

Proteínové komplexy v DNA replikácii

CG030 Struktura a funkce proteinových komplexů

Barbora Štefanovic, Ph.D.

6.4.2023

Replikácia

- základná funkcia bunky = špecifikovať biochemické vlastnosti transkriptóm + proteóm = zabezpečenie a regulácia biochemických procesov v bunke
- pokračovanie v dcérskych bunkách = potreba replikácie
- replikácia = duplikácia genómu materskej bunky a jej prenos do dcérskej bunky
- presnosť verzus mutácie
- mechanizmy DNA replikácie sú vysoko konzervované

Trošku histórie

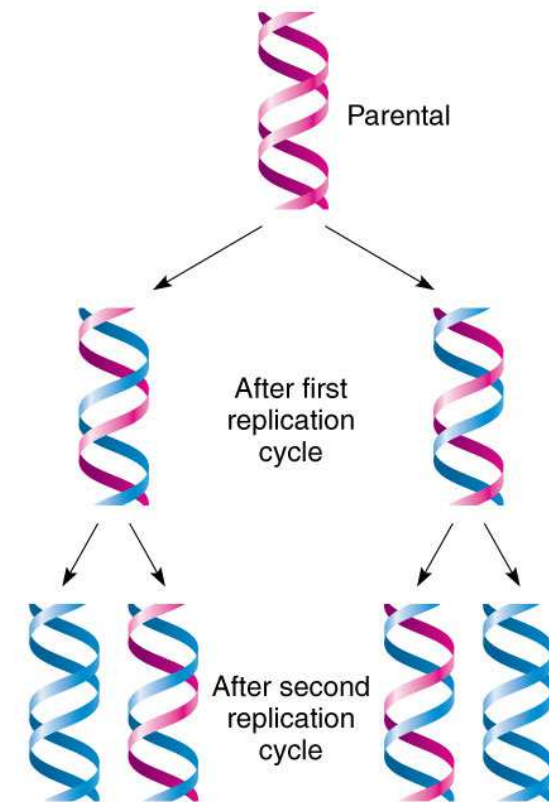


- replikácia študovaná od objavenia double-helix štruktúry
- Watson & Crick, Nature, 1953:

„It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.“

- každé vlákno slúži ako templát pre syntézu druhého komplementárneho vlákna = semikonzervatívny model

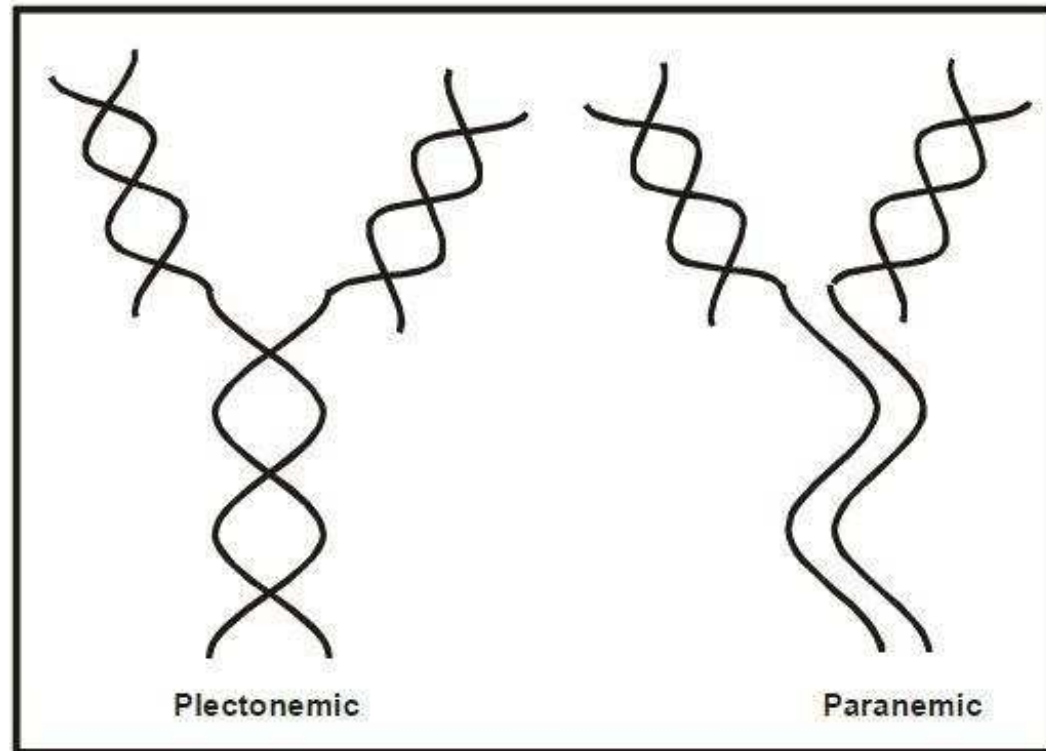
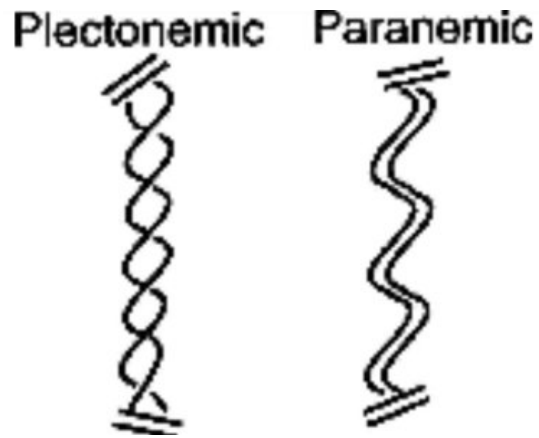
a) Semiconservative model



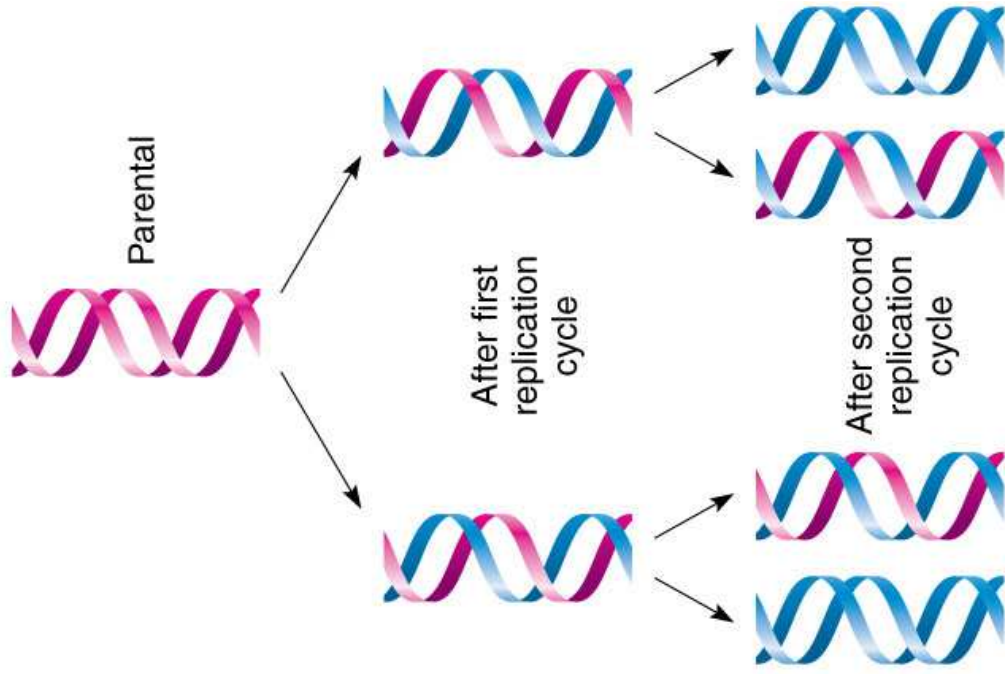
© 2010 Pearson Education, Inc.

- **topologický problém** –aby sa mohla DNA replikovať, je potrebné rozpletenie dvojšroubovice = zapletenie vlákien a rotácia
- pre predstavu:
 - 1 otáčka/10 bp, kompletná replikácia DNA molekuly ľudského chromozómu 1 (250 Mb), by vyžadovala 25 miliónov rotácií
- naopak cirkulárna dsDNA (baktérie, bakteriofágy) bez voľných koncov nemôže rotovať = nereplikuje sa podľa scény Watsona-Cricka
- Je navrhnutá dvojšroubovica skutočná štruktúra DNA???

Plektonemické vs. paranemické vinutie DNA



a) Semiconservative model

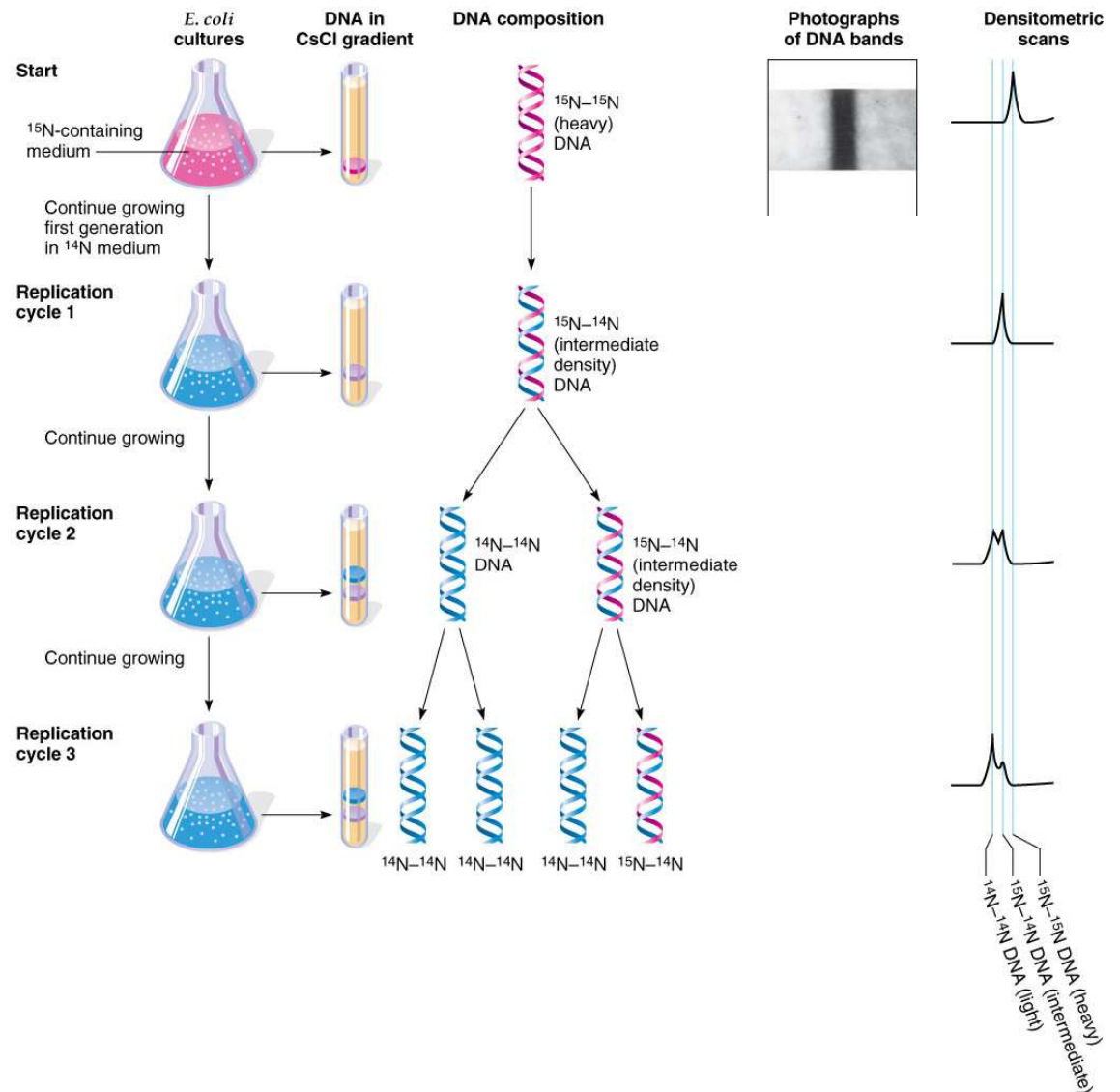


Meselson-Stahl experiment 1958, Nature



značenie DNA pomocou ^{15}N + centrifugácia
v gradiente CsCl
= odlíšenie rodičovských a dcérskych
DNA molekúl

Replikácia DNA
je
semikonzervatívna
(Watson and Crick,
1953, Nature)



DNA topoizomerázy

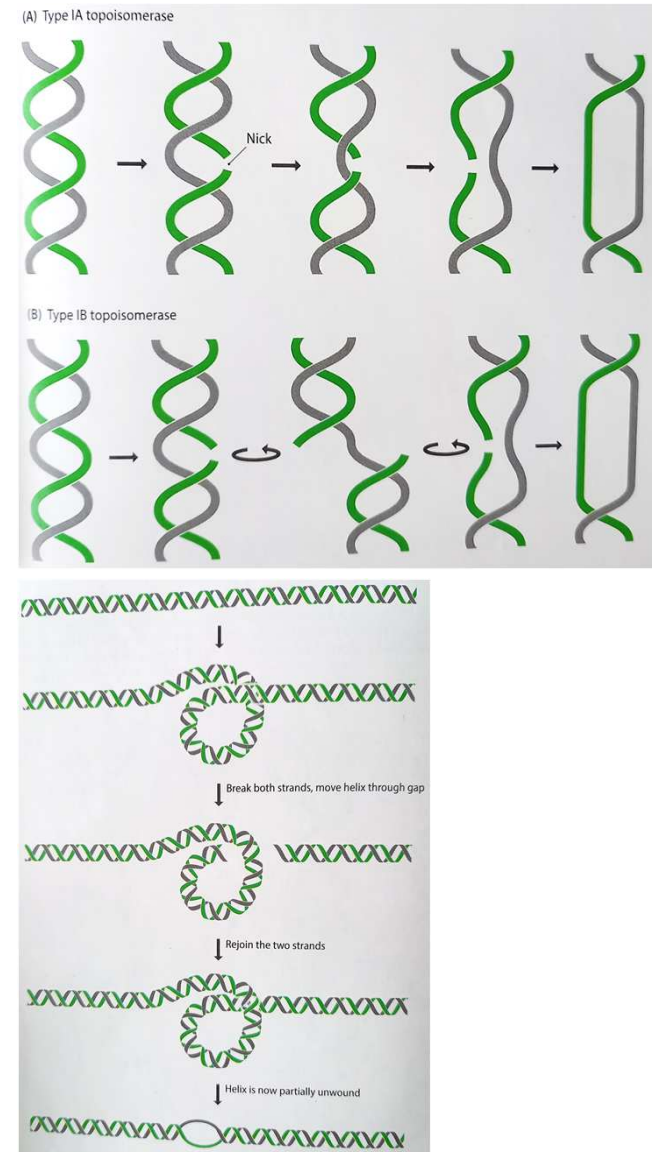
- znižujú nadmerné vinutie, ktoré vzniká pri pohybe replikačnej vidlice
- zlom + znovu-spojenie vlákien
- **kovalentná väzba** v aktívnom mieste enzýmu
- 2 typy:

typ I -zlom v 1 vlákne DNA

IA –prenos cez zlom (počet vinutia -1), Top3

IB –rotácia okolo neporušeného vlákna, hlavné topo eukaryot

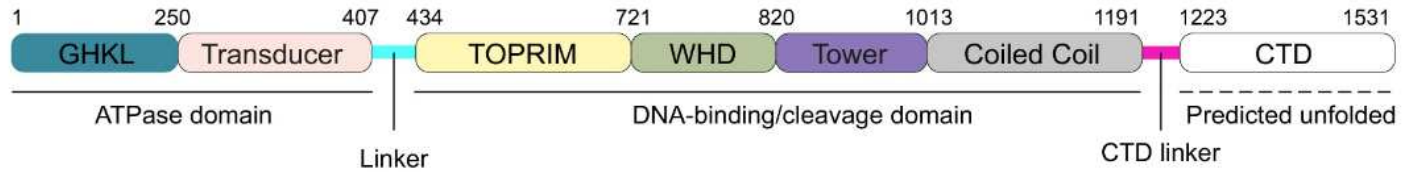
typ II –zlom v oboch vláknach (IIA, IIB, počet vinutia -2)



