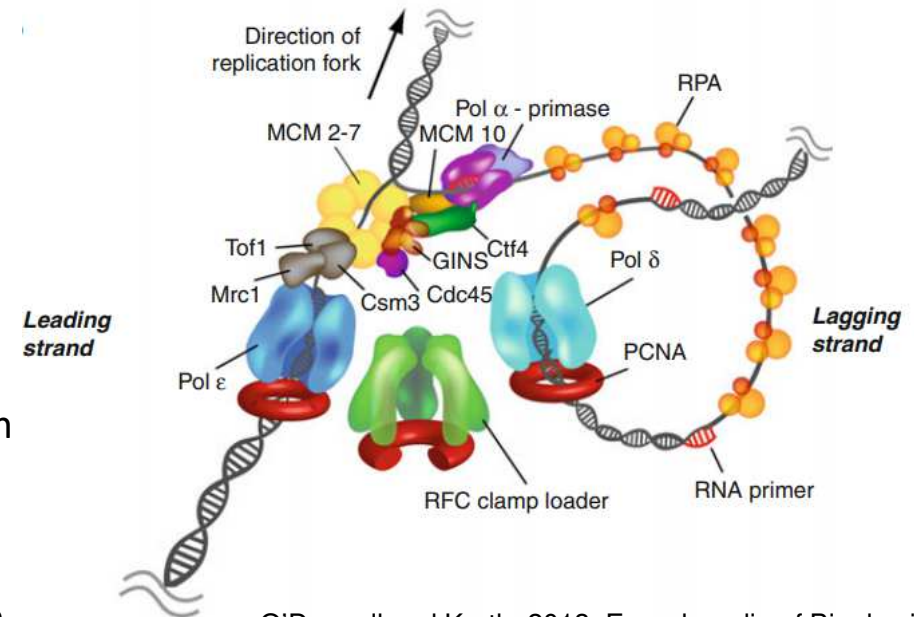
Dieckman et al_2012_The Eukaryotic Replisome:
a Guide to Protein Structure and Function



Ahmed et al_2017_NAR

DNA polymerázy δ a ϵ

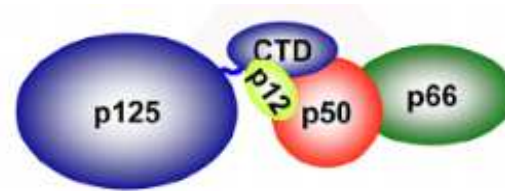
- 5' - 3' DNA polymerázová aktivita
- 3' - 5' exonukleázová aktivita
- mutácie v exonukleázovej doméne polymeráz v nádorových bunkách
- po DNA putujú pomocou PCNA
- **výmena polymerázy α za δ alebo ϵ po syntéze primeru**
- Pol α má afinitu k A-helixu RNA/DNA a z B-helixu DNA/DNA disociuje
- RFC loaduje 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 **RNáza H1 a FEN1**
- polymerázy zaplnia medzery, **DNA ligáza** zliguje nespojené konce



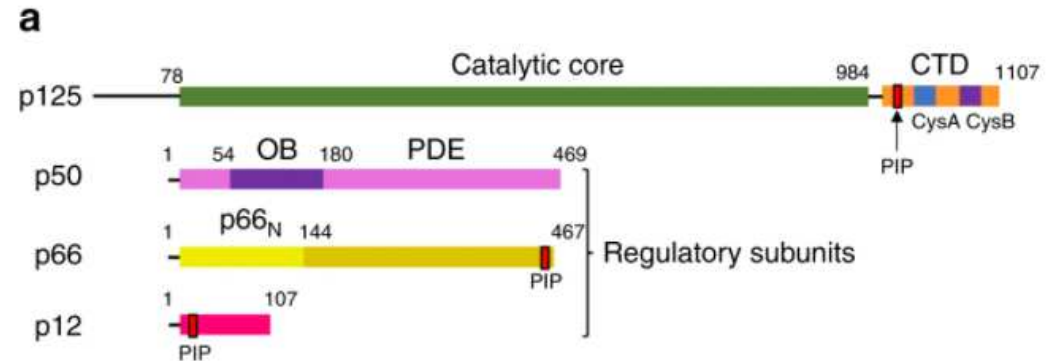
O'Donnell and Kurth_2013_Encyclopedia of Biophysics

