

# Proteínové komplexy v DNA replikácii

**CG030 Struktura a funkce proteinových komplexů**

Barbora Štefanovie, Ph.D.

4.4.2024

# 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

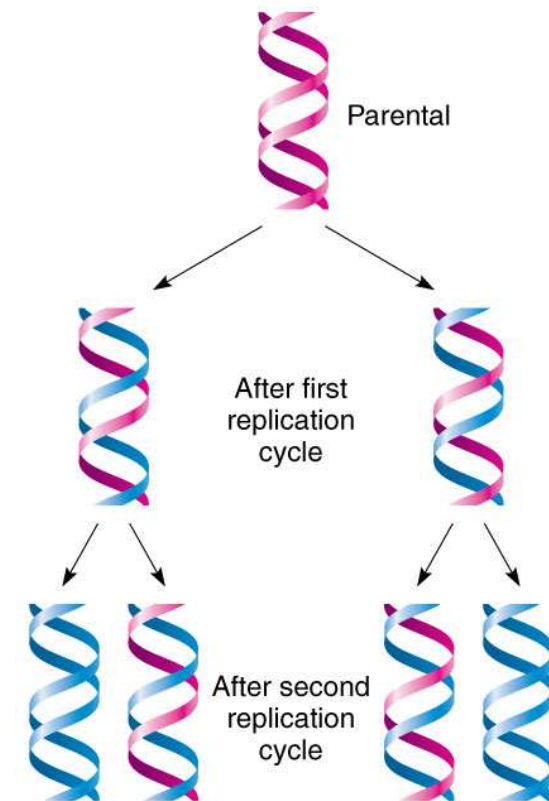


- replikácia študovaná od objavenia double-helix štruktúry
- Watson & Crick, Nature, 1953:

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

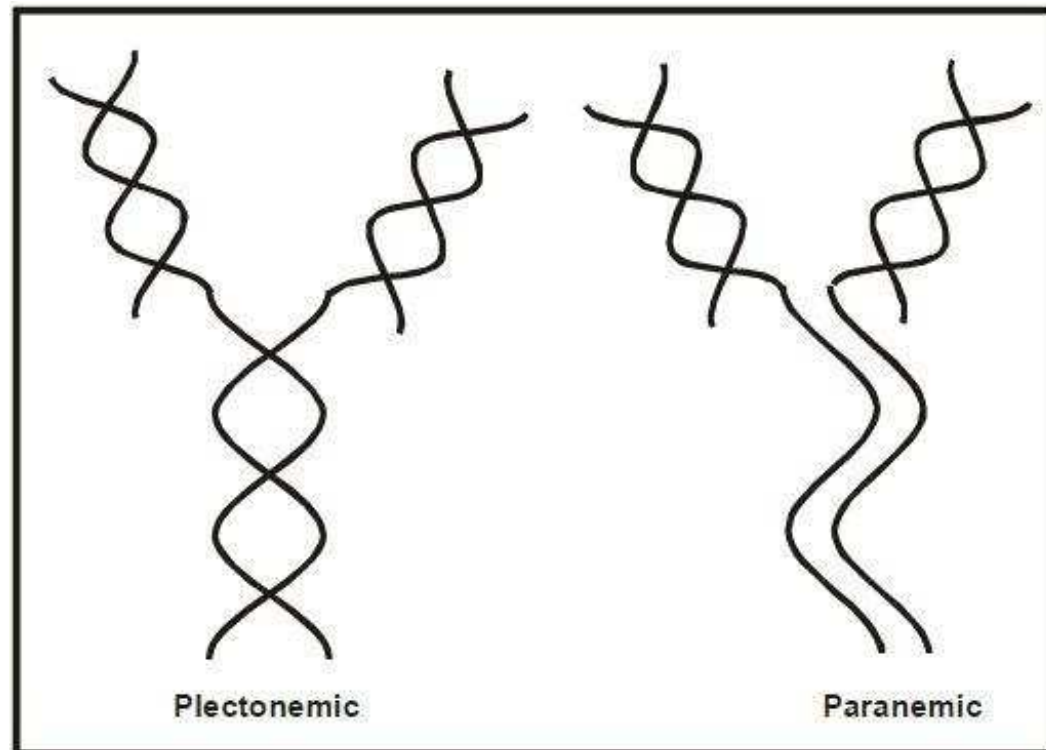
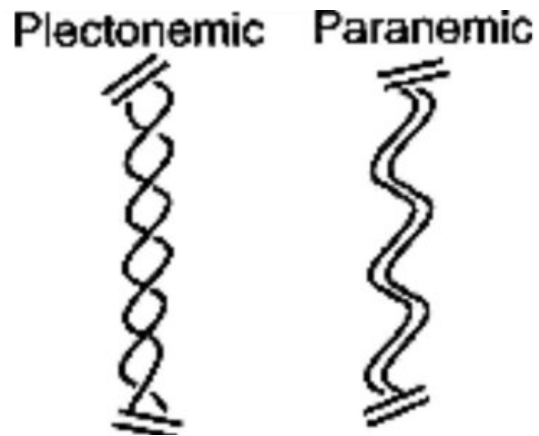
- každé vlákno slúži ako templát pre syntézu druhého komplementárneho vlákna = semikonzervatívny model