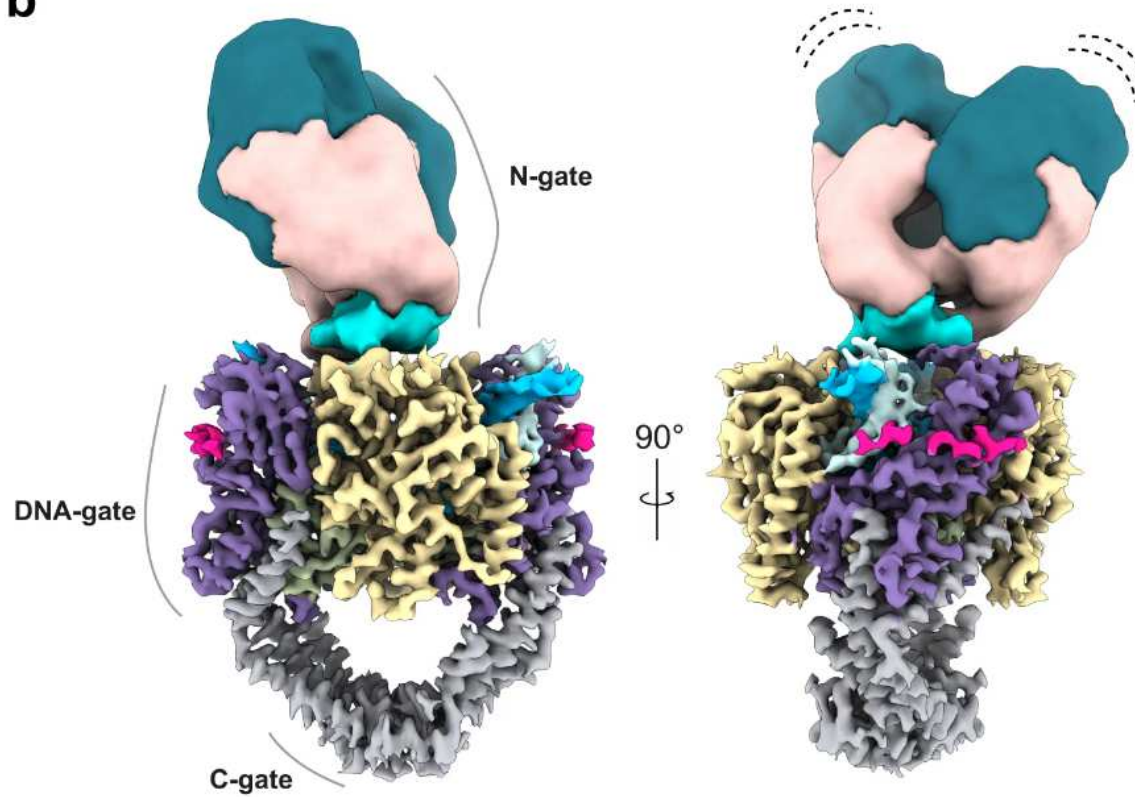
Human topoisomerase II α

cryo EM structure, 3.6 Å

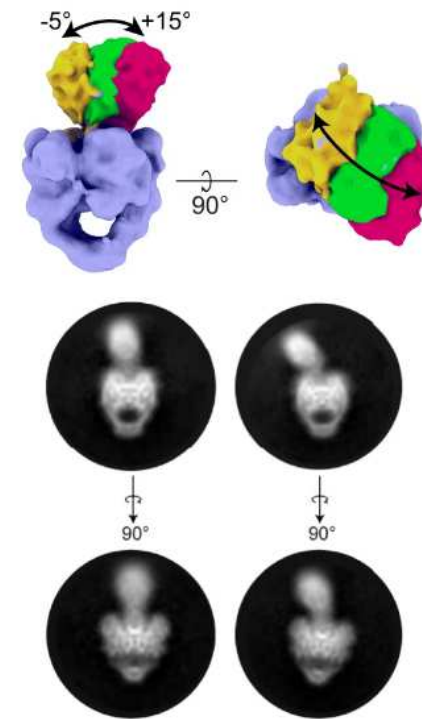
a



b

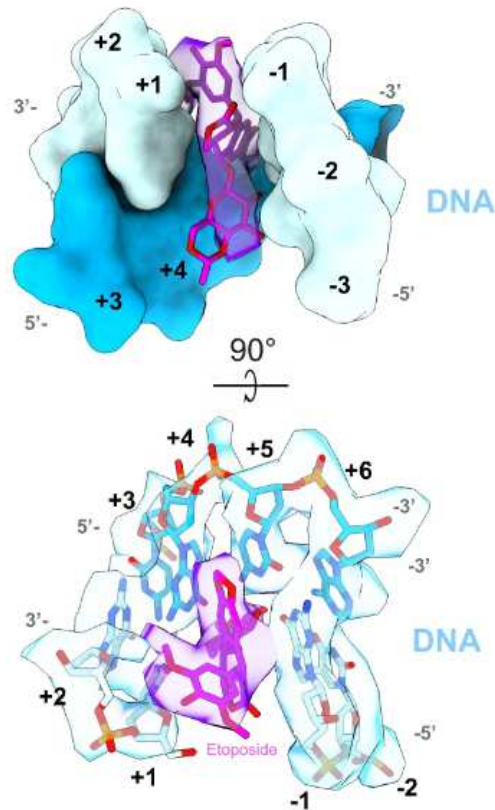
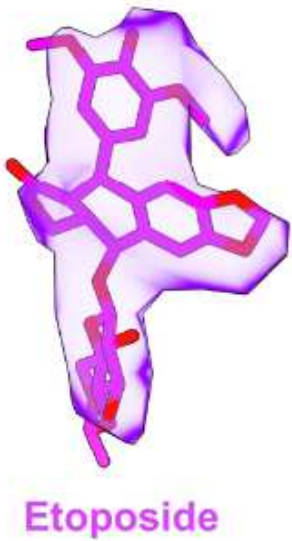
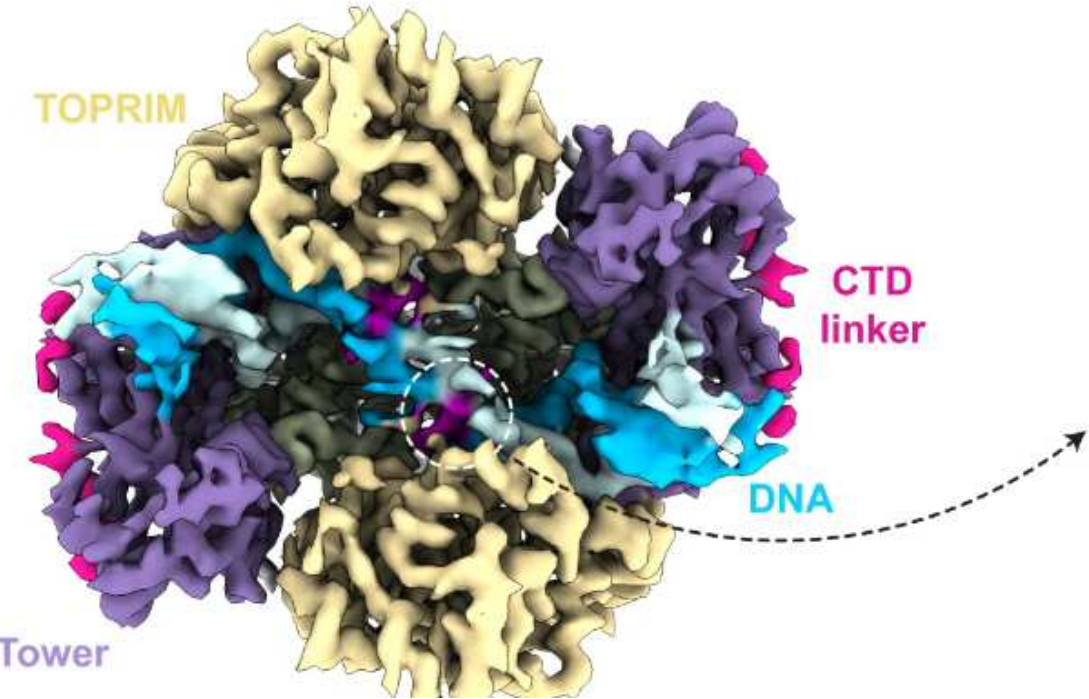


c



Human topoisomerase II α

cryo EM structure, 3.6 Å



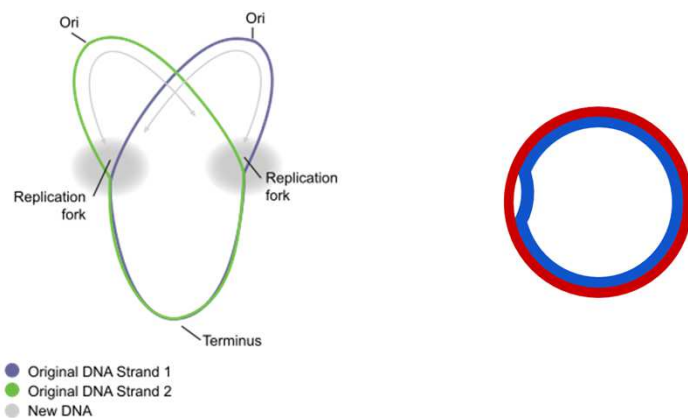
DNA replikácia v číslach

Prokaryota (**E.coli**)

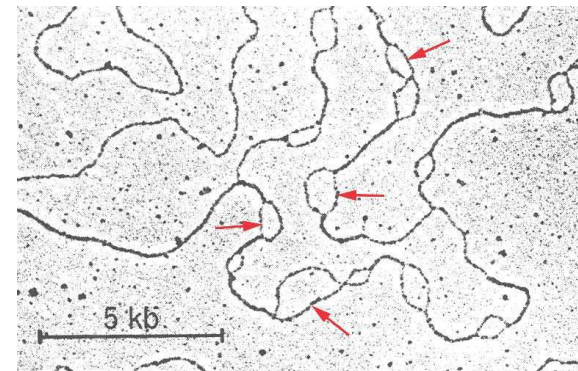
- Genóm 4.5×10^6 bp
- Presnosť 10^{-9} - 10^{-11} errors/bp
- Rýchlosť ~ 60 kb/min
- Počiatok replikácie: 1
- 30 min/celý genóm

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](#)

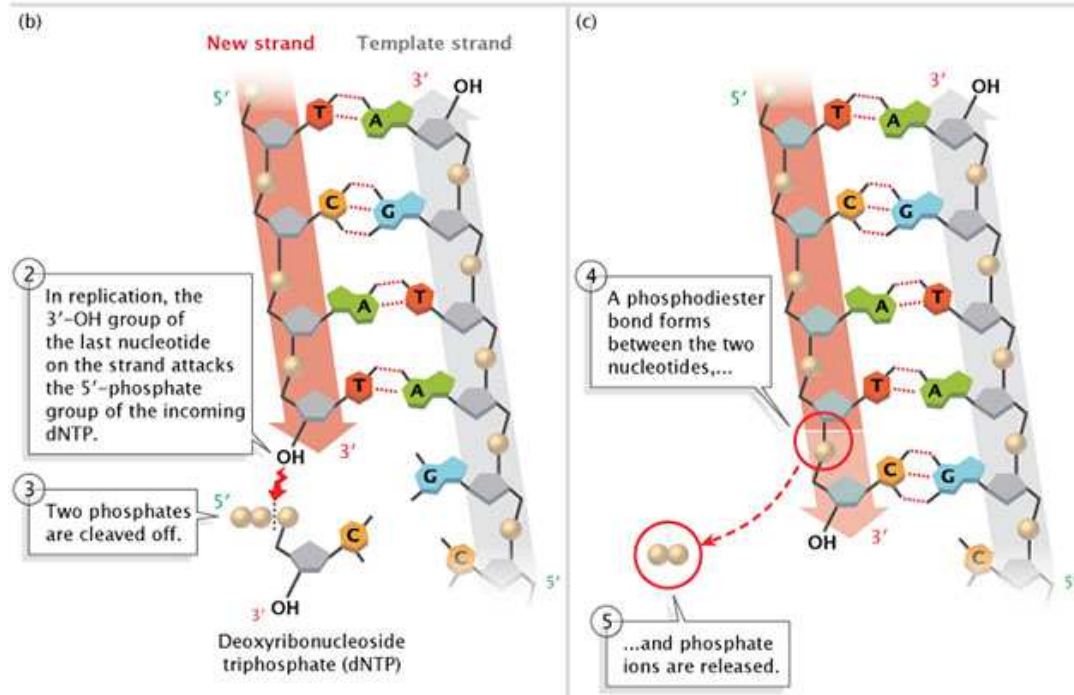
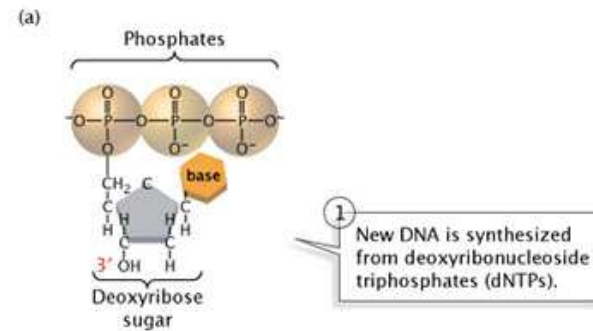
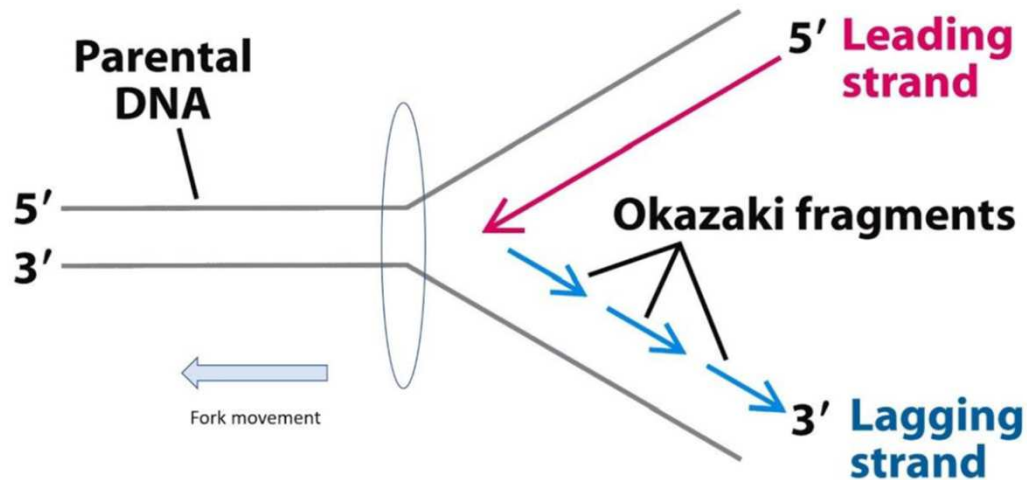


Dr. B. Fristensky and N. Brien, <https://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/l12/l12.html>

DNA replikácia 5' → 3'

- kontinuálna vs. diskontinuálna replikácia (leading vs lagging strand)
- Okazakiho fragmenty (200/1000-2000 nts)

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



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

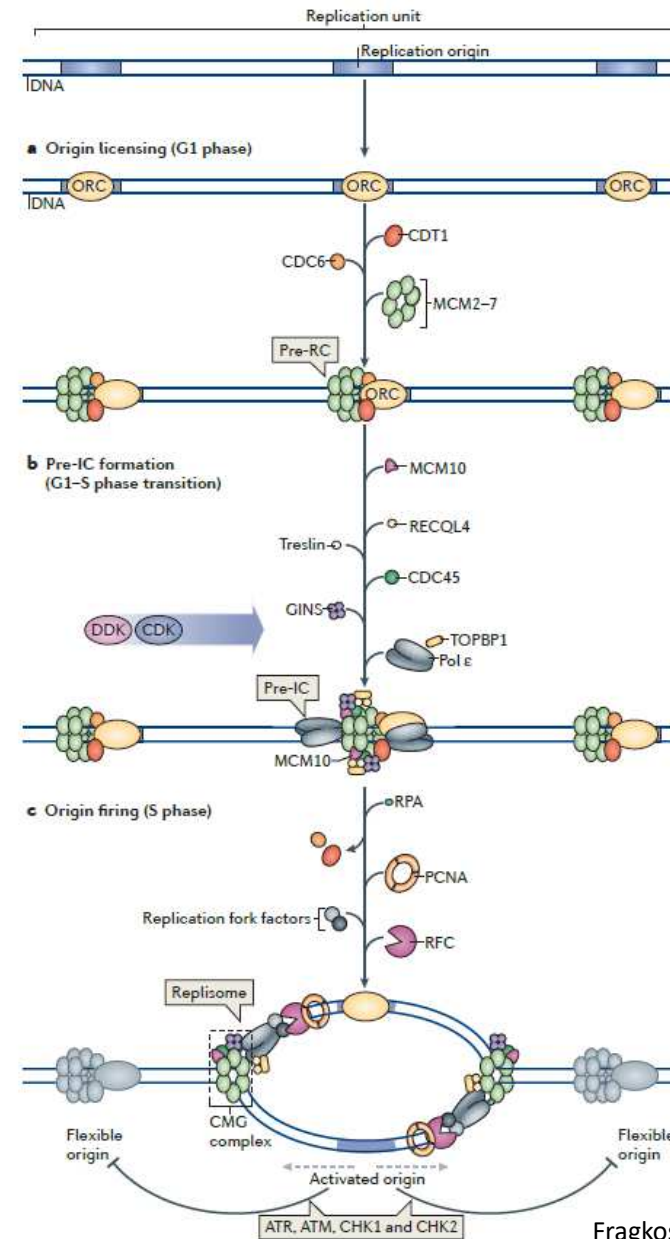
(topologický stres, ťažko replikovatelné lokusy, proteíny na DNA, transkripcia, poškodená DNA)

3. terminácia

- ukončenie replikácie

Proteínové komplexy

- ORC1-6
- MCM2-7 helicáza
- 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



Počiatky replikácie

- **ARS** Autonomously Replicating Sequences
- v kvasinkách *S.cerevisiae* (cca 400) 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

- **Early replicating regions:**

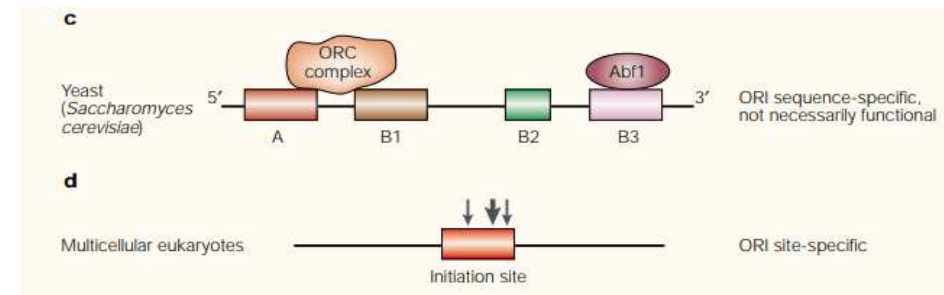
H3K4me1/2/3, H3K9ac, H3K18ac, H3K36me3, a H3K27ac

euchromatin

- **Late replicating regions:**

H3 a H4 hypoacetylácia, H3K9 a H3K27 metylácia

často tkanivovo-špecifické

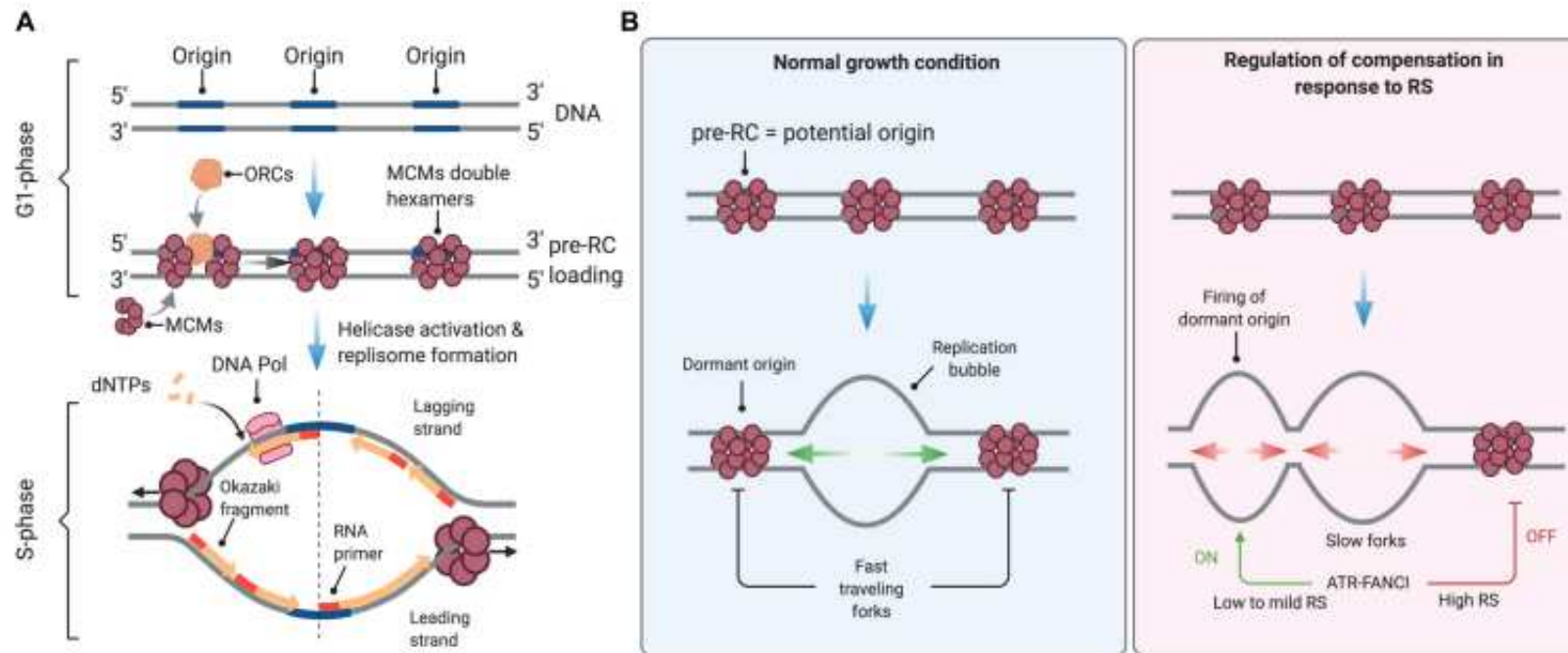


Méchalí, 2001_NatRev_Genetics

Metódy štúdia počiatkov replikácie:
SNS-seq –short nascent strand seq
Bubble-seq –seq replikačných bublín