Polymeráza δ

Pol δ



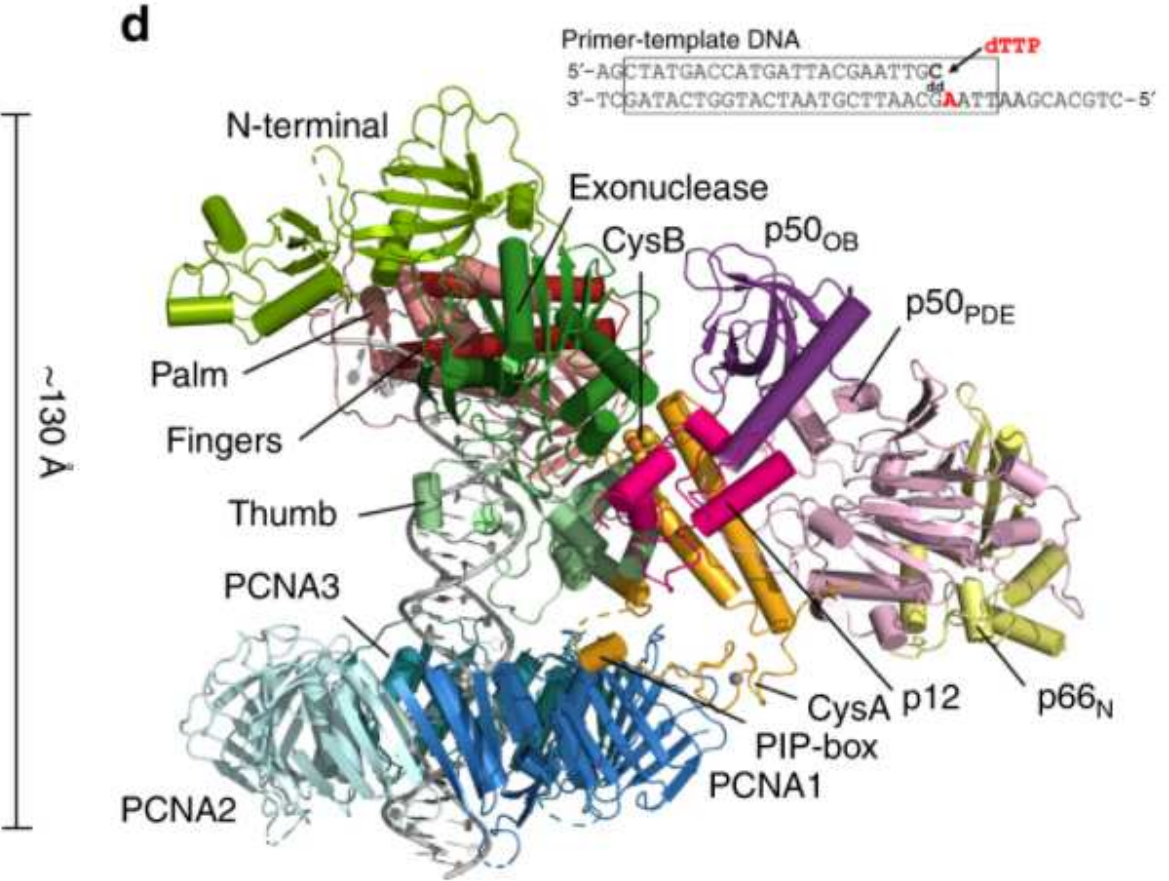
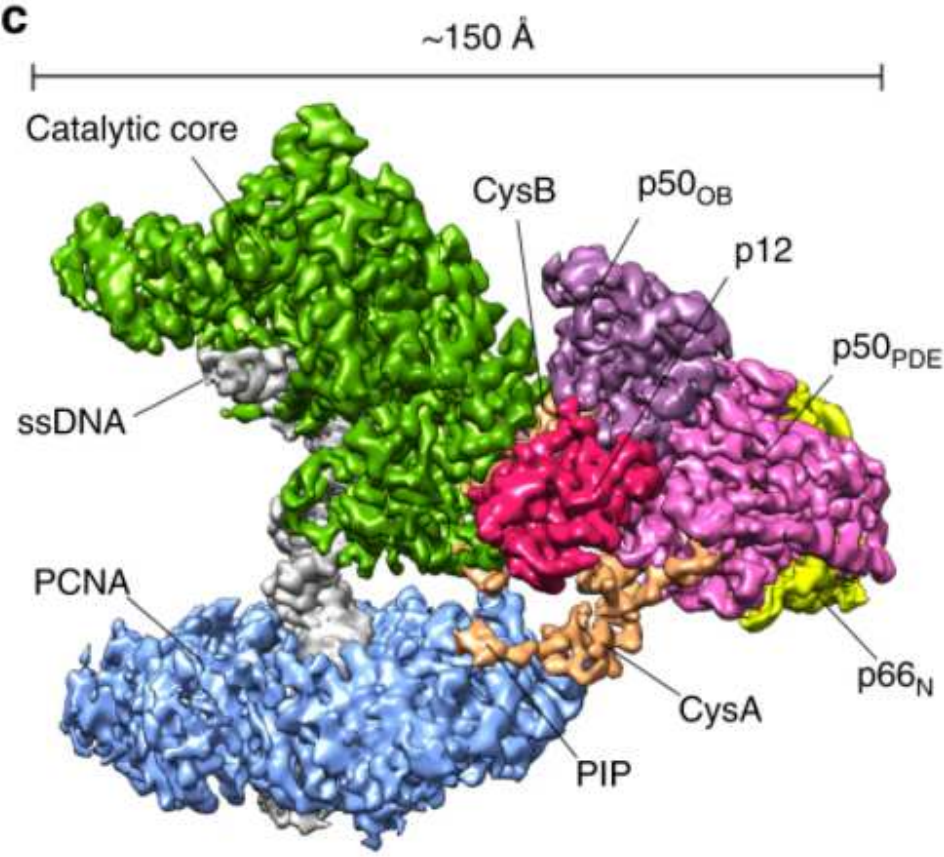
- katalytická podjednotka polymeráz: tvar ľudskej ruky
- „dlaň“ je vysoko konzervovaná –polymerázová aktivita
- „palec“ drží DNA na mieste a zvyšuje procesivitu



Lancey et al_2020_NatComm

- 3' - 5' proofreading - oprava chýb pri replikácii, maturácia Okazakiho fragmentov
- 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 rozpoznávaný FEN1 nukleázou, ktorá ho vyštíepi
- DNA ligáza spojí Okazakiho fragmenty