a) Semiconservative model

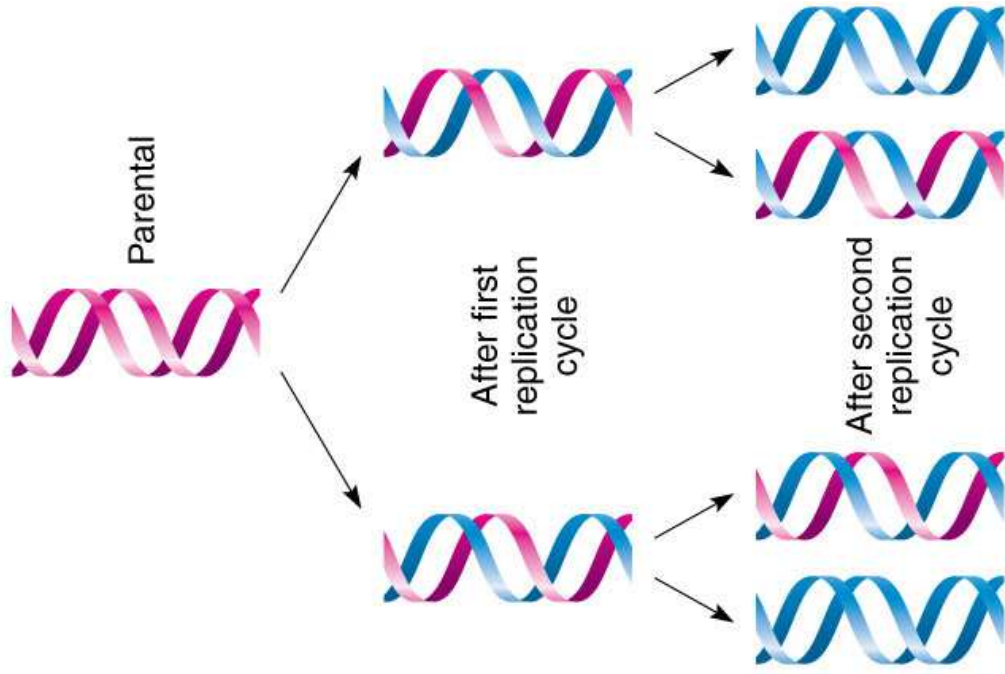


- topologický problém –aby sa mohla DNA replikovať, je potrebné rozpletenie dvojšroubovice = zapletenie vlákien a rotácia
- pre predstavu:
  - 1 otáčka/10 bp, kompletná replikácia DNA molekuly ľudského chromozómu 1 (250 Mb), by vyžadovala 25 miliónov rotácií
- naopak cirkulárna dsDNA (baktérie, bakteriofágy)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