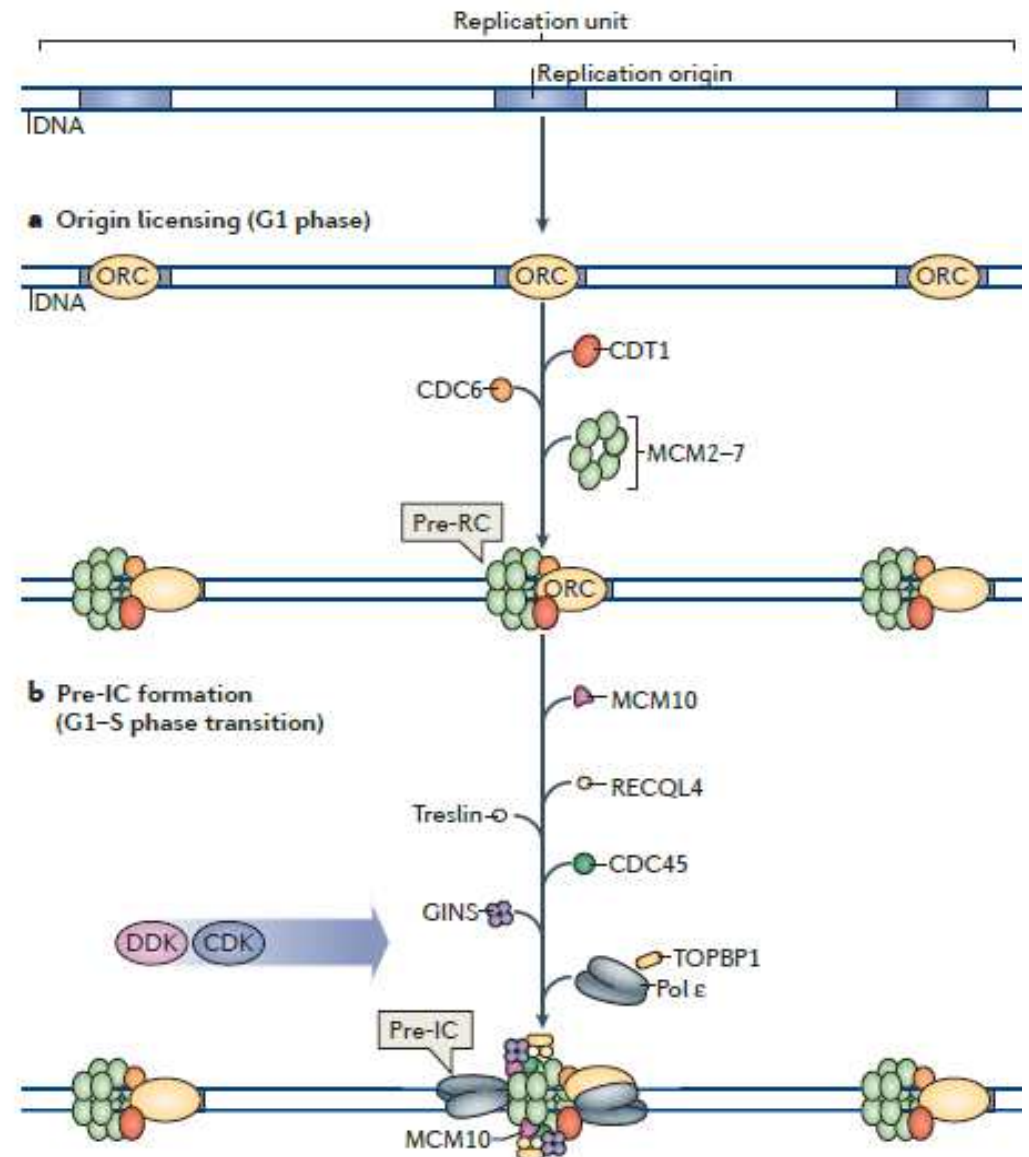
Origin licencing /Origin firing

- M/G1 fáza
- **Origin licencing** = označenie všetkých potenciálnych počiatkov (ORC + inaktívna MCM2-7)
- **Origin firing** = výber aktívnych počiatkov, na ktorých dôjde k vytvoreniu replikačnej vidlice a syntéze DNA
- ostatné počiatky –**backup** pre prípad spomalenia alebo zastavenia susedných replikačných vidlíc
- mechanizmy, ktoré **zabraňujú nedostatočnej alebo naopak nadmernej DNA replikácii**
- aktivovaných len **10-20%** (cicavce) MCM2-7



Iniciácia

1. naviazanie MCM2-7 helicázy 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 helicáza)
4. „priming“ DNA replikácie



upravené z Fragkos et al, 2015_MolCellBiol

ORC Origin Recognition Complex

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

- ATPáza (AAA+ rodina)

Orc1-5 - pentamérny kruh

- evolučne príbuzné

- AAA+ modul, C-term. WH - prvý kontakt s DNA

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

- Orc1 BAH doména – nukleozóm-remodelačná aktivita (H2A, H2B)

- Orc1, Orc5 viažu ATP, len Orc1 má ATPázovú aktivitu

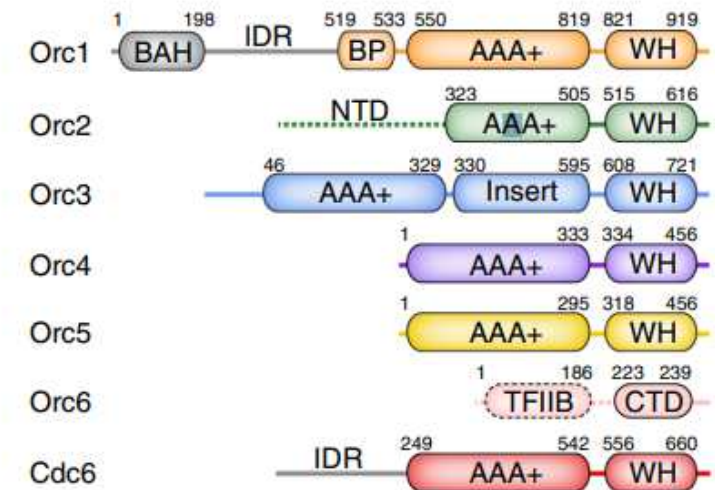
Orc6

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

- esenciálna pre udržanie pre-RC komplexu

DNA sa viaže do centra pentaméru a dochádza k jej ohybu → rekrutovanie MCM2-7 + Cdt1