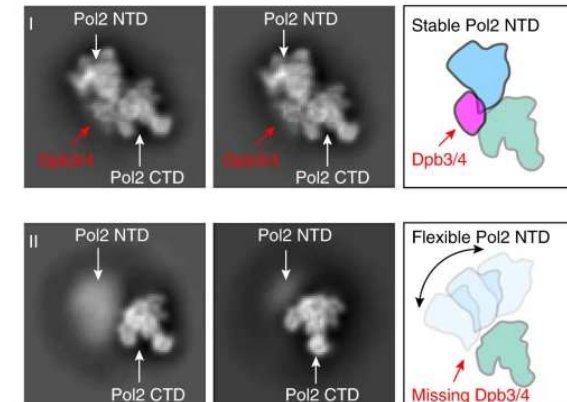
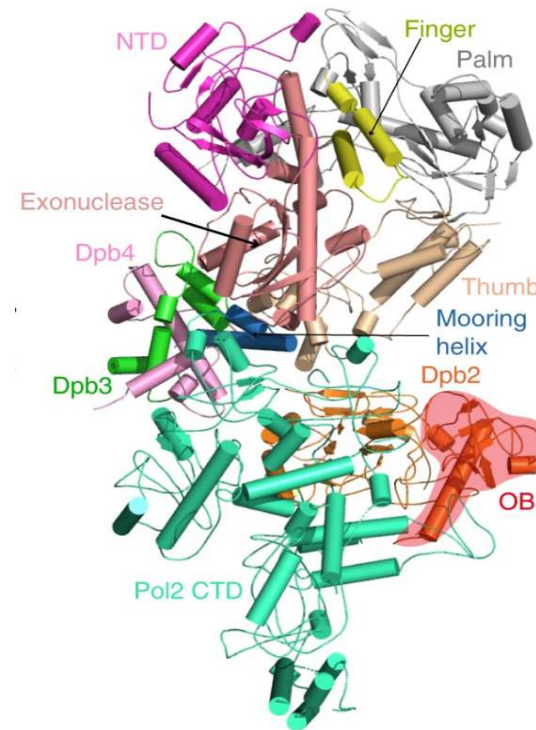
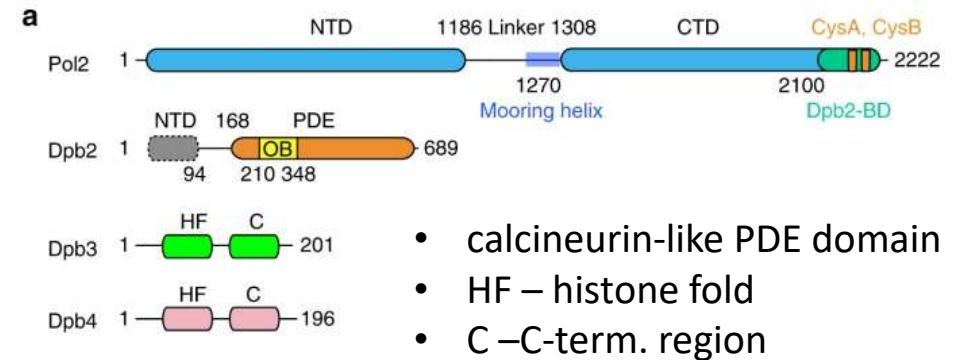
Polymeráza δ –ľudská, cryoEM