# Plektonemické vs. paranemické vinutí DNA



a) Semiconservative model

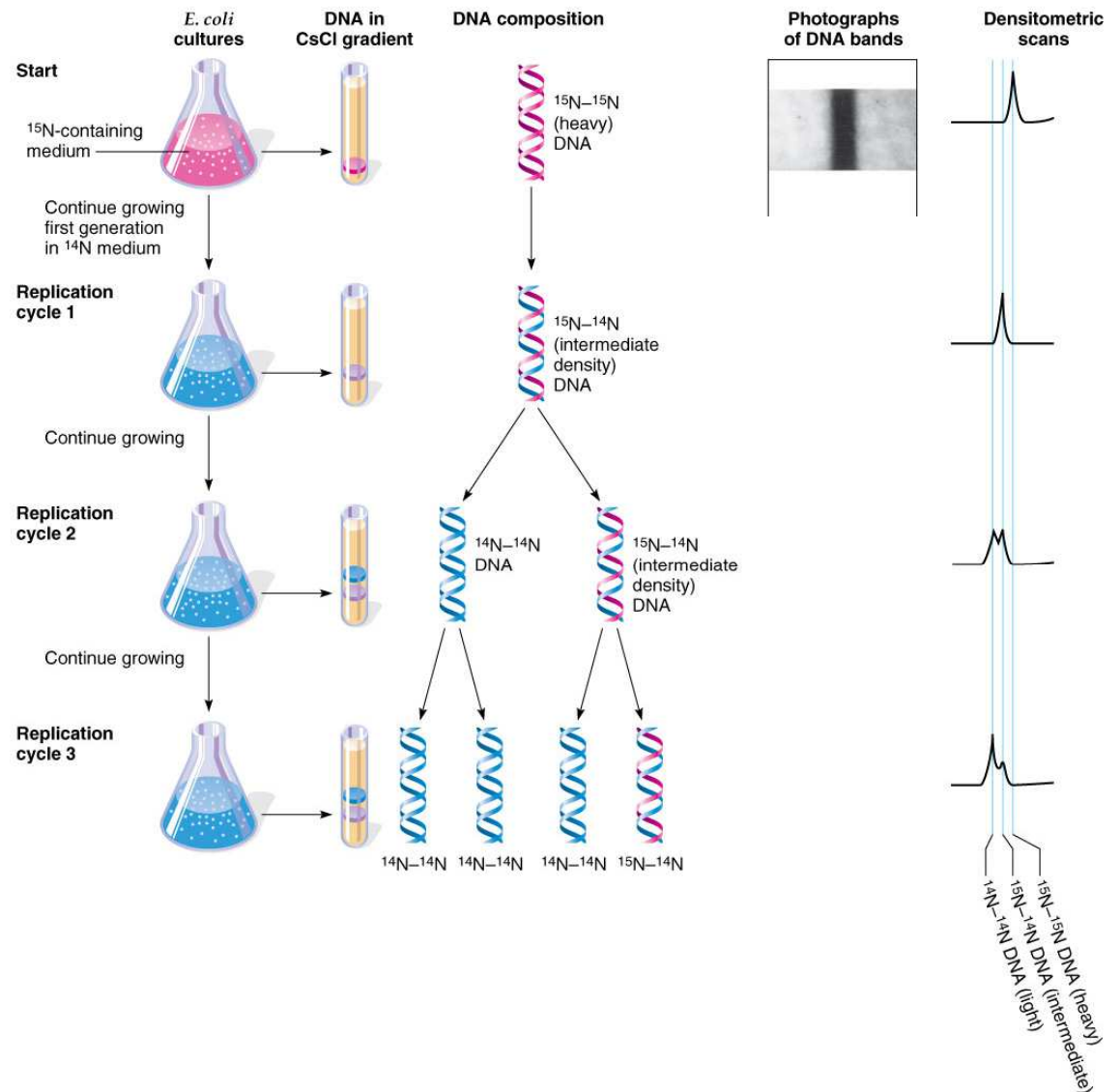


# Meselson-Stahl experiment 1958, Nature



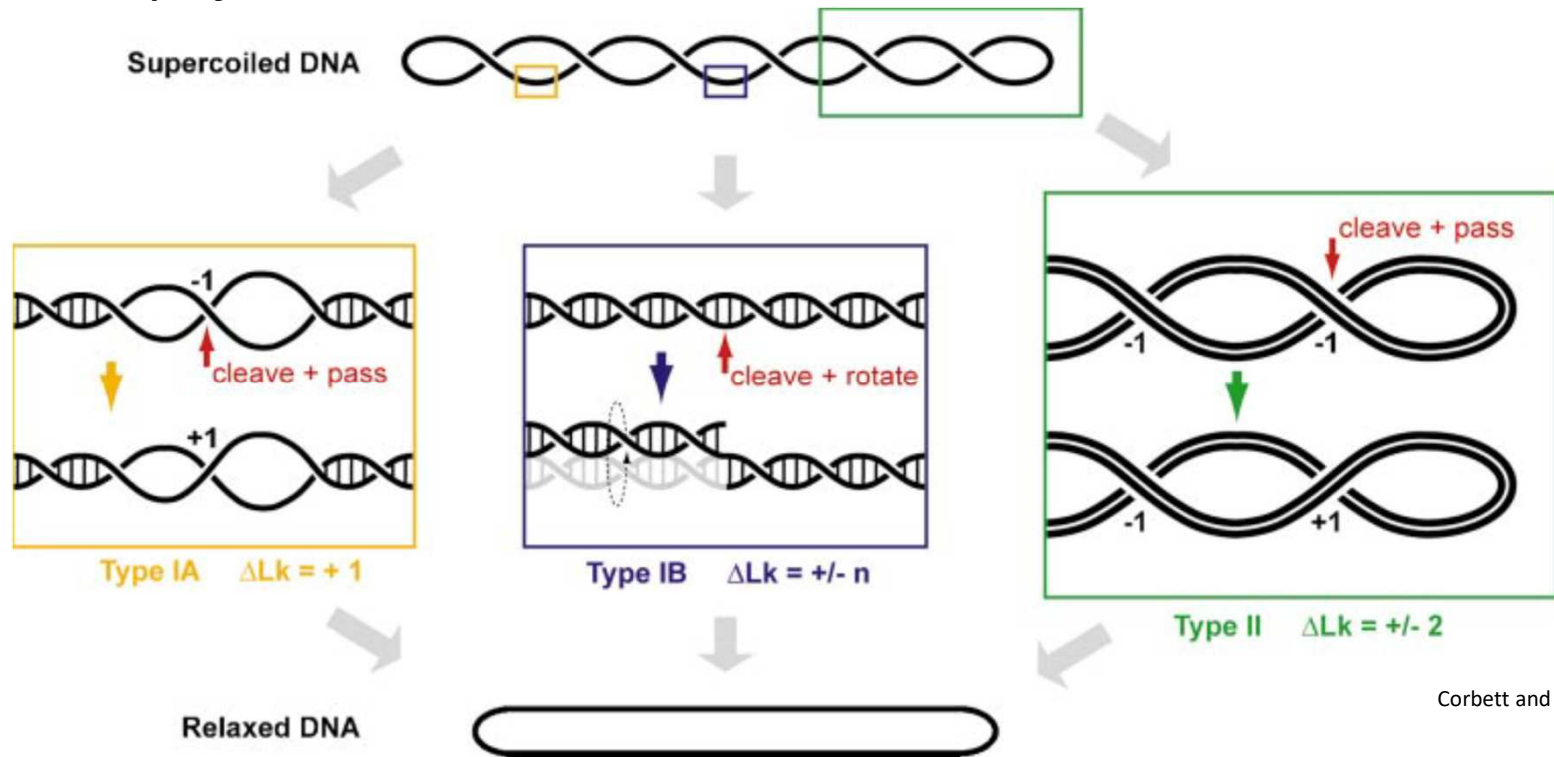
značenie DNA pomocou  $^{15}\text{N}$  + centrifugácia  
v gradiente CsCl  
= odlíšenie rodičovských a dcérskych  
DNA molekúl

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



# DNA topoizomerázy

- znižujú nadmerné vinutie, ktoré vzniká pri pohybe replikačnej vidlice
- zlom + znovu-spojenie vlákien



Corbett and Berger\_2004\_AnnuRevBiophys

**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

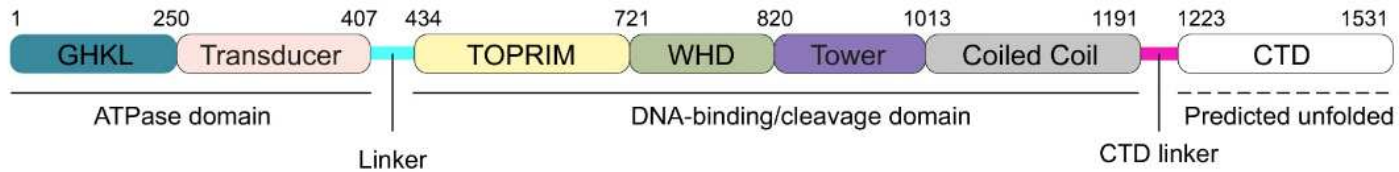
(IIA, IIB, počet vinutia -2)