Domain architecture of DmORC subunits and Cdc6



upravené zo Schmidt and Bleichert_2020_NatComm

BAH = bromo-adjacent homology domain

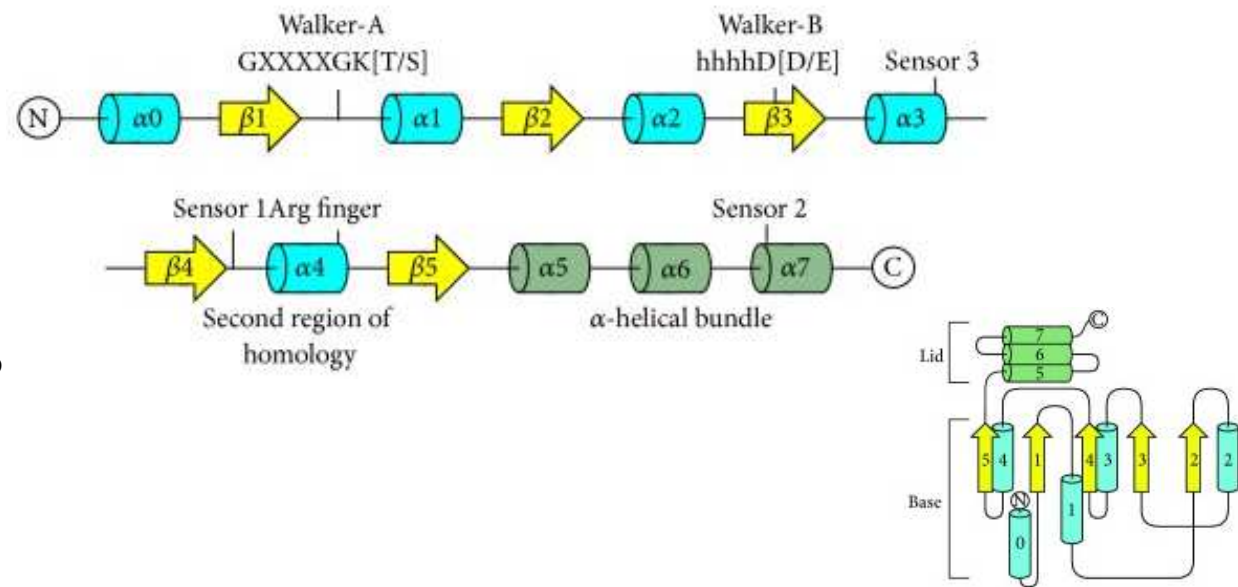
IDR = intrinsically disordered region

BP = basic patch

TFIIB = transcription factor IIB-like domain

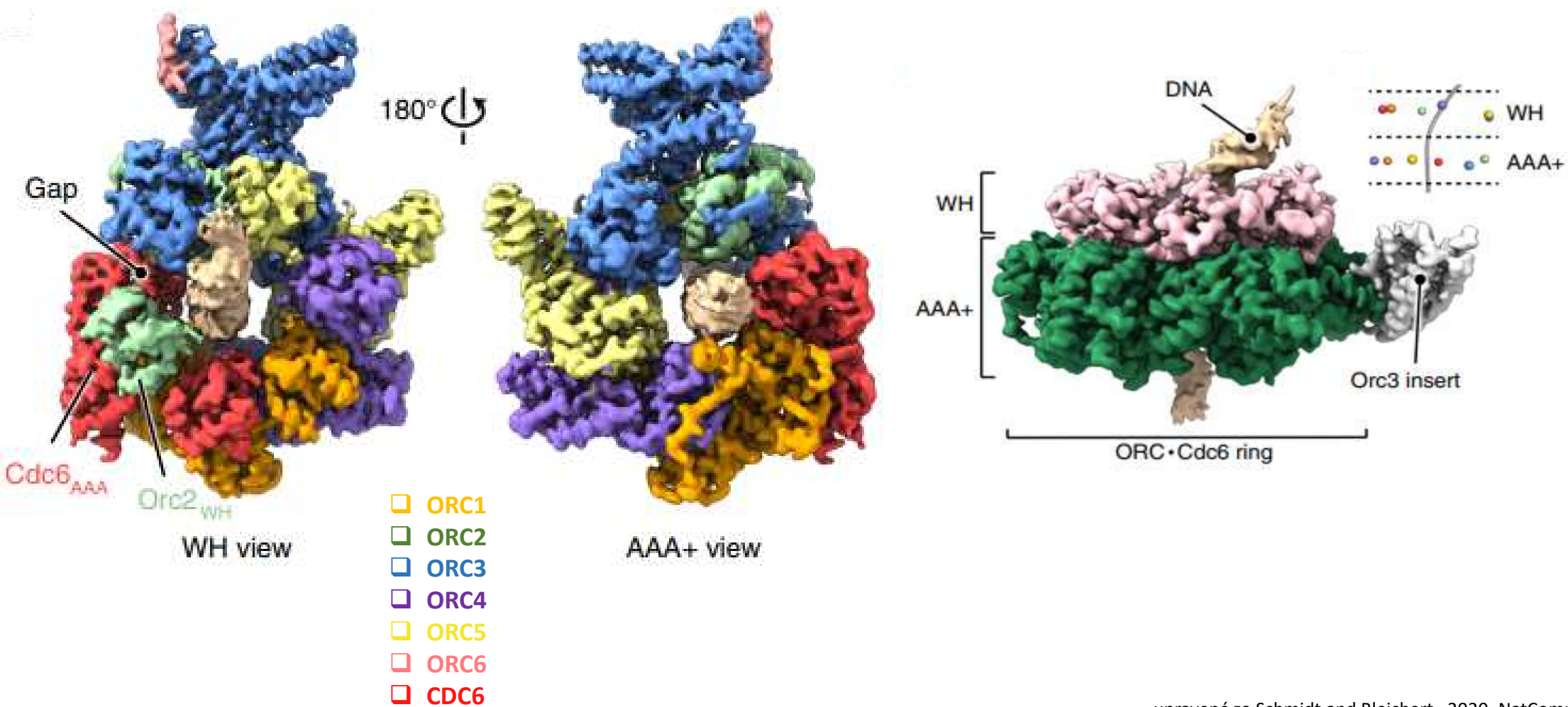
AAA+ modul

- 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



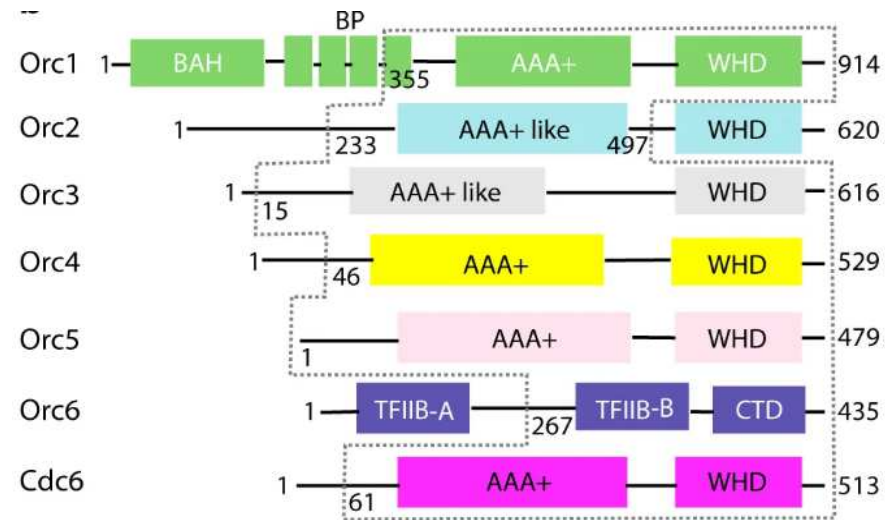
ORC *D. melanogaster*

cryo EM

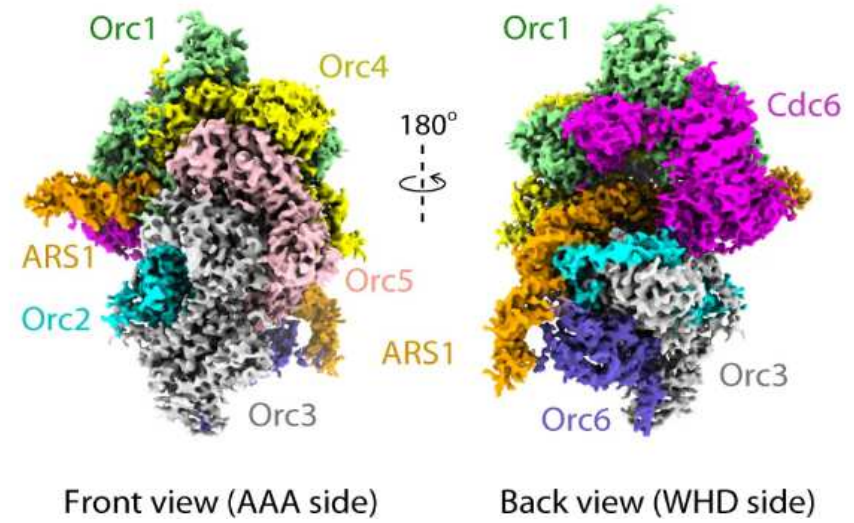


upravené zo Schmidt and Bleichert_2020_NatComm

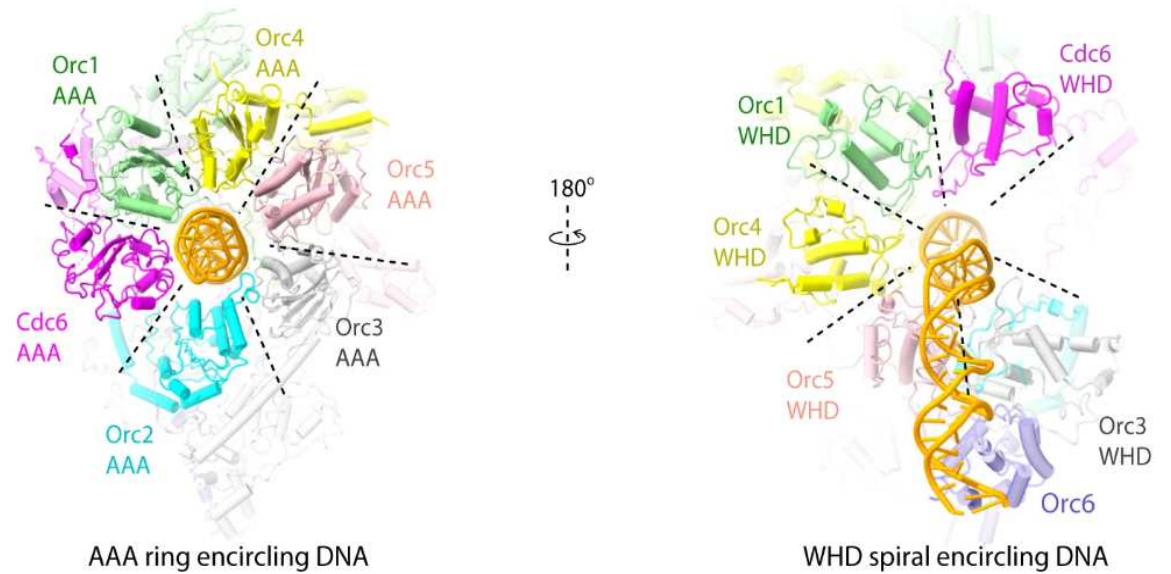
ORC *S.cerevisiae*



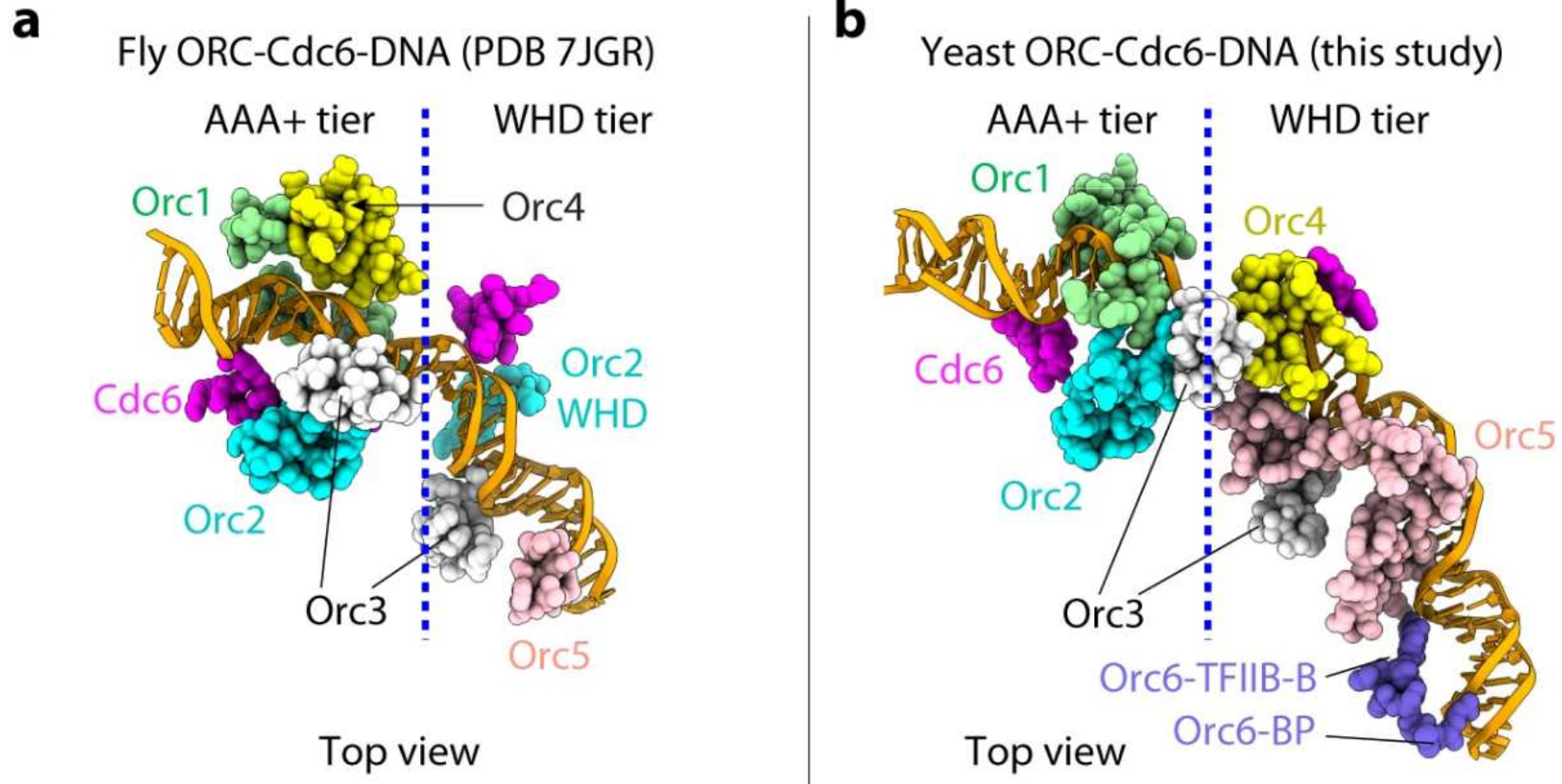
c



d



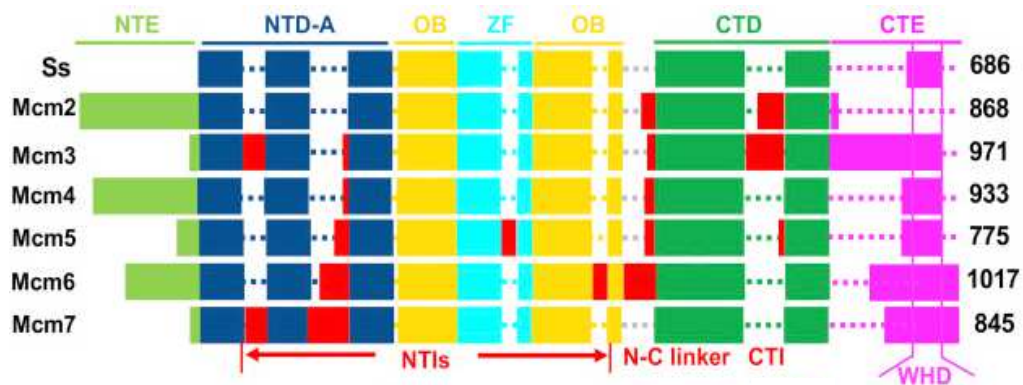
Comparison of DNA binding by ORC complex *D.melanogaster* vs *S.cerevisiae*



MCM2-7 -helikáza

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

Ss, *Sulfolobus solfataricus*



Zhai et al_ 2017_MolCell

- 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 v G1

- pomocou ORC-Cdc6 komplexu (ATPázová aktivita Cdc6)
- Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1)
- sumoylácia Mcm3 podjednotky = zabránenie predčasnej aktivácie

Aktivácia počas S fáze

- fosforylácia pomocou Cdc7/Dbf4 komplexu
- origin firing

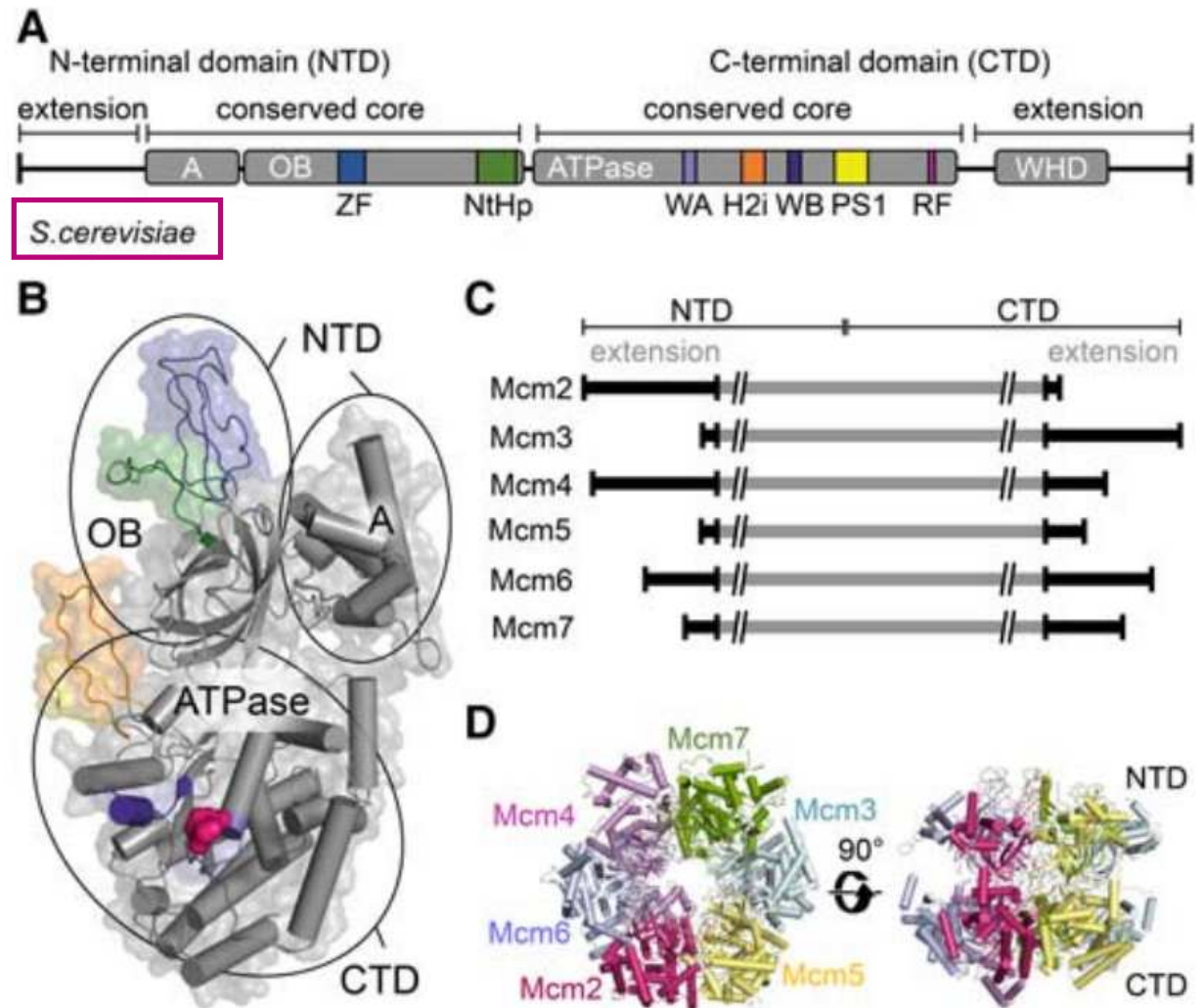
MCM2-7 –štruktúra podjednotiek

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

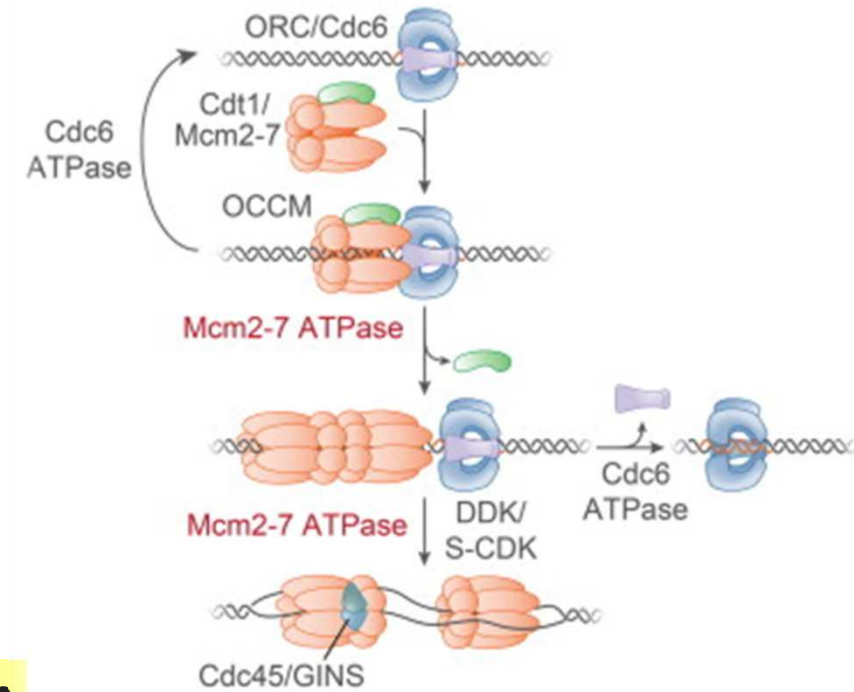
- **AAA+ ATPázová doména**
- evolučne konzervovaná
- Walker A** (väzba ATP), **H2i -helix 2 insertion β hairpin** (väzba DNA), **Walker B** (hydrolýza ATP), **PS1 -presensor 1** (väzba DNA), **RF -arginine finger**
- **Degenerovaná Winged Helix**
- proteín-interakčné motívy



Aktivácia MCM helikázy

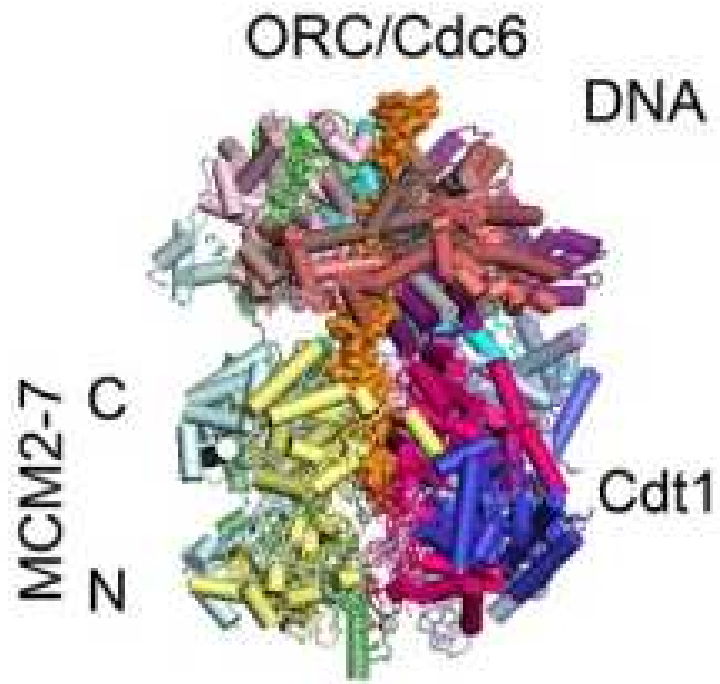
S.cerevisiae:

- Cdt1 –väzba na N-koncové regióny Mcm2, Mcm6 a Mcm4 = stabilizácia, single hexamer (SH) je naviazaný na ORC-Cdc6 v replikačných počiatkoch = ORC–Cdc6–Cdt1–MCM2–7 (**OCCM**) komplex
- naviazanie druhého MCM2/7 komplexu a tvorba „head-to-head“ dvojitého hexaméru (**DH**) = pre-replikačný komplex (pre-RC)
- pre-RC nemá helikázovú aktivitu až do S-fáze
- G1/S-fáza –DDK (Dbf4-dependent kinase) + S-CDK (S-phase-specific cyclin-dependent kinase) = tvorba **dvoch** aktívnych Cdc45–Mcm2–7–GINS (**CMG**) helikáz (pre-IC)



A

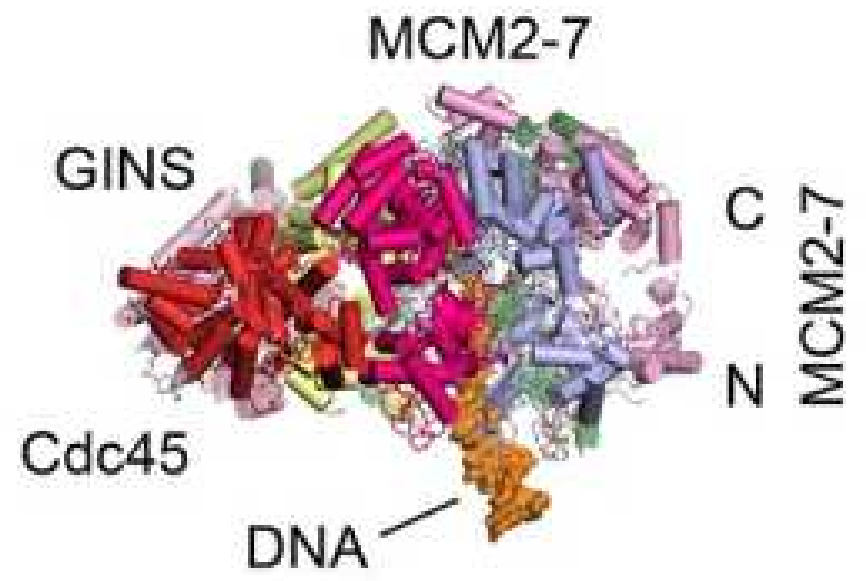
OCCM

**B**

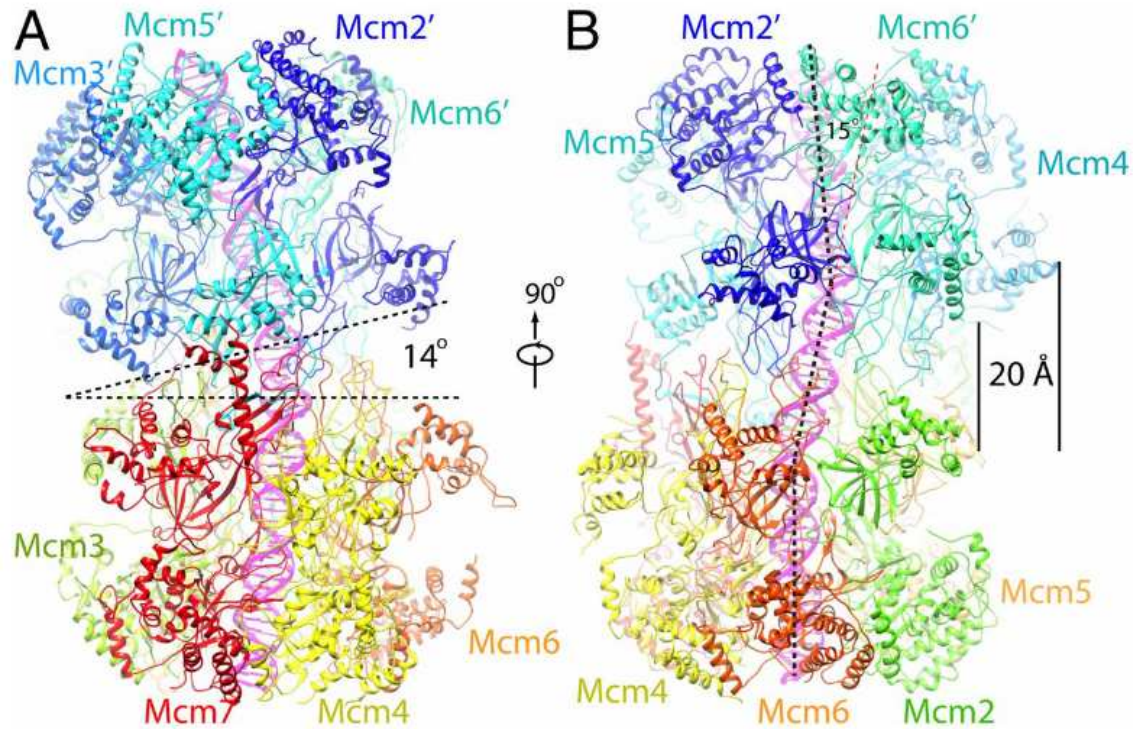
DH

**C**

CMG

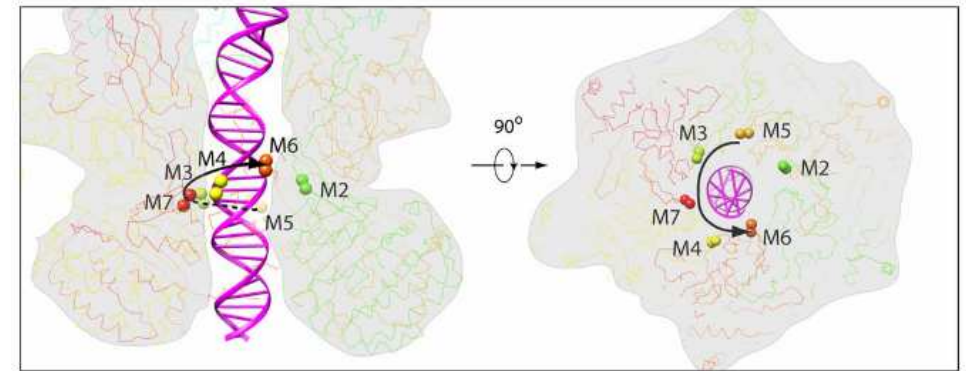


MCM2-7 –cryo-EM štruktúra, *S.cerevisiae*

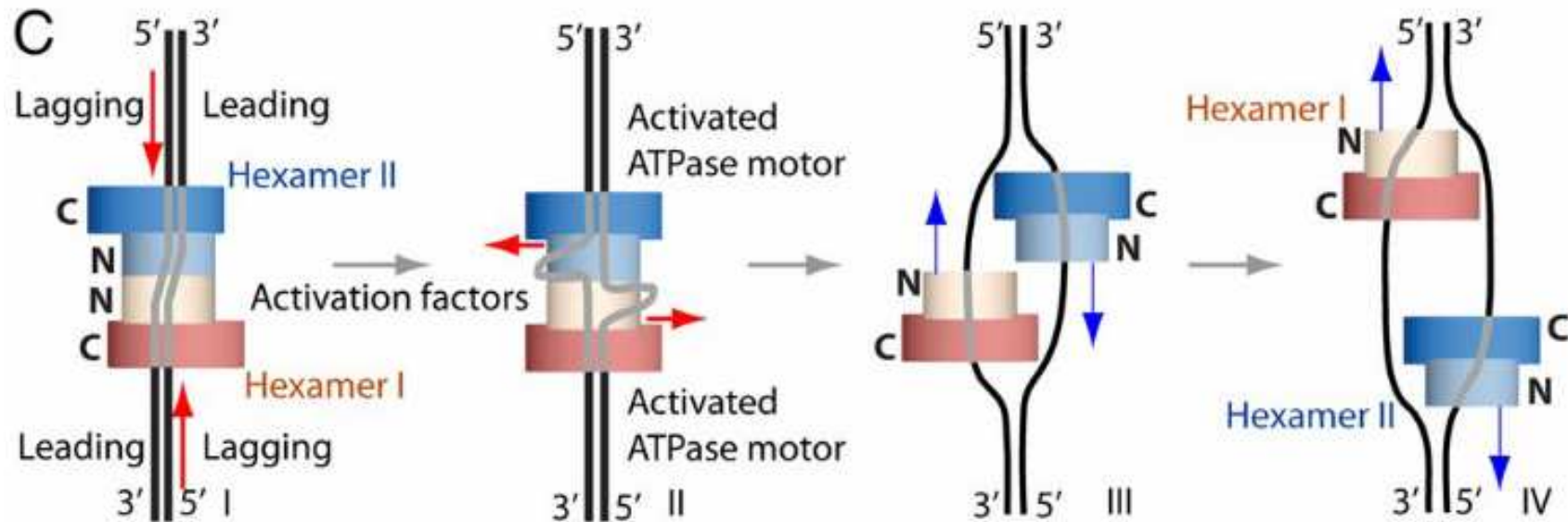


Kontakty s DNA:

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



A lagging-strand DNA extrusion model

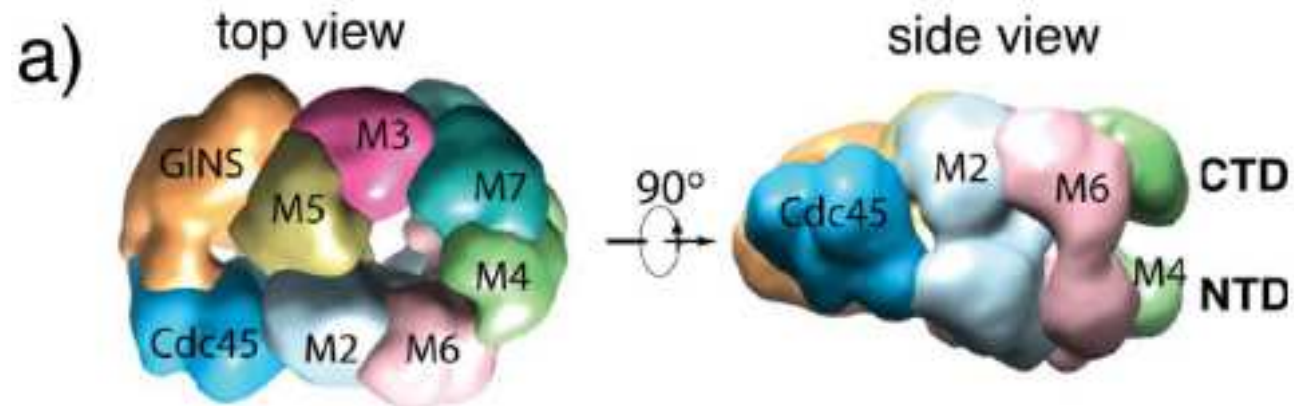


Noguchi et al_2017_PNAS

- 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. - dve aktívne helikázy putujú proti sebe v smere 3'→ 5'
- IV. - obojsmerný pohyb replikačnej vidlice

CMG komplex

- MCM2-7 hexamér
- GINS komplex
- Cdc45



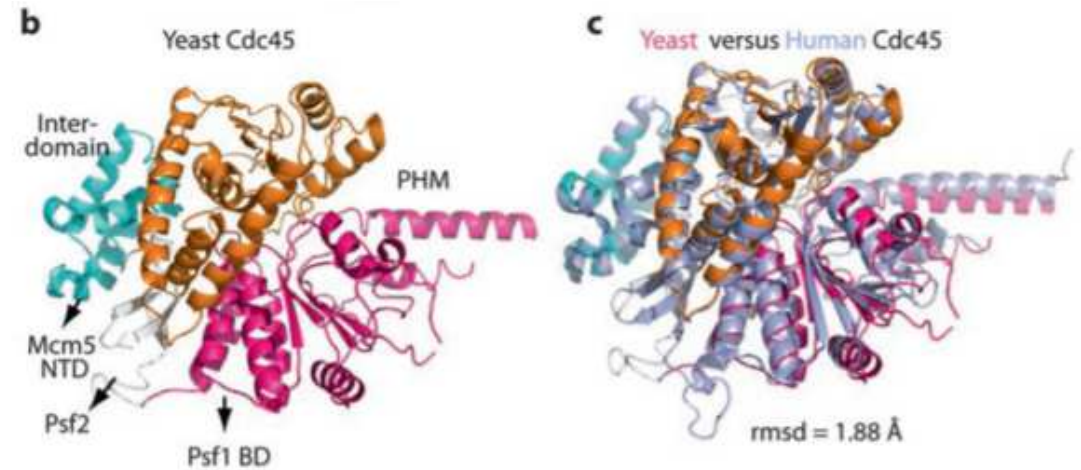
Sun et al_ 2016_Nucleus

- 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

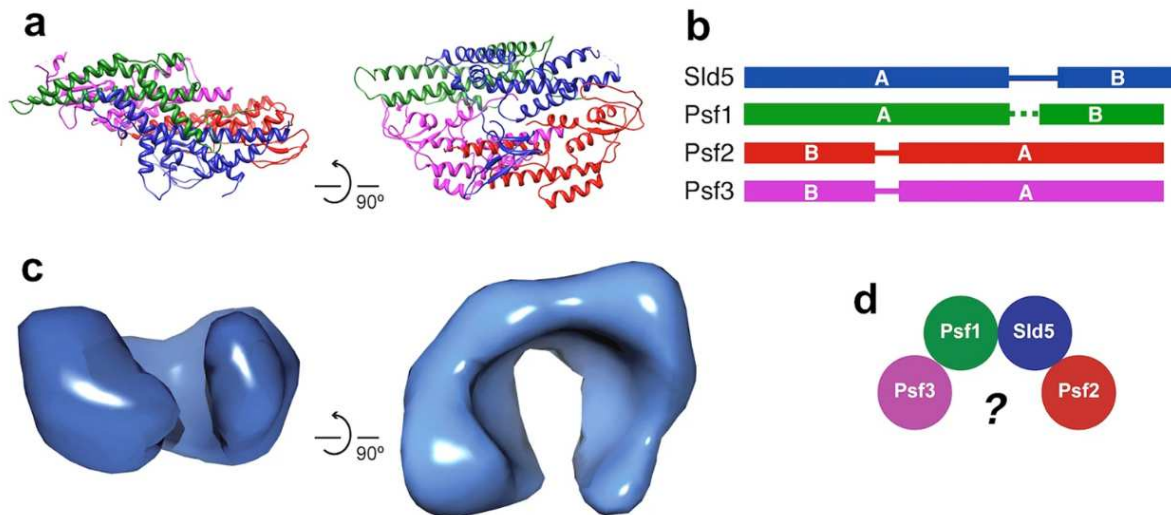
Cell Division Cycle 45

- 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 Pol ϵ
- Meier-Gorlin syndróm

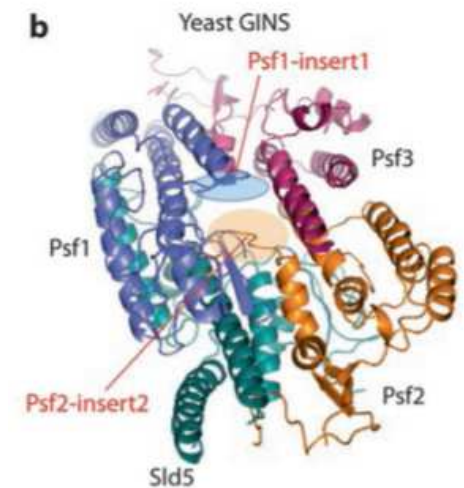
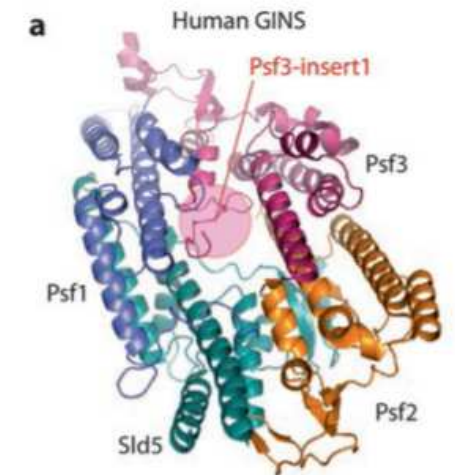


GINS

- go-ichi-ni-san (5-1-2-3) = 4 podjednotky: Sld5, Psf1, Psf2, and Psf3
- má centrálný 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. Pol α , Pol ϵ ...)
- GINS ani Cdc45 nemajú ATPázovú aktivitu



Carroni et al_ 2017_SciRep



upraveno z Bai et al_ 2017_Adv Exp Med Biol

Elongácia

- na vedúcom a opožďujúcom sa vlákne
- väzba RPA na ssDNA –ochrana pred nukleázami a tvorbou sekundárnych štruktúr
- Primáza-Pol α : RNA/DNA primery na oboch ssDNA vláknach DNA
- polymerázy: Pol α , Pol δ a Pol ϵ -syntéza
- vyštípenie primerov, dosyntetizovanie medzier
- spojenie pomocou ligázy
- relaxácia: topoizomerázy I a II

RPA

- Replication Protein A

- zabraňuje tvorbe sekundárnych štruktúr

- chráni ssDNA pred endonukleázami

- úloha v replikácii a v oprave DNA

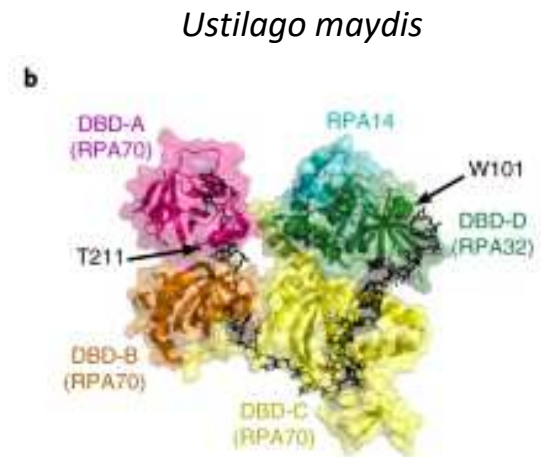
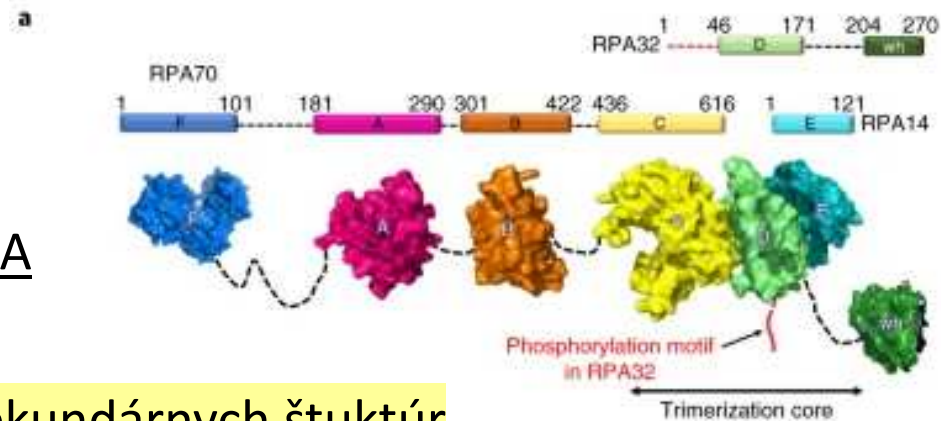
- heterotrimér 1:1:1

RPA70 (70 kDa subunit)

RPA32 (32 kDa subunit)

RPA14 (14 kDa subunit)

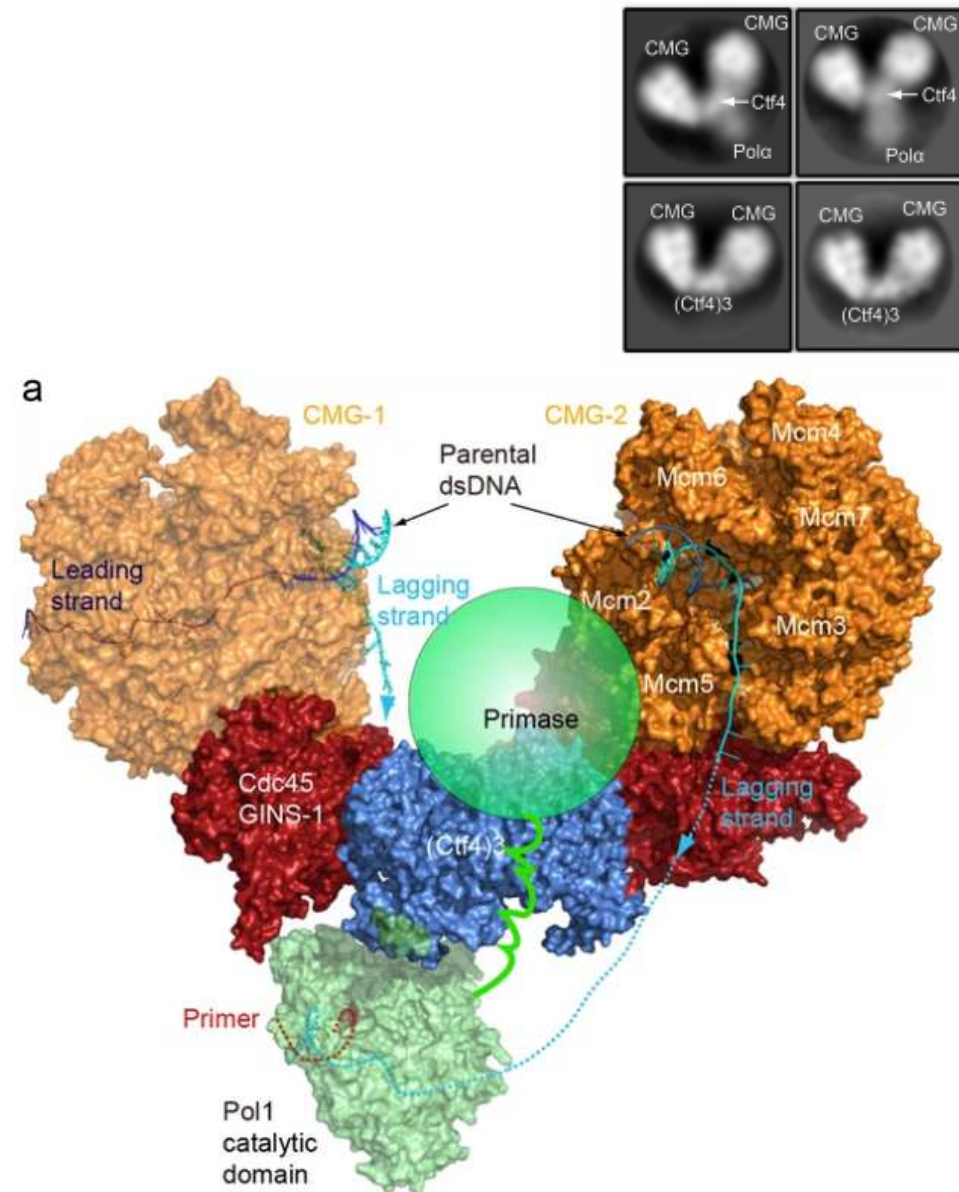
- väzba na DNA pomocou **OB foldov** A-E (oligonucleotide/oligosaccharide binding motívov)



Pokrhel et al_ 2019_NSMB

DNA Pol α

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



Primozóm = Pol α -primáza

- Primázový podkomplex:

- človek: **p49 (PRIM1)** -katalytická a **p58 (PRIM2)**

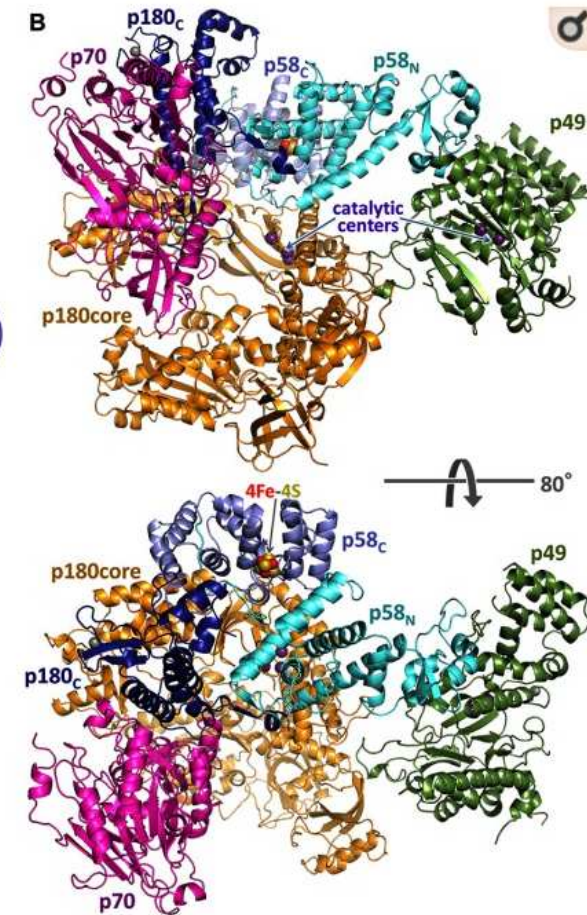
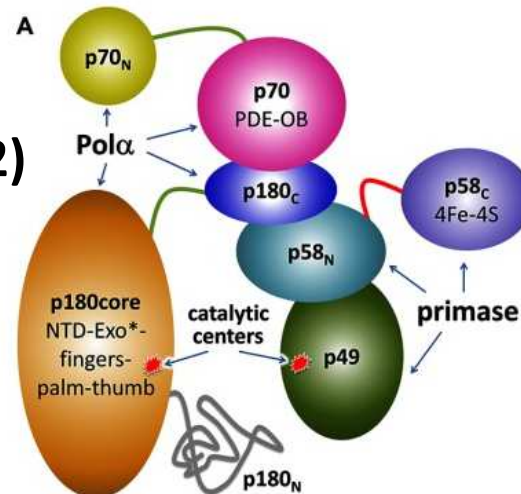
- 2-10 nukleotidov dlhý RNA primer

- Polymerázový podkomplex:

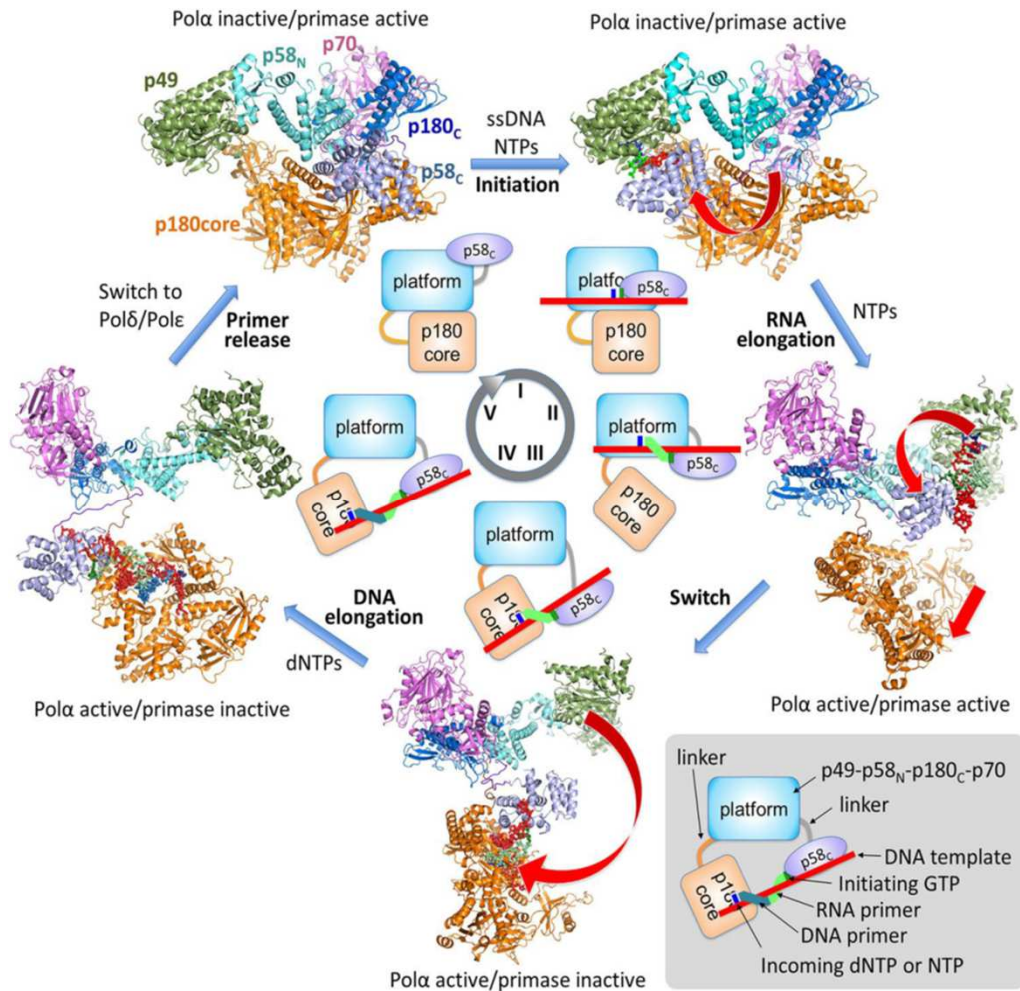
- človek: **p180 (POLA1)** -katalytická a **p70 (POLA2)**

- predĺži RNA primer = RNA-DNA hybridný primer

- flexibilné linkery** pre konformačné zmeny



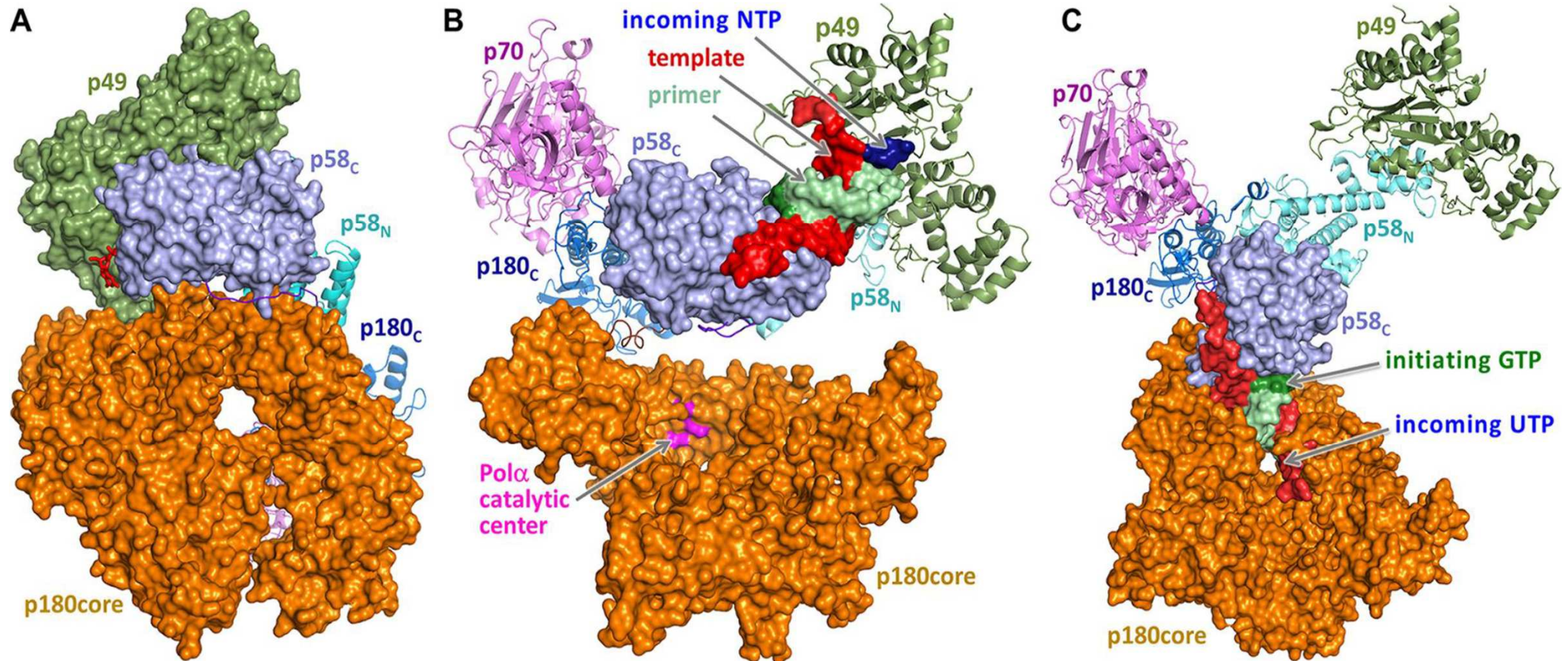
Syntéza primerov



Baranovskiy et al_2016_J Biol Chem

- I. p58C sa priblíži k p49 –syntéza RNA primeru, vytlačenie p180 podjednotky Polα
- II. po nasyntetizovaní 9 nts p58 inhibuje p49
- III. naviazanie Polα na 9 nts dlhý RNA primer
- IV. predĺženie primeru (RNA/DNA)
- V. po nasyntetizovaní 30 nts, Polα vymenená za Polδ/Pole

Syntéza primerov

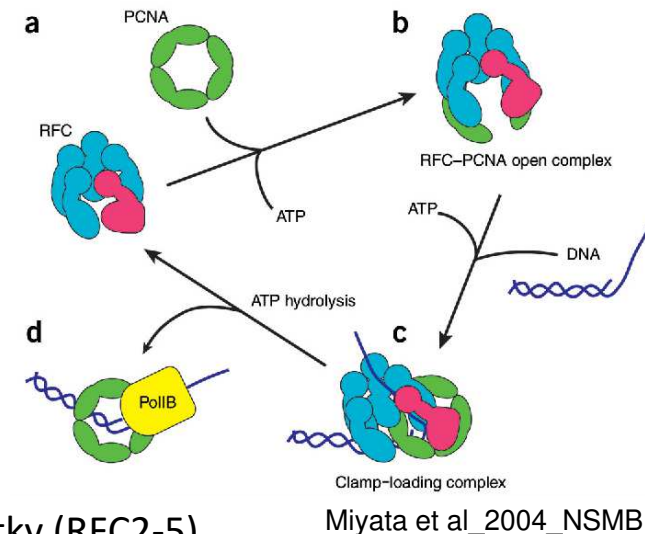


PCNA a RFC

- objavené ako esenciálne proteíny pre replikáciu SV40 v ľudských bunkách

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

- RFC (Replication Factor C)
 - ATPázová aktivita AAA+ ATPáza
 - 1 veľká (RFC1) a 4 malé podjednotky (RFC2-5)
 - rozpoznáva 3' koniec primeru
 - konformačnú zmenu PCNA
 - otvára kruhovú formu za hydrolyzy ATP –loading PCNA



- 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 nabité šroubovice – kontakt s DNA

PIP box (PCNA Interacting Peptide):

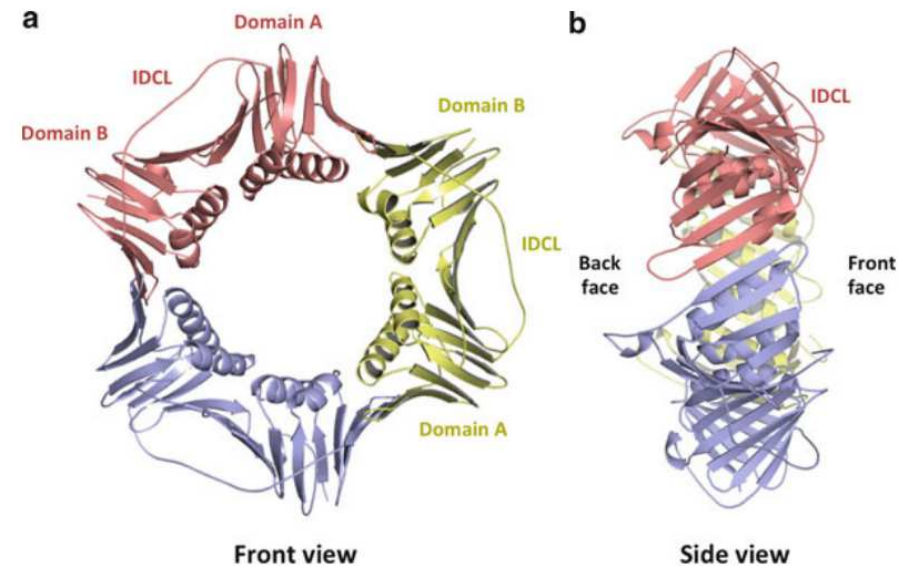
- Q-X-X-L/M/I-X-X-F/Y-F/Y
- motív interagujúci s PCNA IDCL
- DNA polymerázy, p21, Fen1, DNA ligáza...

APIM (AlkB homologue 2 PCNA Interacting Motif)

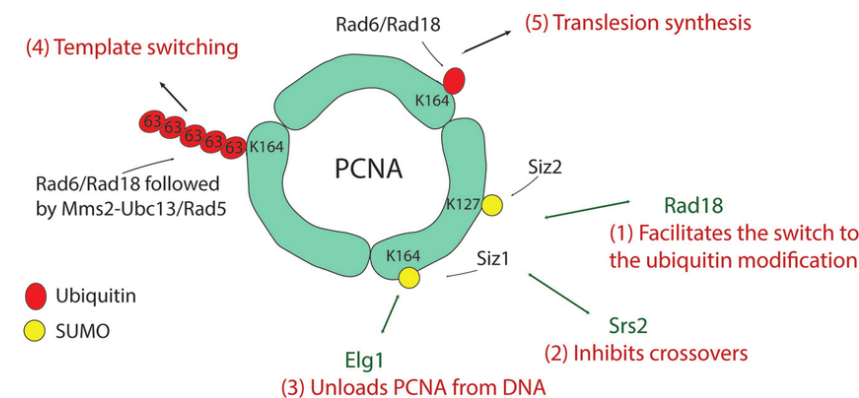
- proteiny zúčastňujúce sa opravy DNA

PCNA kód

- posttranslačné modifikácie PCNA určujúce väzbových partnerov a funkciu PCNA



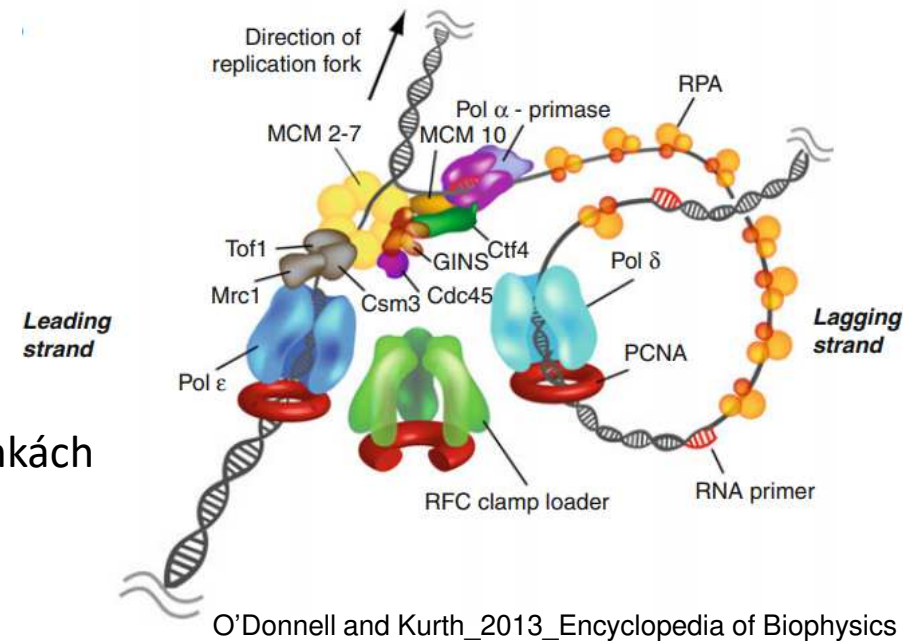
Dieckman et al_2012_The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function



Ahmed et al_2017_NAR

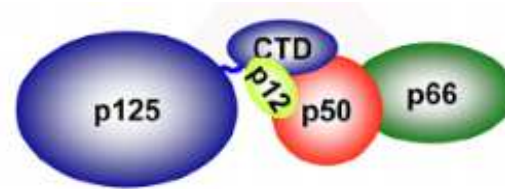
DNA polymerázy δ a ϵ

- **5' \rightarrow 3' DNA polymerázová aktivita**
- **3' \rightarrow 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**
- 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' \rightarrow 3' exonukleázovú aktivitu, nevedia vyštípiť primery -RNáza H1 a FEN1
- polymerázy zaplnia medzery, spojenie koncov pomocou **DNA ligázy**



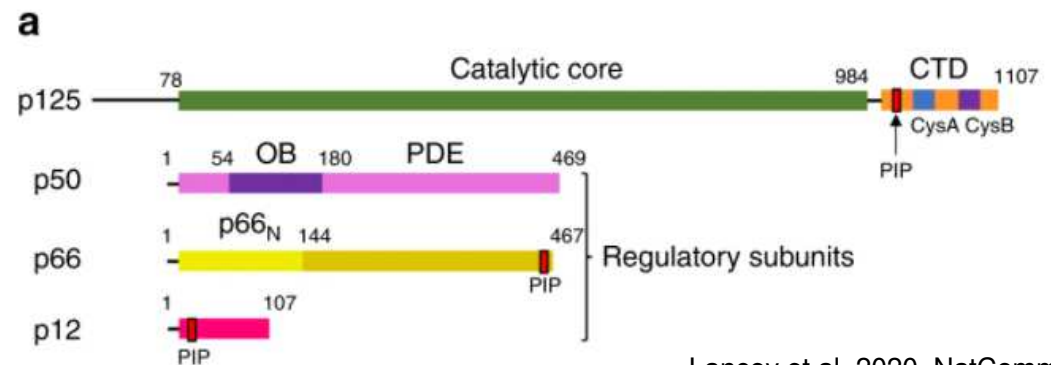
Polymeráza δ

Pol δ



- katalytická podjednotka polymeráz: tvar ľudskej ruky:

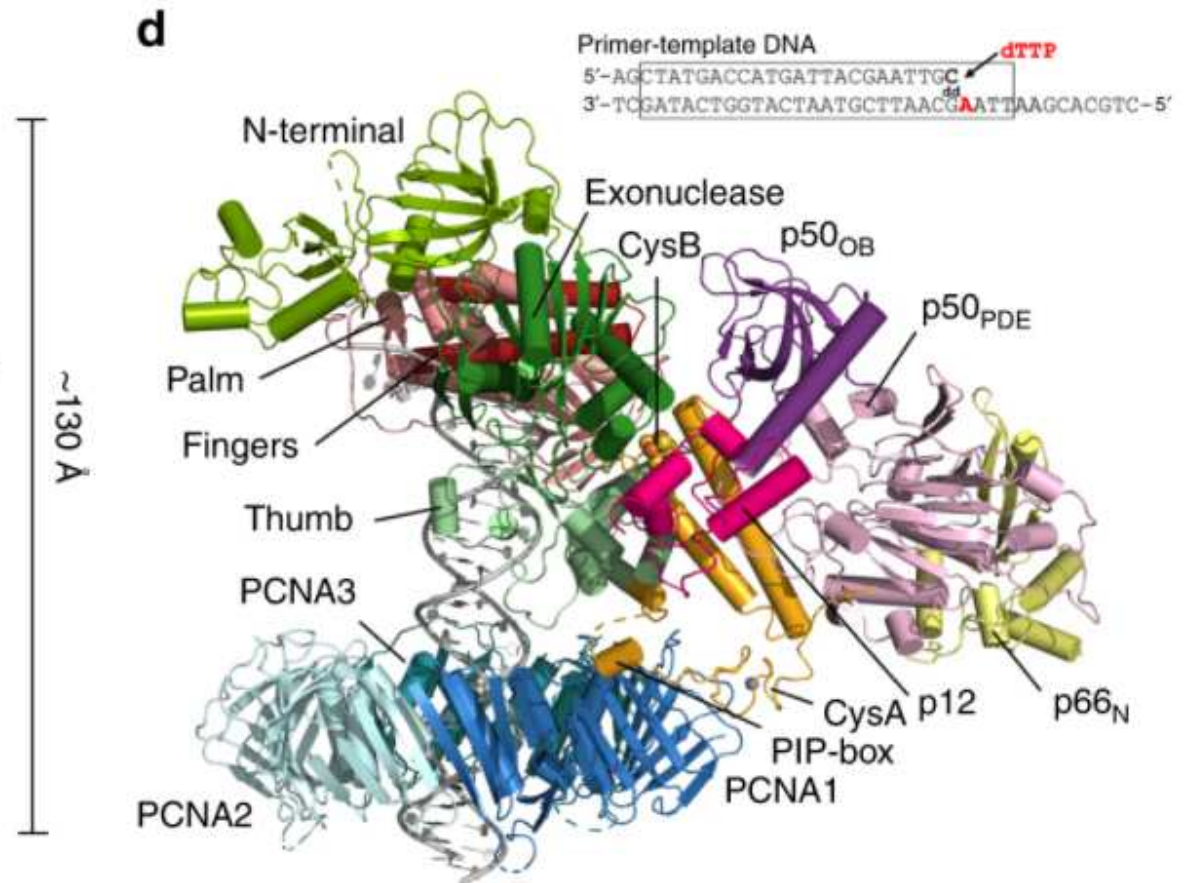
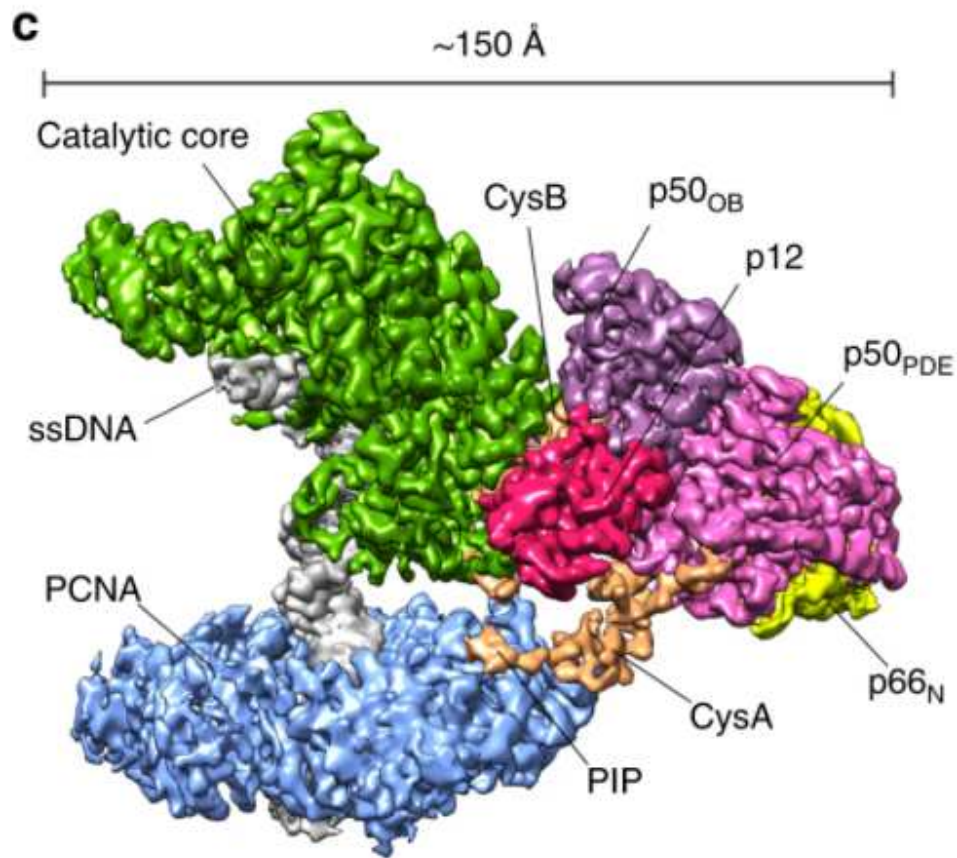
„dlaň“ je vysoko konzervovaná – polymerázová aktivita
„palec“ drží DNA na mieste a zvyšuje procesivitu