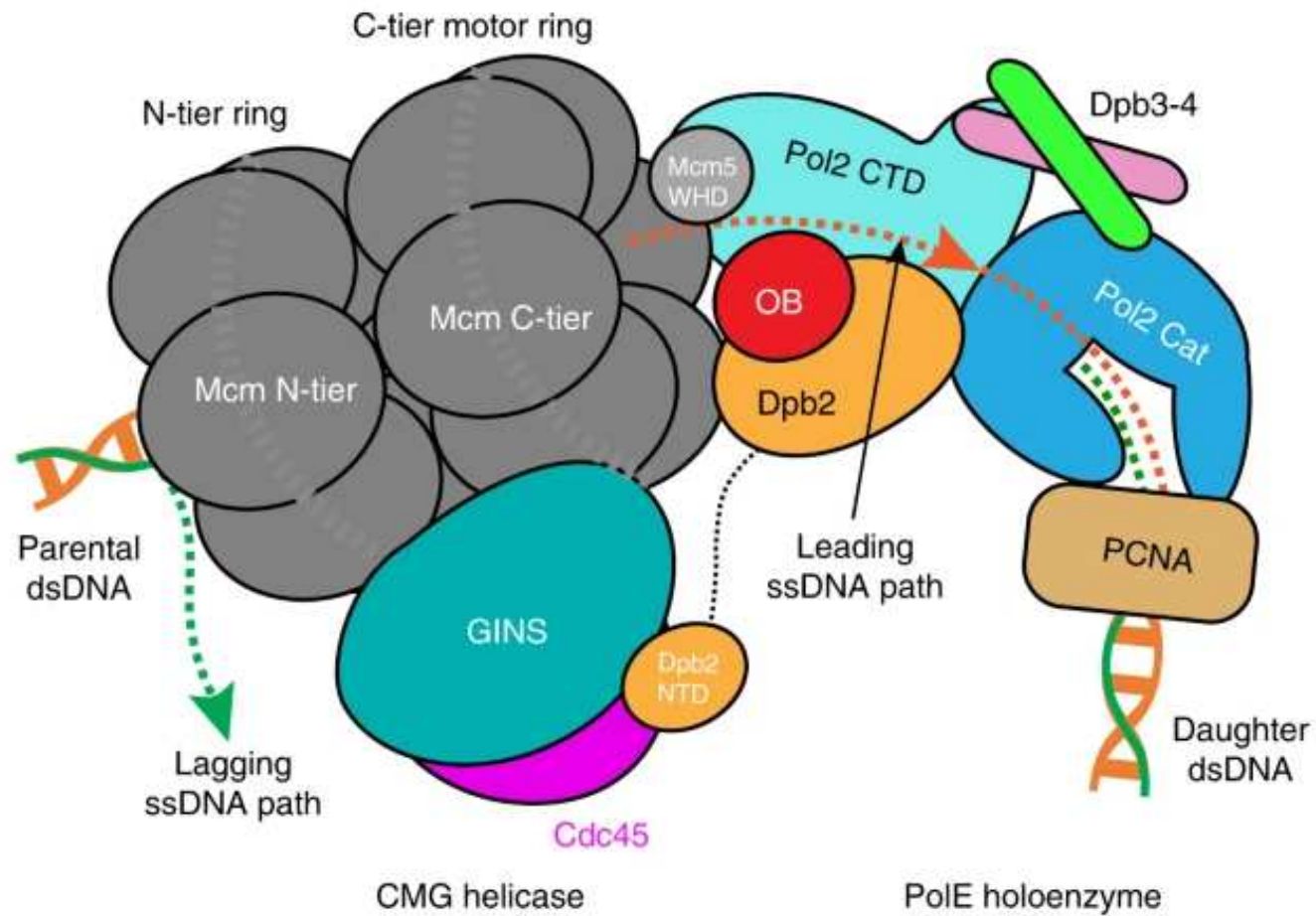
Polymeráza ϵ



- objavená v 1990 ako tretia DNA polymeráza esenciálna pre replikáciu *S. cerevisiae*
- dvojnásobná veľkosť oproti Pol δ
- najväčšia podjednotka (**p261/Pol2**) obsahuje:
 - **NTD = katalytickú časť (syntéza a proofreading)**
 - **CTD** -protein-proteinové interakcie
- pre svoju aktivitu nepotrebuje PCNA
- **mooring helix:**
 - tvar L, koncová časť linkeru medzi NTD a CTD
 - rekrutuje Dpb3-Dpb4 podjednotky
- Dpb3, Dpb4 –neesenciálne, ale udržujú rigidnú štruktúru Pol ϵ



Leading ssDNA path from the CMG helicase to the Pol ϵ



Podjednotky polymeráz H.s. vs S.c.

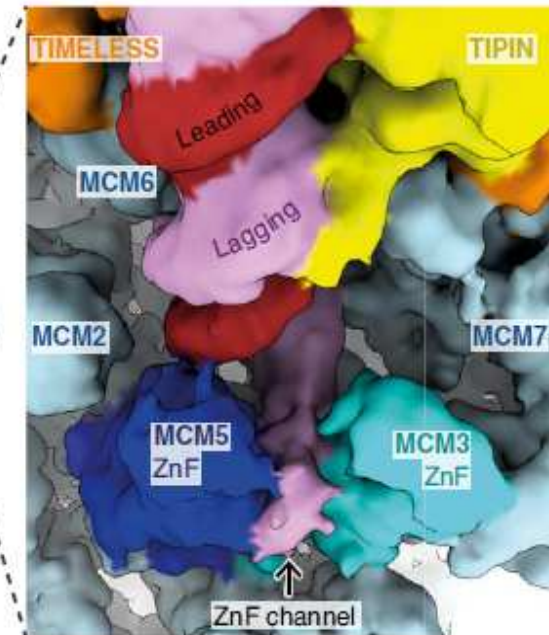
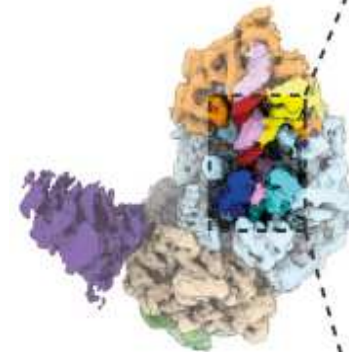
Polymerase	Species		Function
Polymerase α	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Catalytic or A-subunit	POLA1 (p180)	POL1	Catalytic subunit; polymerase activity; inactivated exonuclease
B-subunit	POLA2 (p70)	POL12	Regulatory subunit
Primase small subunit	PRIM1 (p49)	PRI1	Primase
Primase large subunit	PRIM2 (p58)	PRI2	Primase
Polymerase δ	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Catalytic or A-subunit	POLD1 (p125)	POL3	Catalytic subunit; has both polymerase and exonuclease activity
B-subunit	POLD2 (p50)	POL31	Accessory subunit
C-subunit	POLD3 (p66 or p68)	POL32	Accessory subunit
D-subunit	POLD4 (p12)	–	Accessory subunit
Polymerase ϵ	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Catalytic or A-subunit	POLE or POLE1	POL2	Catalytic subunit; has both polymerase and exonuclease activity
B-subunit	POLE2	DPB2	Accessory subunit
C-subunit	POLE3 (p17; CHRAC17)	DPB3	Accessory subunit
D-subunit	POLE4 (p12)	DPB4	Accessory subunit