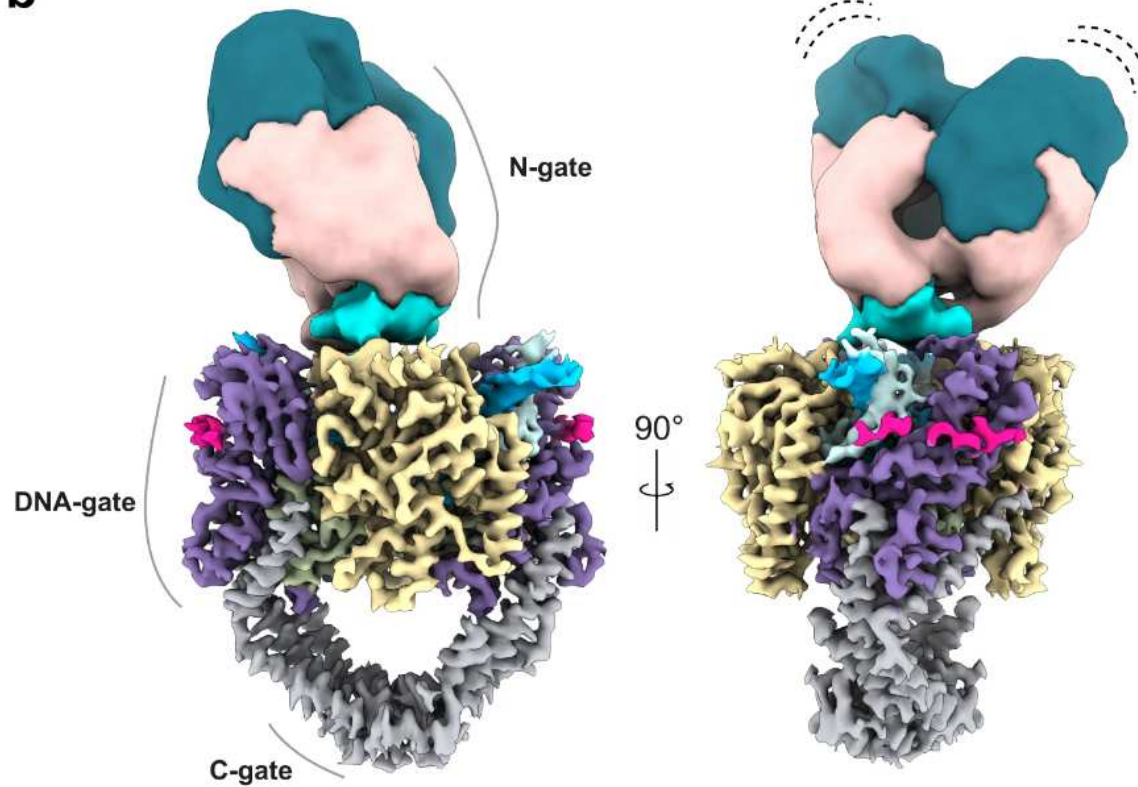
# Human topoisomerase II $\alpha$ (homodimer)