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
- po strete s ďalším primerom dosyntetizuje ešte pár nukleotidov a vytesní časť RNA primeru
- vyčnievajúci 5' koniec RNA primeru je rozpoznaný a vyštiepený FEN1 nukleázou (asociovaná s pol δ)
- DNA ligáza spojí Okazakiho fragmenty

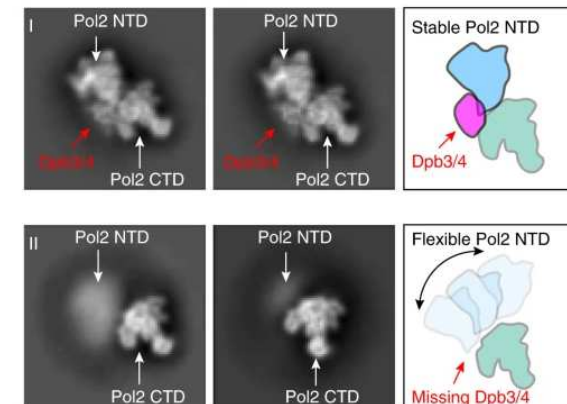
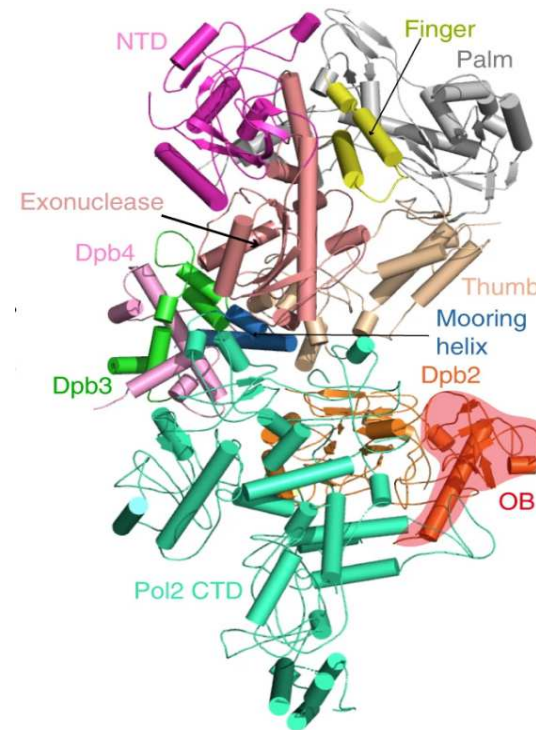
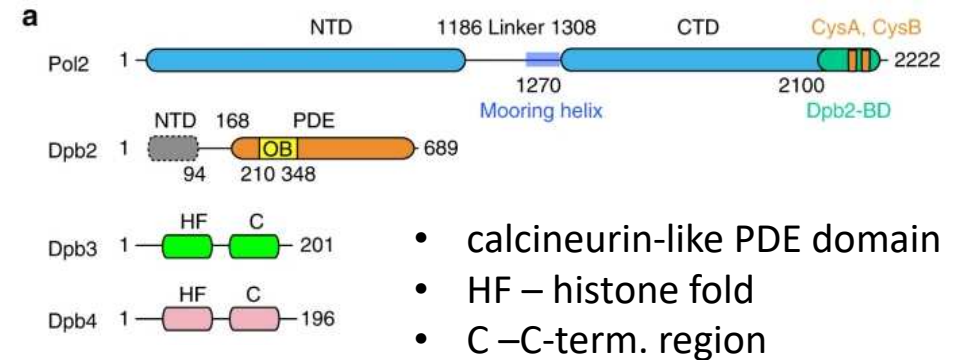
Polymeráza δ –ľudská, cryoEM



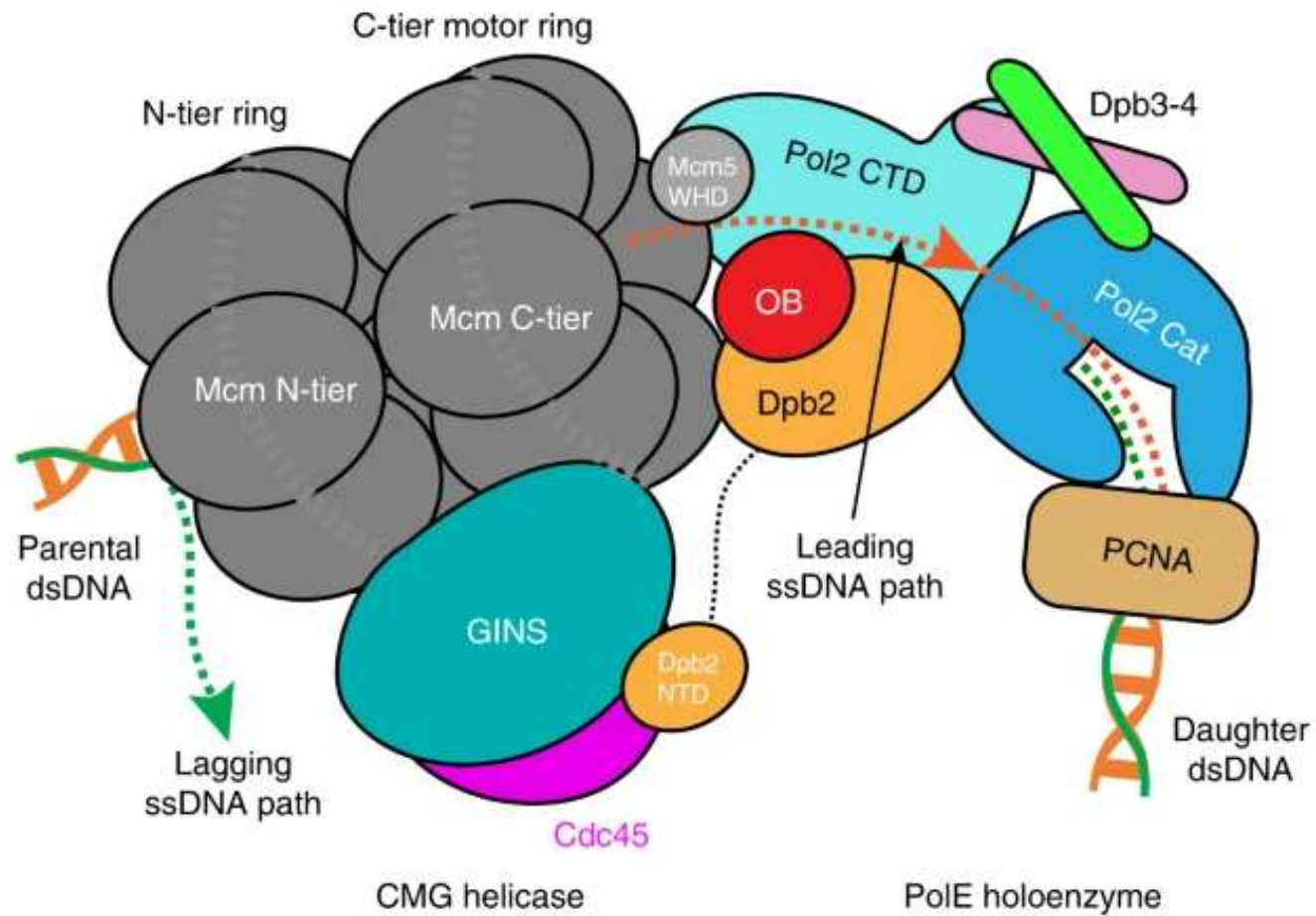
Polymeráza ϵ



- 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** - proteín-proteínové 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

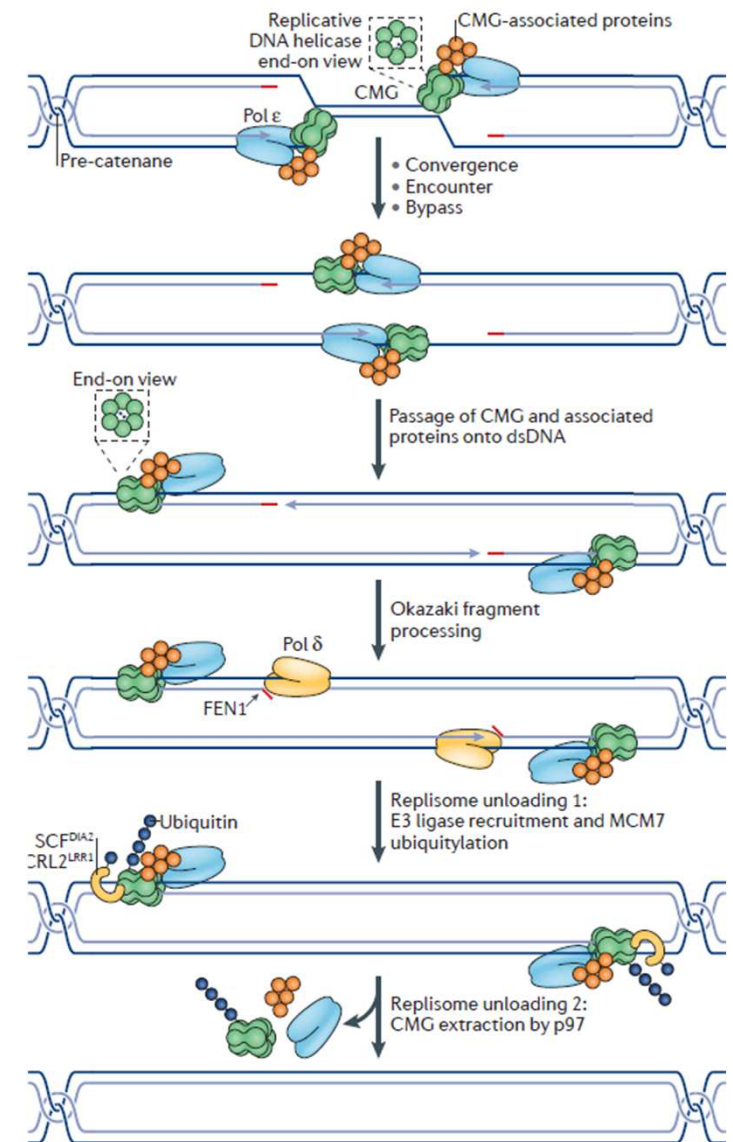


Podjednotky polymeráz H.s. vs S.c.

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

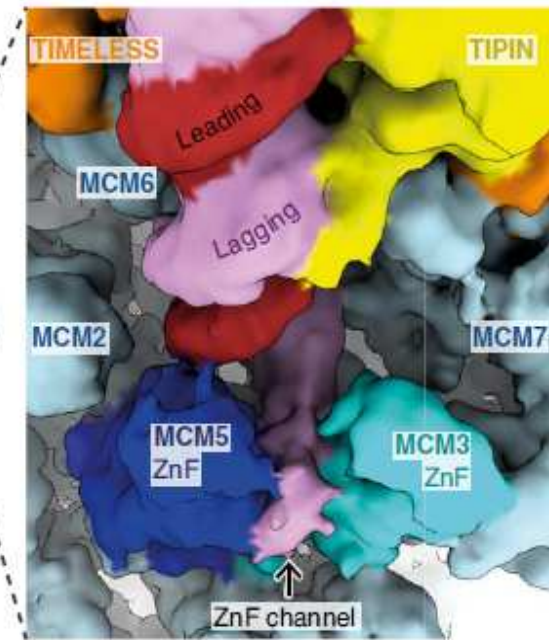
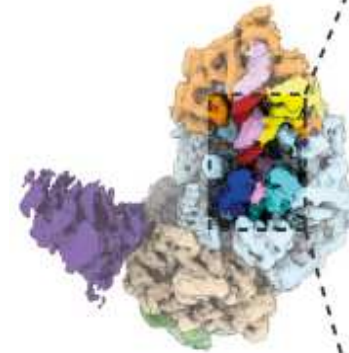
Terminácia

- keď sa 2 replikačné vidlice stretnú
- na konci S-fáze, ale v skutočnosti v priebehu S-fáze
- veľkosť replikonu: 31 kbp, rýchlosť replikačnej vidlice: 1,5 kb/min
- za 10 minút stretnutie dvoch replikačných vidlíc
- odstránenie CMG:
 - Mcm7 je polyubikvitylovaná na K48
 - Cdc48 rozpozná polyubikvitinylovaný CMG komplex, disociácia
 - PCNA je odstránený na začiatku G2 fáze pomocou ELG1-RFC-like komplexu
- **RFB** (**R**eplikačný **F**ork **B**arrier):
 - špecifické miesta genómu, ktoré dokážu zastaviť replikačnú vidlicu
 - pri replikácii rDNA –RF v opačnom smere ako rDNA transkripcia



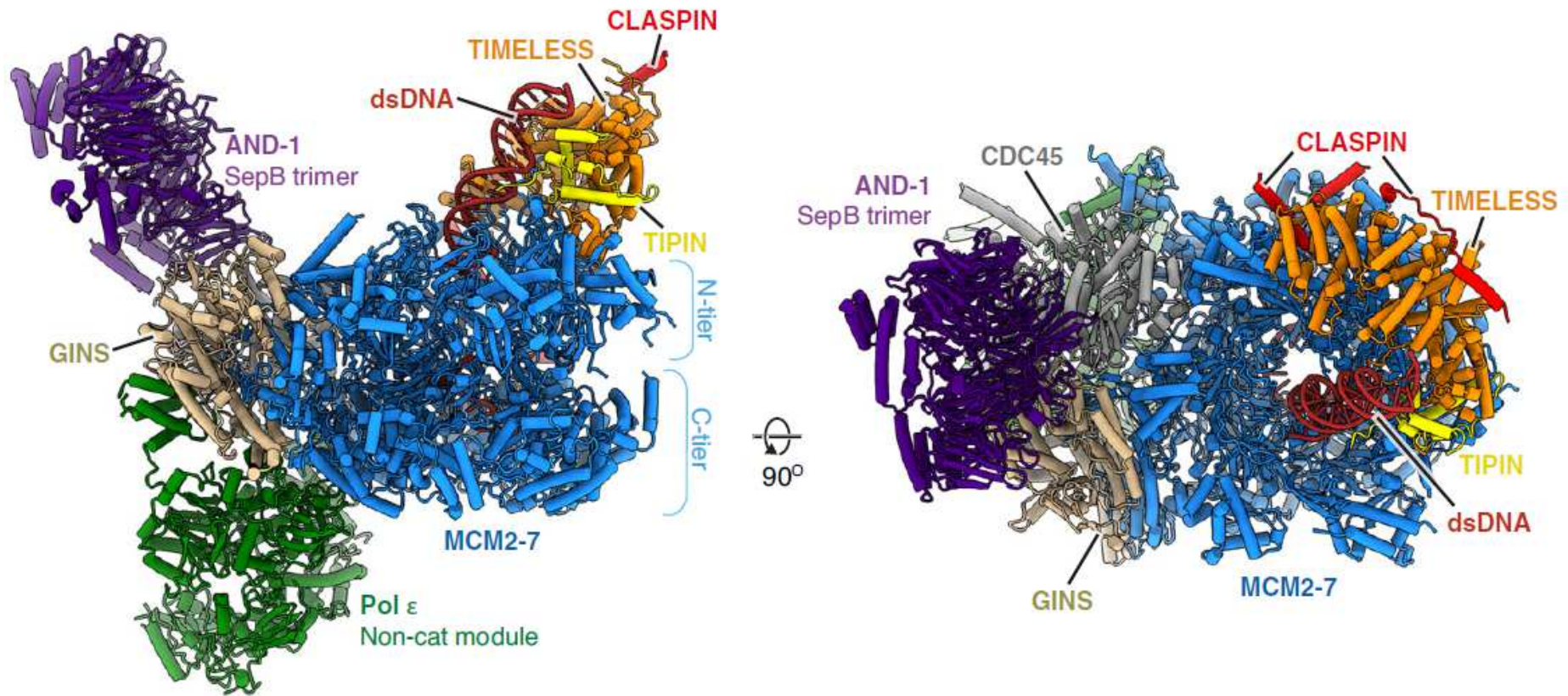
Ľudský replizóom

- model vychádzal z kvasiniek
- obsahuje proteíny, ktoré nemajú ortológov v kvasinkách (rozpadnutie/stabilita replizóomu, prepojenie replikácie s DNA opravou)
- 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 replizóomu, 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