Terminácia

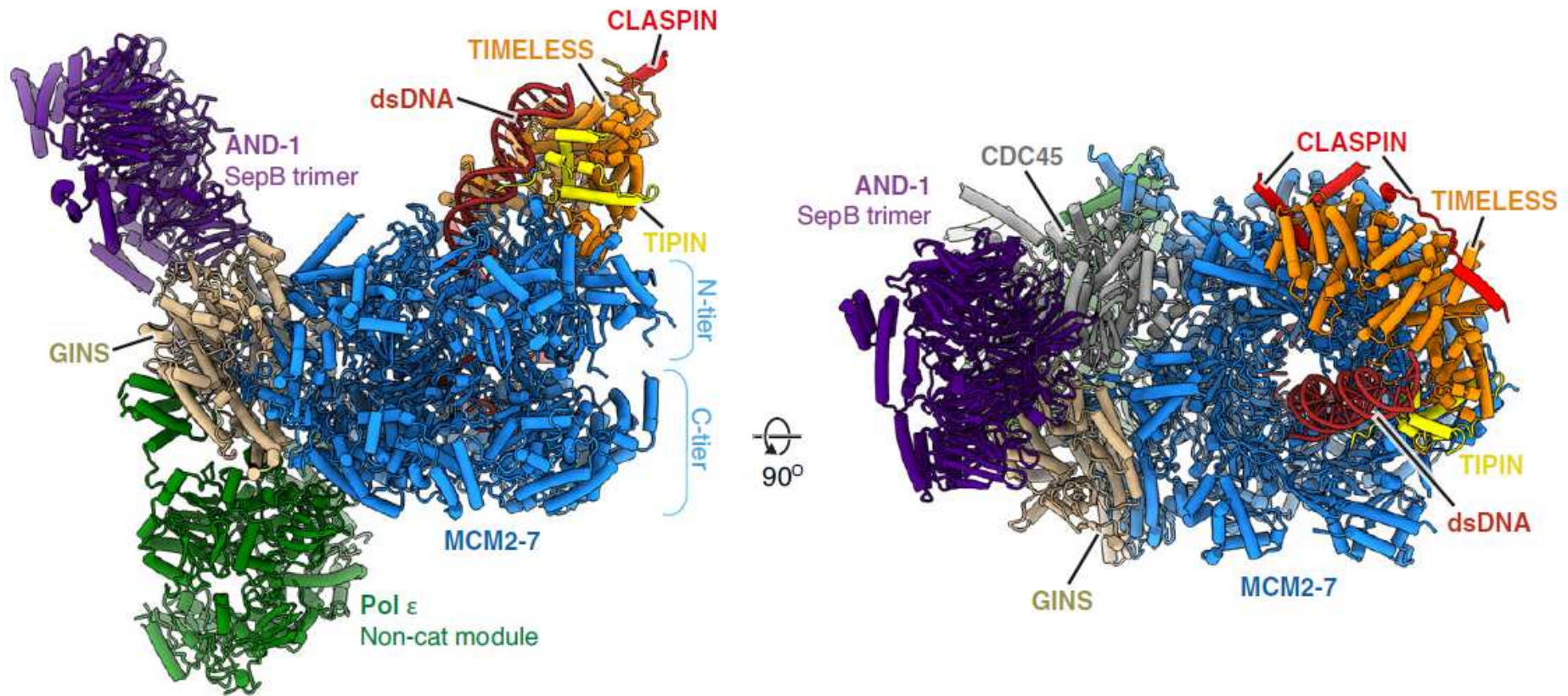
- keď sa 2 replikačné vidlice stretnú
- na konci S-fáze, ale v skutočnosti sa replikony terminujú v priebehu S-fáze
- veľkosť replikonu: 31 kbp, rýchlosť replikačnej vidlice: 1,5 kb/min
- → za 10 minút od začiatku replikácie sa dve replikačné vidlice stretnú a dojde k terminácii replikácie
- **RFB** (Replication Fork Barrier):
 - špecifické miesta genómu, ktoré dokážu zastaviť replikačnú vidlicu
 - pri replikácii rDNA –RF v opačnom smere ako rDNA transkripcia
- odstránenie CMG:
 - Mcm7 je polyubikvitinylovaná na K48
 - Cdc48 rozpozná polyubikvitinylovaný CMG komplex a oddelí ho od chromatinu
 - PCNA je z chromozómu odstránený na začiatku G2 fáze pomocou ELG1-RFC-like komplexu

Ľudský replizóm

- model vychádzal z kvasiniek
- obsahuje proteíny, ktoré nemajú ortológov v kvasinkách (rozpadnutie replizómu, stabilita replizómu a prepojenie replikácie s DNA opravou)
- CMG helikáza
 - MCM2-7+CDC45+GINS
 - N-vrstva = helikálne OB a ZnF domény
 - C-vrstva = ATPázové domény
- model vychádzajúci z cryoEM D.m. CMG:
 - vedúci reťazec je tlačný cez centrálny kanál MCM2-7, zatiaľ čo opožďujúci reťazec sa viaže mimo póru (MCM3 a MCM5 ZnF domény)
 - NTH (N-terminal hairpin) MCM7 –otočený k poslednému páru báz dsDNA –funkcia v separácii dvojšroubovice?
- Polε (POLE1 = Pol2 S.c. , POLE2 = Dpb2, POLE3 = Dpb3, POLE4 = Dpb4)
- **FCP** (Fork Protection Complex) -rýchly a efektívny postup replizómu, prepojenie replikácie a ďalších procesov (SCE) a aktiváciu checkpointov
 - TIMELESS-TIPIN (S.c. Tof1-Csm3)
 - **CLASPIN** (S.c. Mrc1)
- AND-1 (S.c. Ctf4) –trimér, „scaffold“ –základňa pre väzbu ďalších proteínov na replikačnú vidlicu

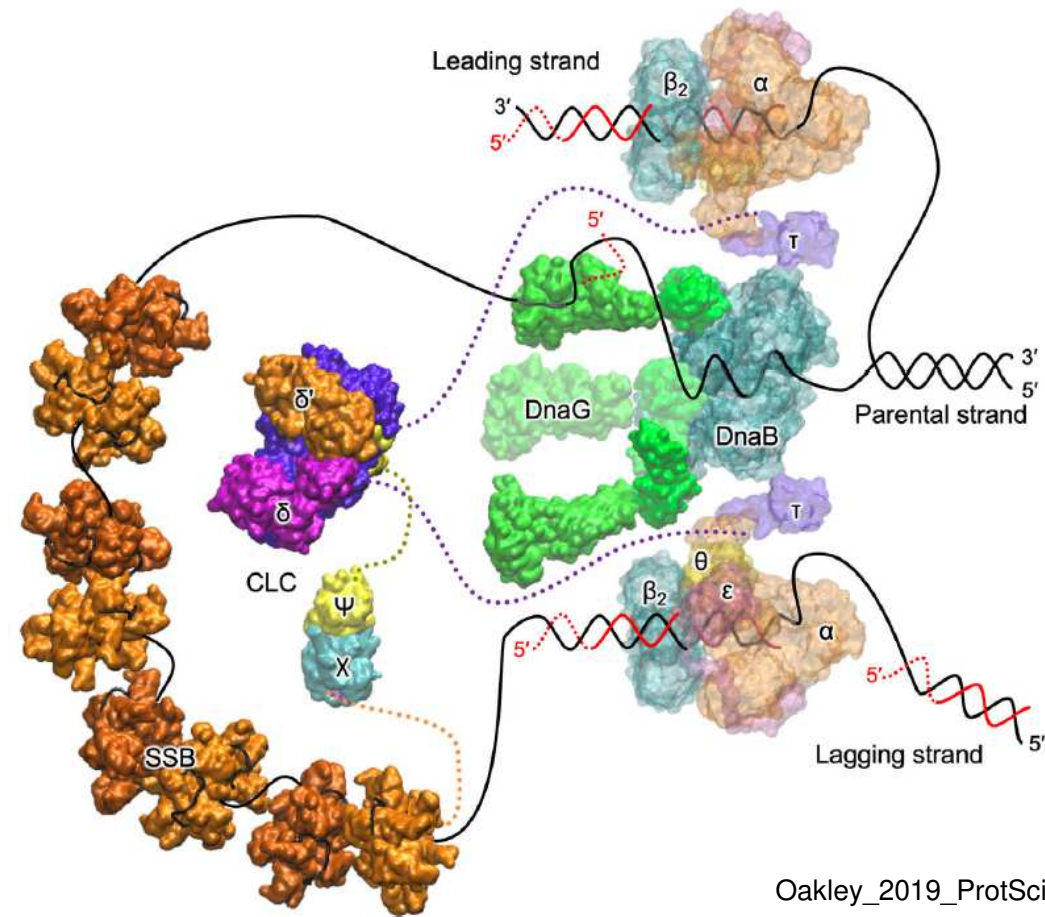
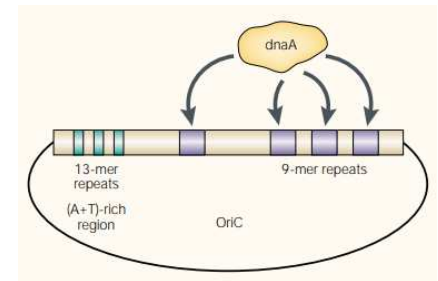