cryo EM structure, 3.6 Å

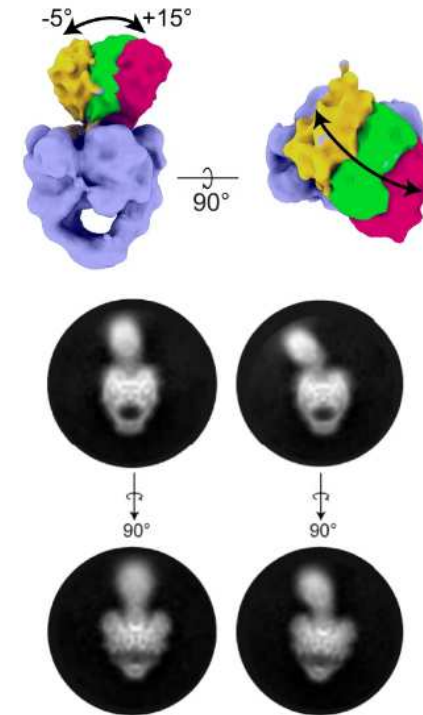
**a**



**b**

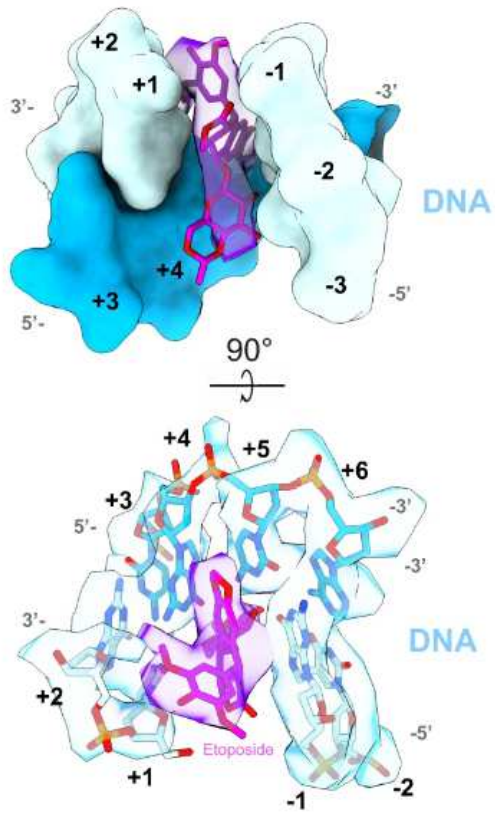
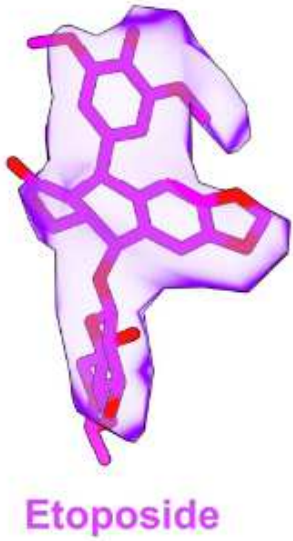
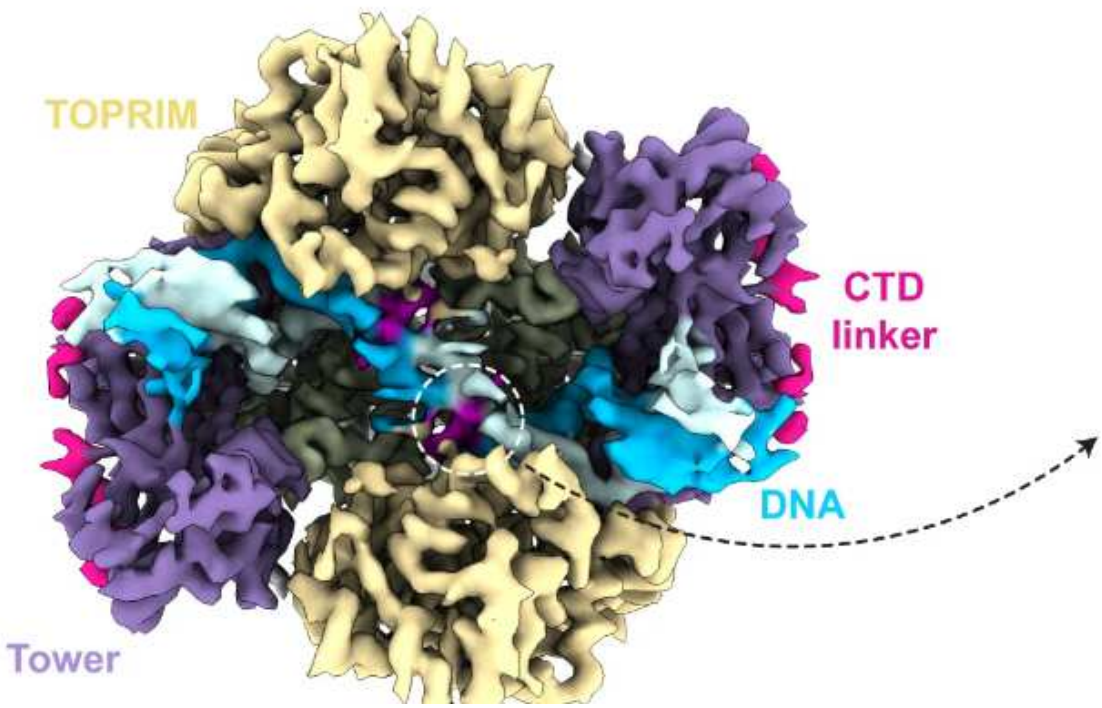