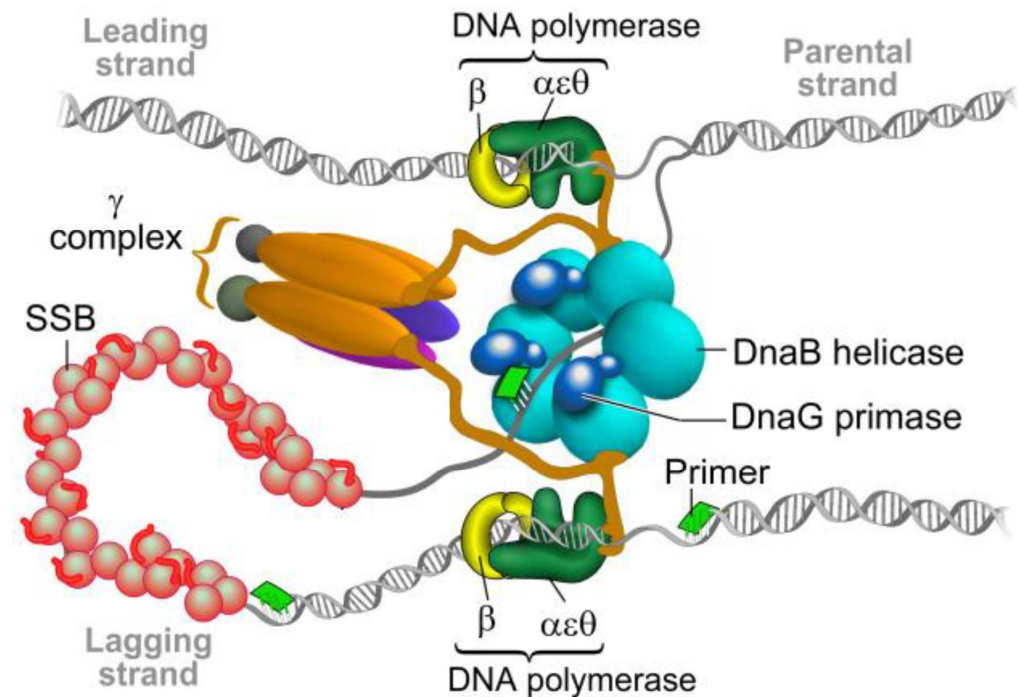
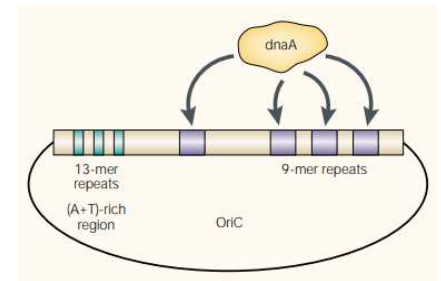
Jones et al_2021_EMBOJ

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, **γ komplex**

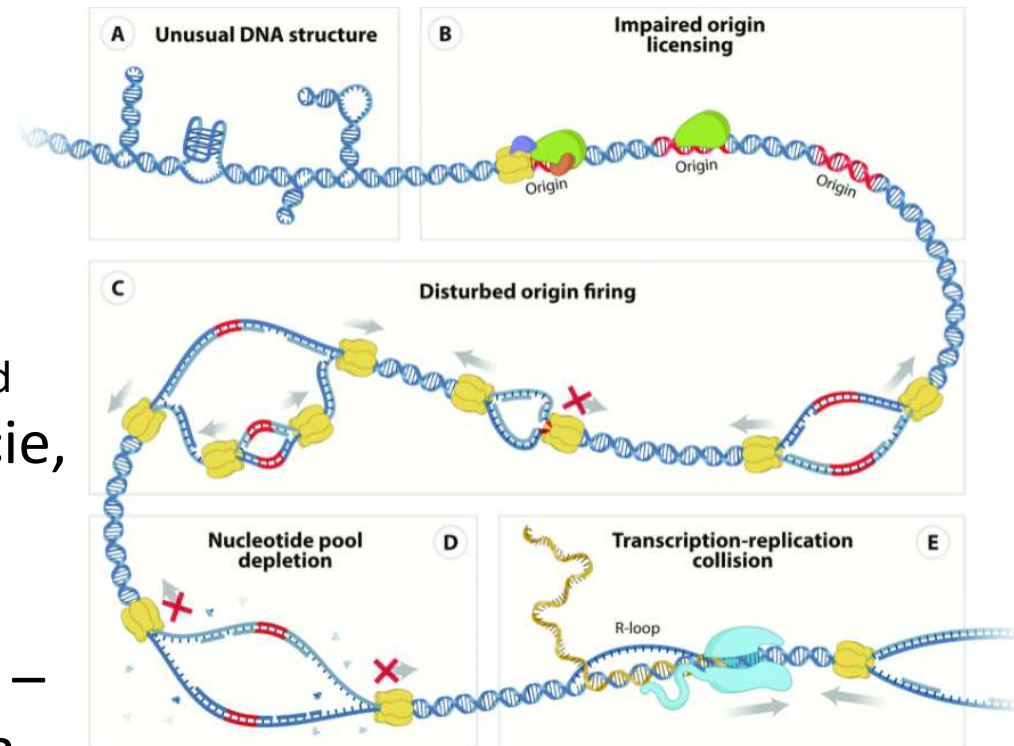


Replikácia v baktériách *Escherichia coli*

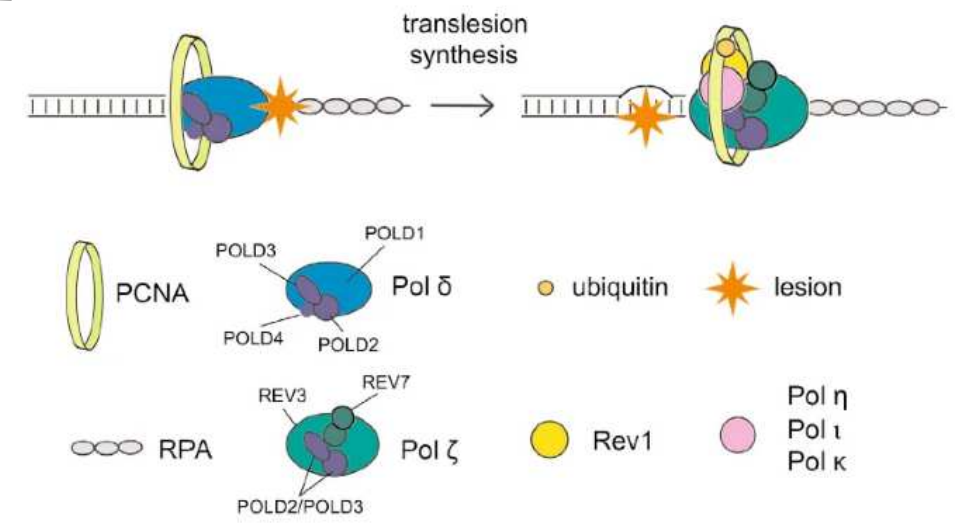
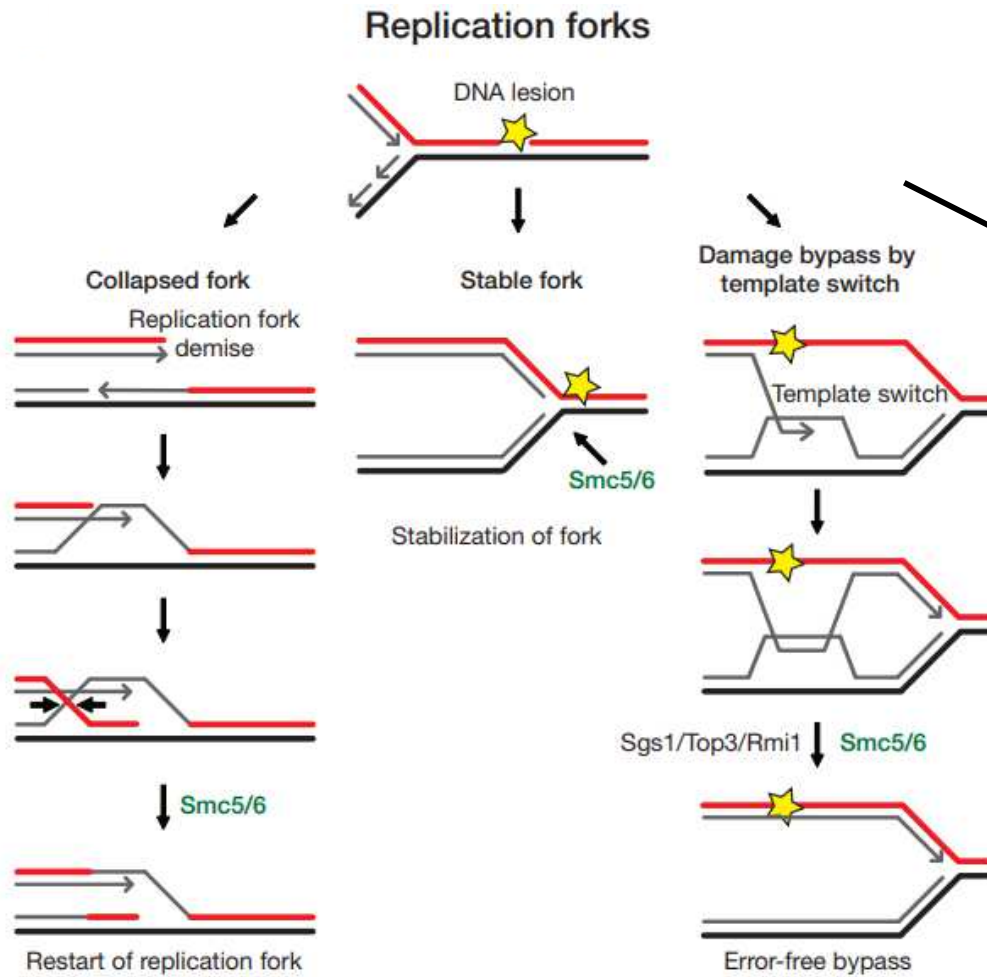
E. coli Gene	Enzyme/Protein Function	Description
<i>dnaA</i>	Initiator Protein	Melts DNA at <i>oriC</i> , exposing two template ssDNA strands
<i>dnaB</i>	Helicase	Unwinds the DNA helix at the front end of each replication fork during replication
<i>dnaC</i>	Helicase Loader	Loads the DnaB Helicase onto 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 ...
- kolaps replikačných vidlíc –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,...



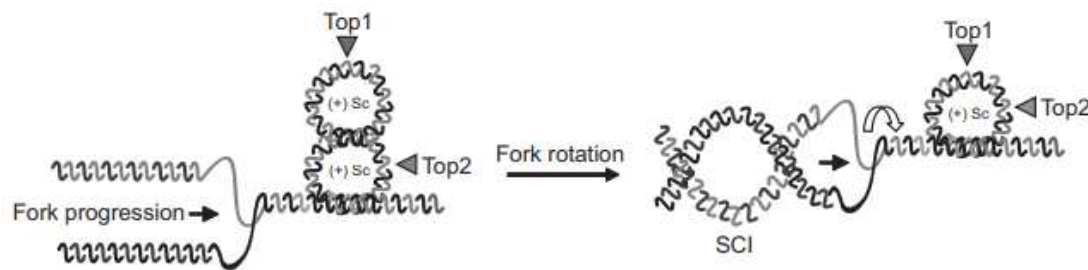
Replikačný stres



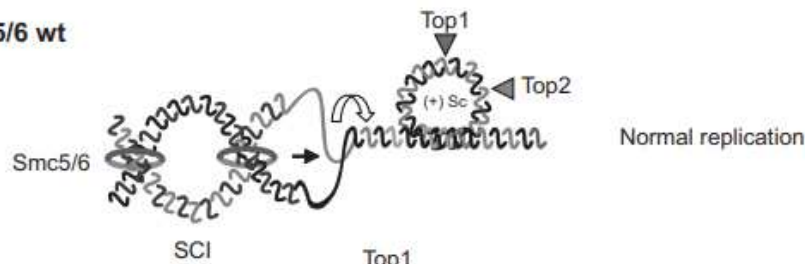
Shilkin_2020_Biochemistry

SMC5/6 v replikácii

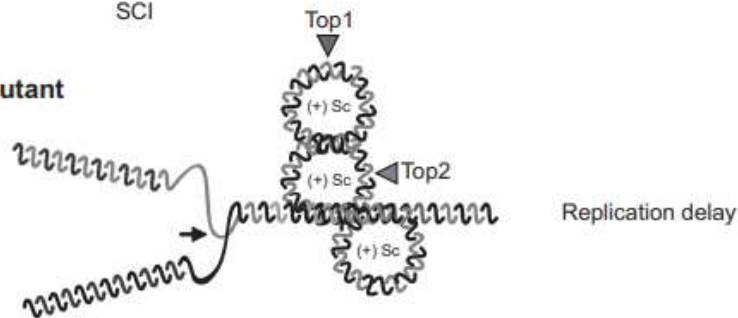
Translokáza, ATPázová aktivita, väzba ssDNA, dsDNA



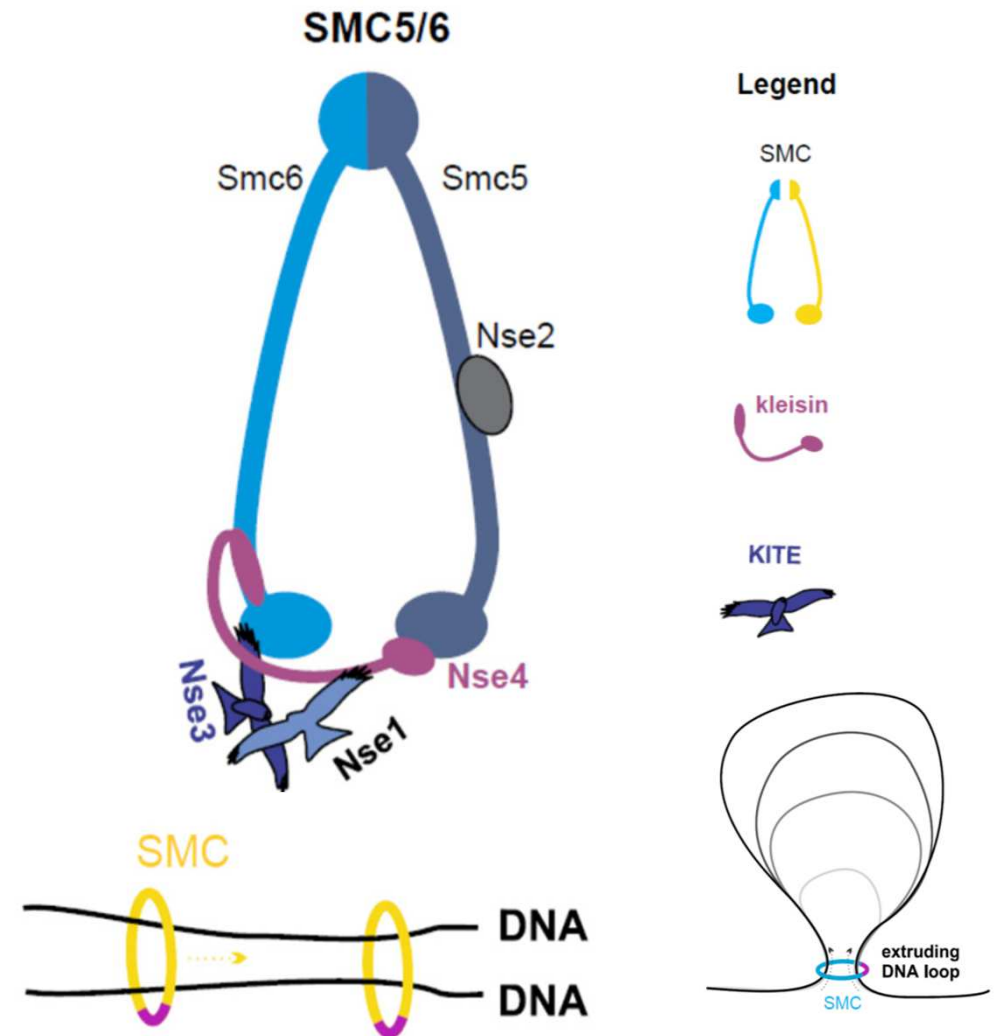
Smc5/6 wt



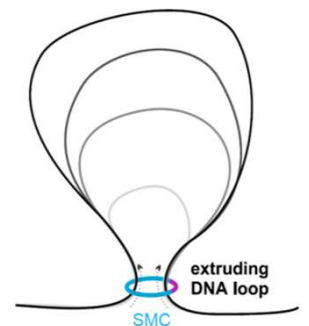
smc5/6 mutant



Kegel and Sjögren_ 2010_ Cold Spring Harb Symp Quant Biol



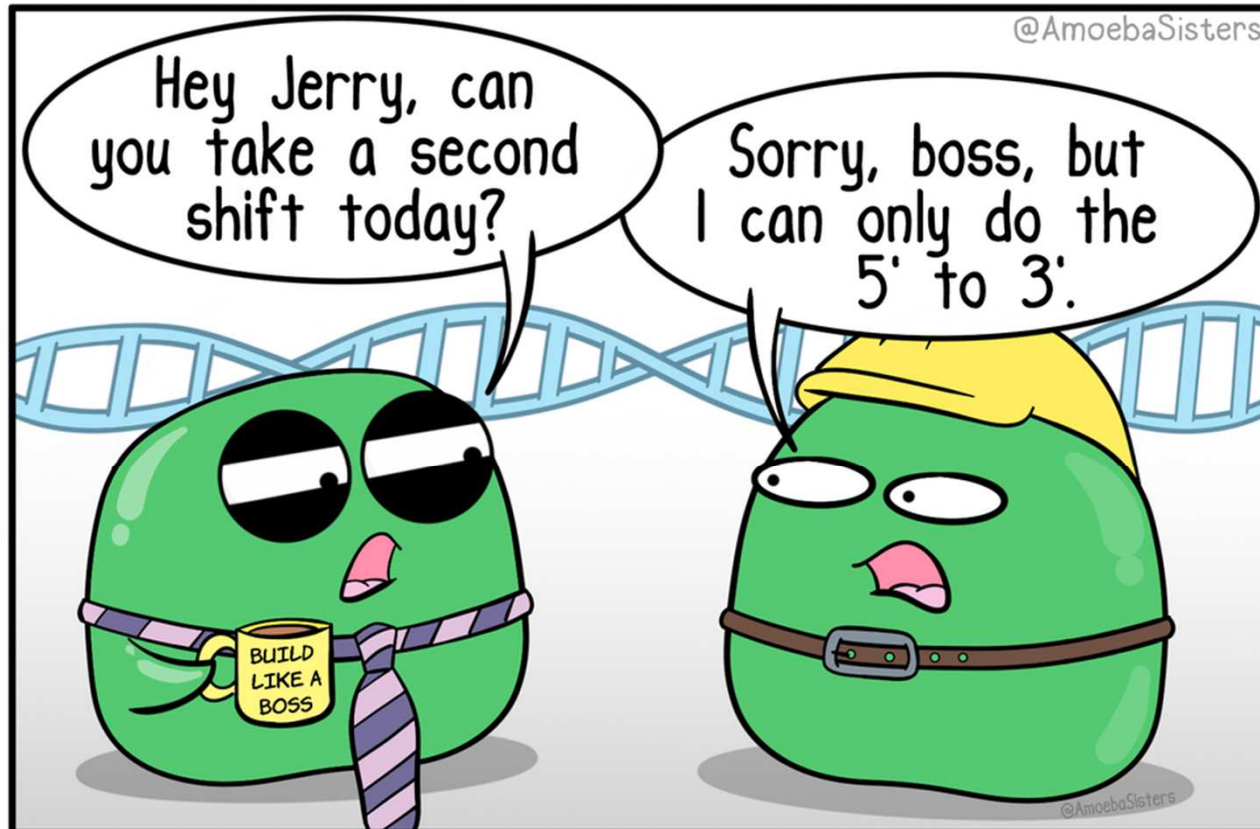
Legend



upravené z Paleček_ 2018_ Genes

Ďakujem za pozornosť!

Paramecium Parlor



No one envied the job of the DNA polymerase shift manager.