Cryo-EM štruktúra „jadra“ ľudského replizómu



Replikácia v baktériách *Escherichia coli*

- počiatok **oriC** (245 bp, **DnaA** sa viaže na 4 špecifické 9-méry → rozvolnenie DNA v 13-mérových repetíciách → naviazanie helikázy
- koniec **Ter** región naproti oriC (cirkulárny chromozóm)
- **DnaB** = helikáza
- **DnaG** = primáza -syntéza RNA primerov (10 nts)
- **SSB** –tetramer, ochrana ssDNA
- **DNA polymerase III** –heterotrimér: α , ϵ a θ –syntéza oboch reťazcov
 - PolIII α –syntéza DNA
 - PolIII ϵ –proofreading (3' – 5' exonukleáza)
 - PolIII θ –neesenciálna, stabilizuje ϵ
- **(PolIII β)₂** –kĺzavá svorka, procesivita polymerázy
- **CLC** (Clamp Loader Complex) –loader svorky
 - podjednotky PolIII $\delta(\gamma/\tau)$ ψ χ

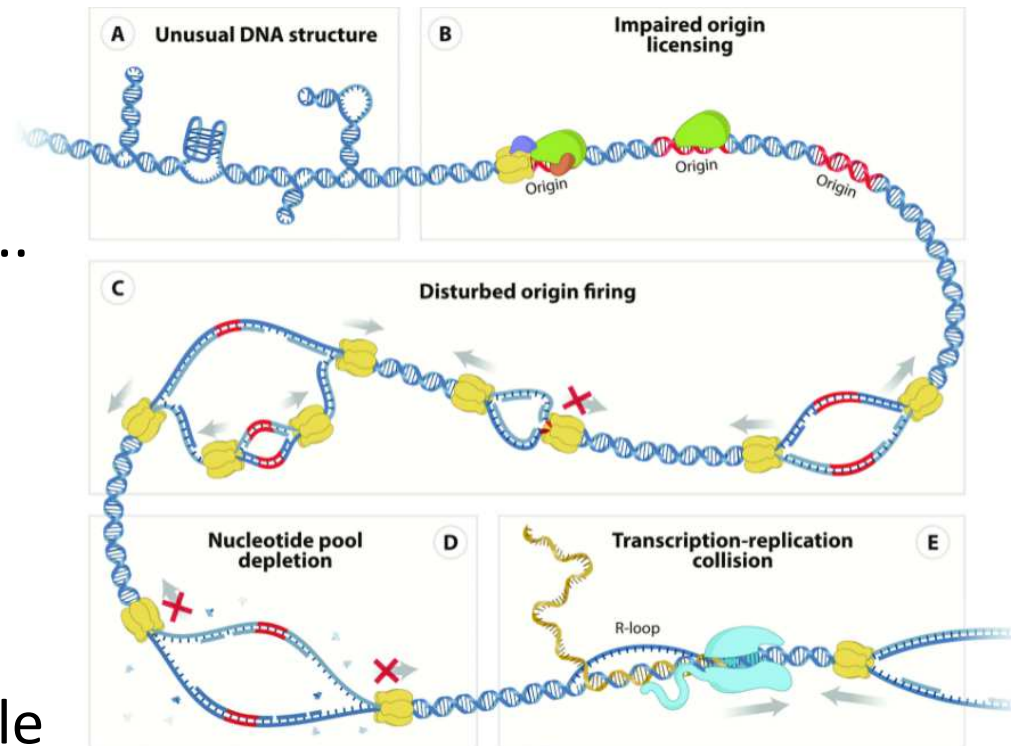


Replikácia v baktériách *Escherichia coli*

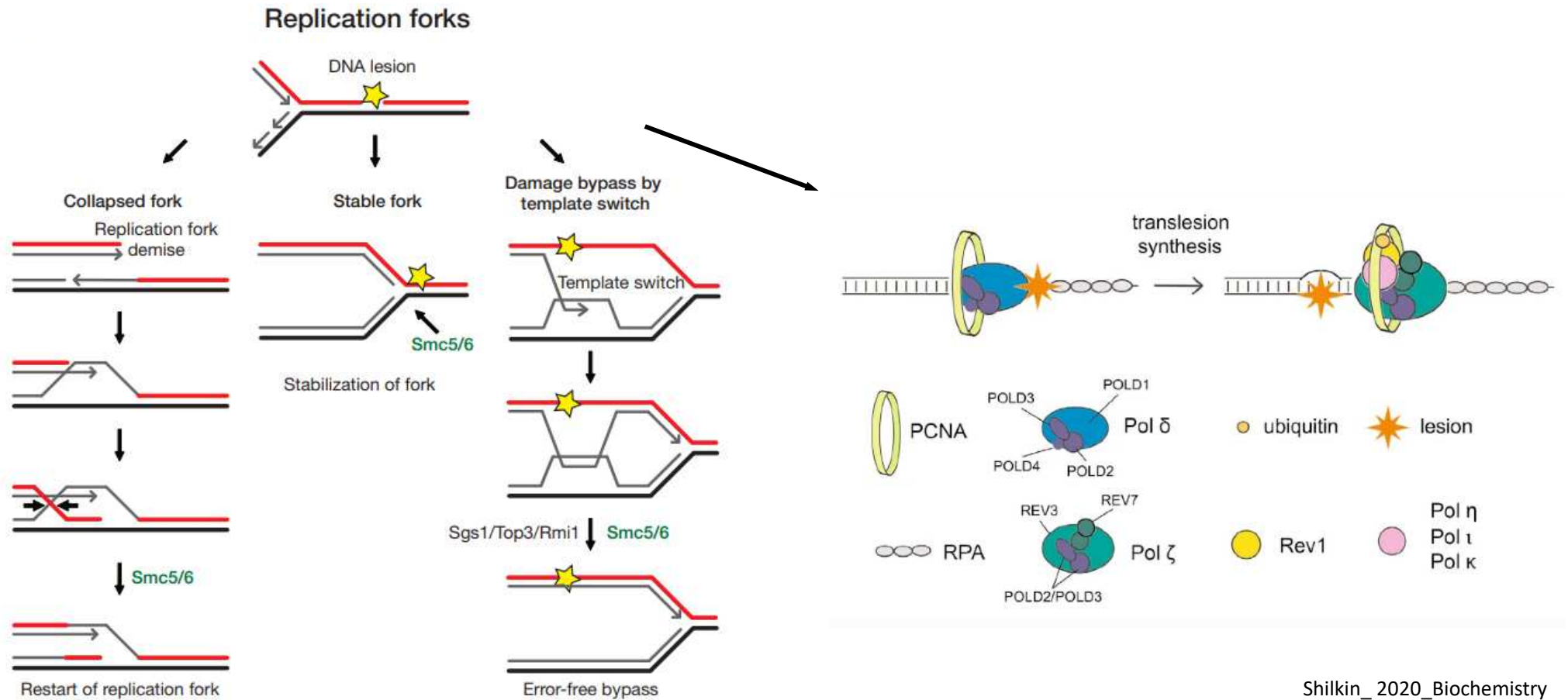
E. coli Gene	Enzyme/Protein Function	Description
<i>dnaA</i>	Initiator Protein	Melts DNA at <i>oriC</i> , exposing two template ssDNA strands
<i>dnaB</i>	Helicase	Unwinds the DNA helix at the front end of each replication fork during replication
<i>dnaC</i>	Helicase Loader	Loads the DnaB Helicase onto the ssDNA template strands
<i>dnaG</i>	Primase	Synthesizes RNA primers used to initiate DNA synthesis
<i>dnaE</i>	α -Catalytic Subunit of DNA Polymerase III	Catalytic subunit of the main replicative polymerase during DNA replication
<i>dnaQ</i>	ϵ -Editing Subunit of DNA Polymerase III	Editing subunit of the main replicative polymerase during DNA replication