**c**



# Human topoisomerase II $\alpha$

cryo EM structure, 3.6 Å



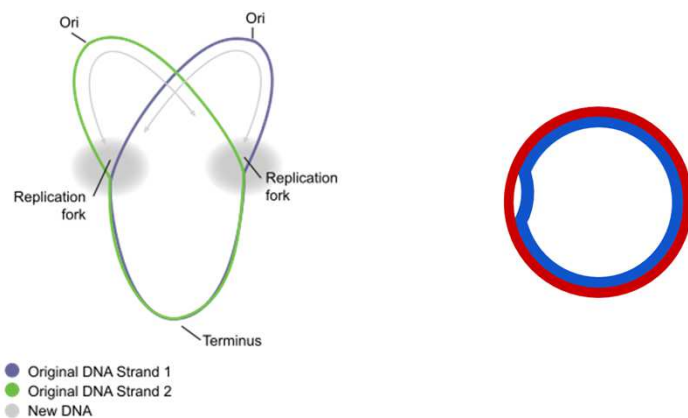
# DNA replikácia v číslach

## Prokaryota (**E.coli**)

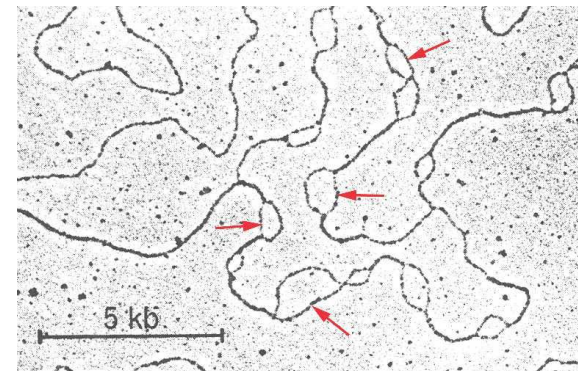
- Genóm  $4.5 \times 10^6$  bp
- Presnosť  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  errors/bp
- Rýchlosť  $\sim 60$  kb/min
- Počiatok replikácie: 1
- 30 min/celý genóm