<i>dnaN</i>	β -clamp subunit of DNA Polymerase III	Clamping subunit of the main replicative polymerase during DNA replication
<i>polA</i>	DNA Polymerase I	Processes Okazaki fragments and also fills in gaps during DNA repair processes
<i>polB</i>	DNA Polymerase II	Proofreading and editing, especially on lagging strand synthesis and some involvement in DNA repair
<i>ssb</i>	Single Stranded Binding Proteins (SSB)	Bind with single-stranded regions of DNA in the replication fork and prevent the strands from rejoining
A dimer encoded by <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i>	DNA Gyrase	Type II Topoisomerase involved in relieving positive supercoiling tension caused by the action of Helicase
A dimer encoded by <i>parC</i> and <i>parE</i>	Topoisomerase IV	Type II Topoisomerase involved in decatenation of daughter chromosomes during DNA replication
<i>ligA</i>	DNA Ligase	Fixes nicks in the DNA backbone during DNA replication, DNA damage, and DNA repair processes
<i>Note: Only the genes involved in the formation of the catalytic domain of DNA polymerase III are listed</i>		

Replikačný stres = spomalenie alebo zastavenie replikačných vidlíc

- mutácie, neobvyklé DNA štruktúry, CFS (Common Fragile Sites), konflikty replikácia-transkripcia, pôsobenie chemikálií /liekov, aktivácia onkogénov ...
- ak nie je pod kontrolou –kolaps replikačných vidlíc –tvorba DSB (Double Strand Breaks) –narušenie stability genómu (mutácie, Copy Number Alterations CNAs, chromozomálne preskupovanie,...)
- mutácie v replikačnej mašinérii a kontrole –vývojové vady, stárnutie, anémia, rakovina,...



Replikačný stres

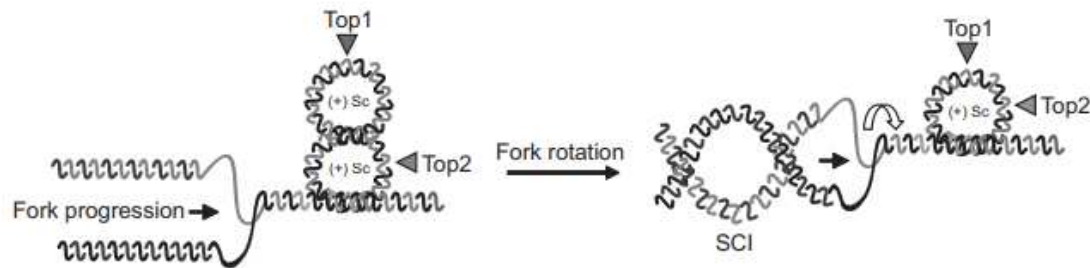


Kegel and Sjögren_ 2010_ Cold Spring Harb Symp Quant Biol

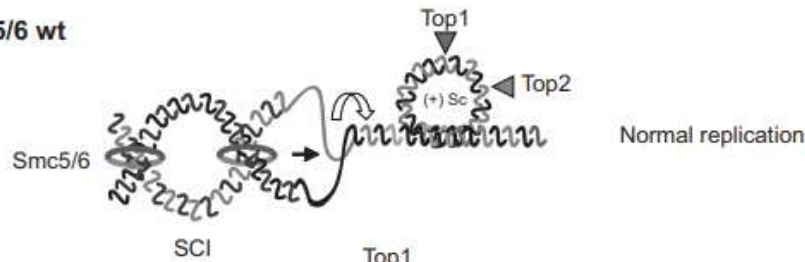
Shilkin_ 2020_ Biochemistry

SMC5/6 v replikácii

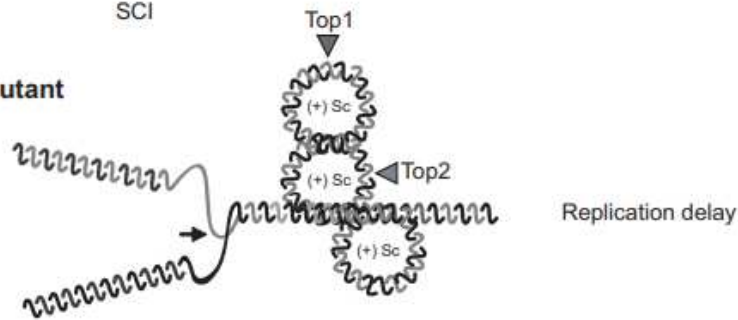
Translokáza, ATPázová aktivita, väzba ssDNA, dsDNA



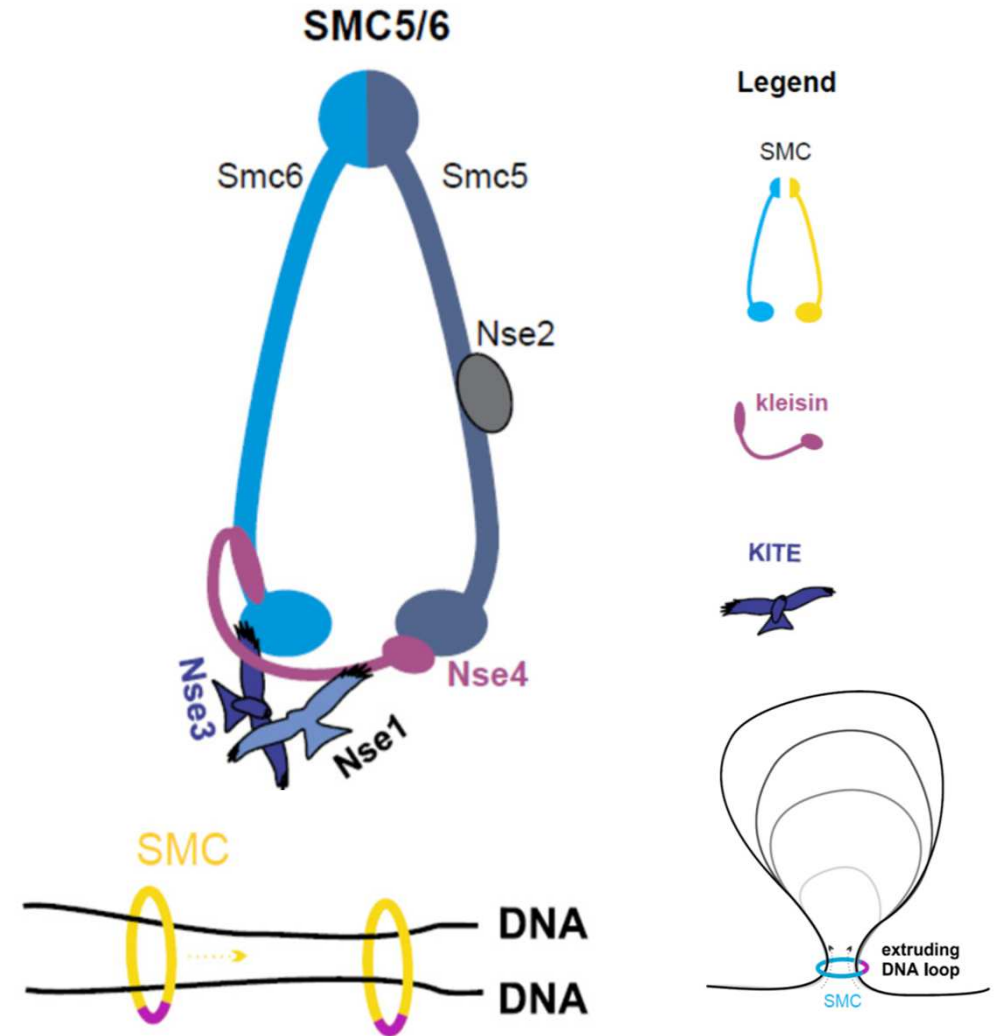
Smc5/6 wt



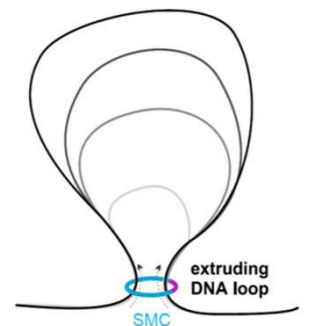
smc5/6 mutant



Kegel and Sjögren_ 2010_ Cold Spring Harb Symp Quant Biol



Legend



upravené z Paleček_ 2018_ Genes

Ďakujem za pozornosť 😊