## Eukaryota (**človek**)

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



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

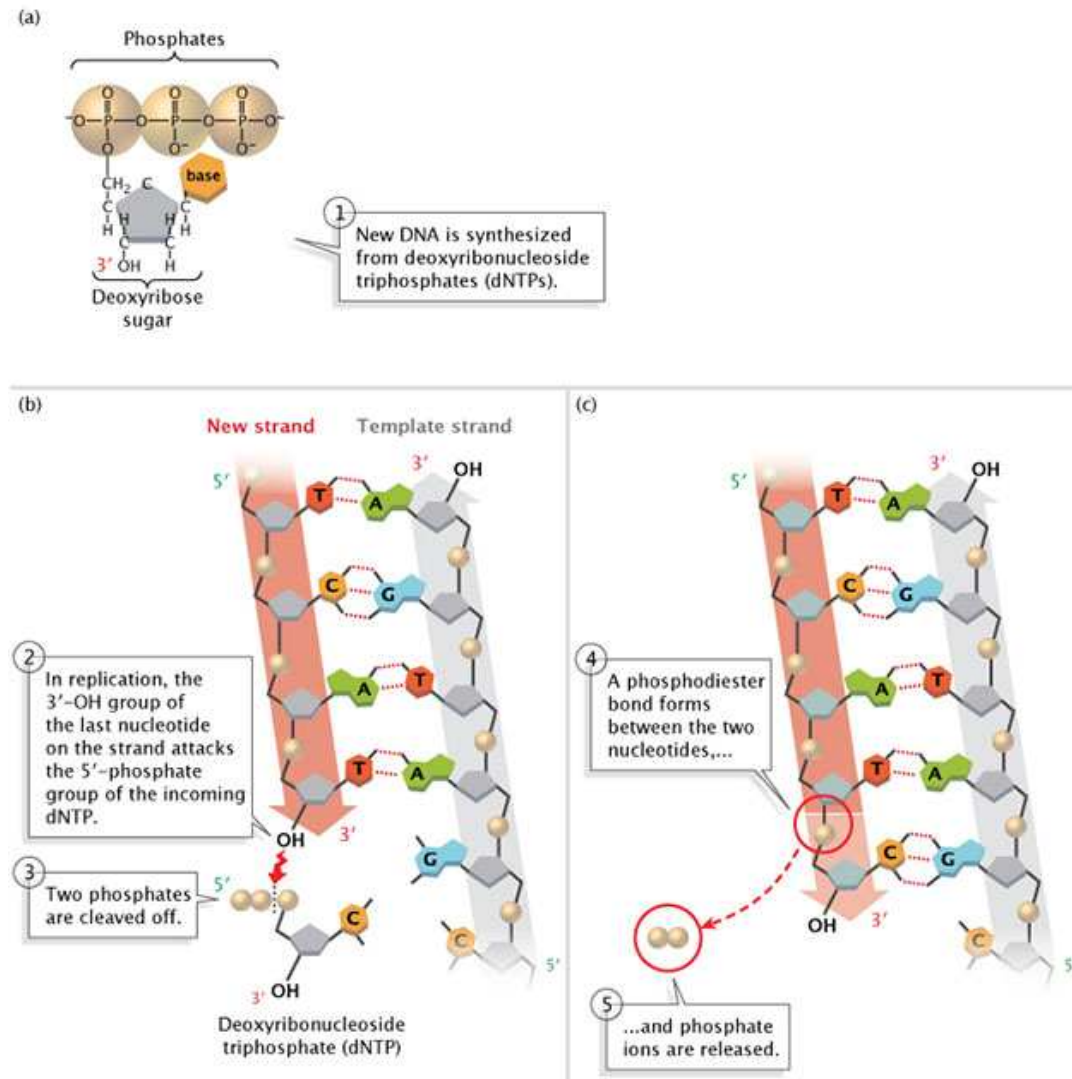
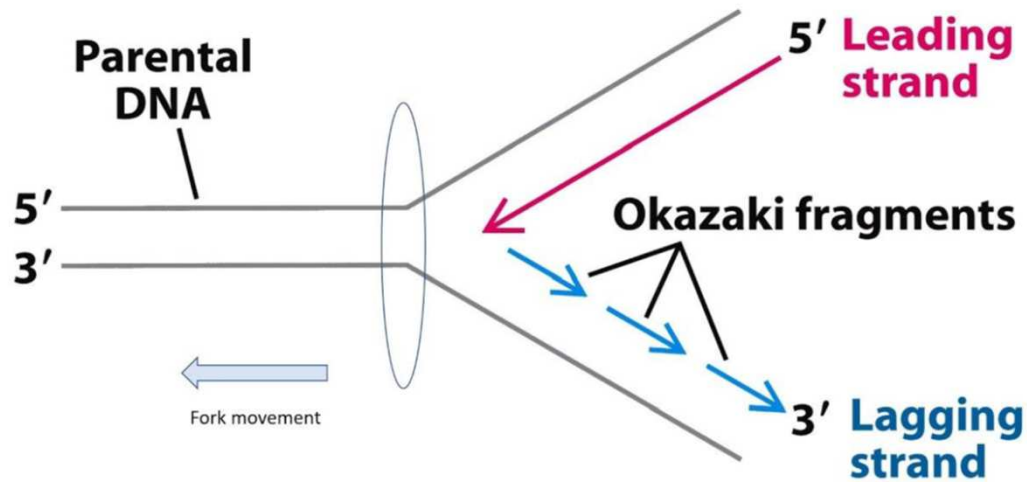


Dr. B. Fristensky and N. Brien, <https://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/l12/l12.html>

# 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

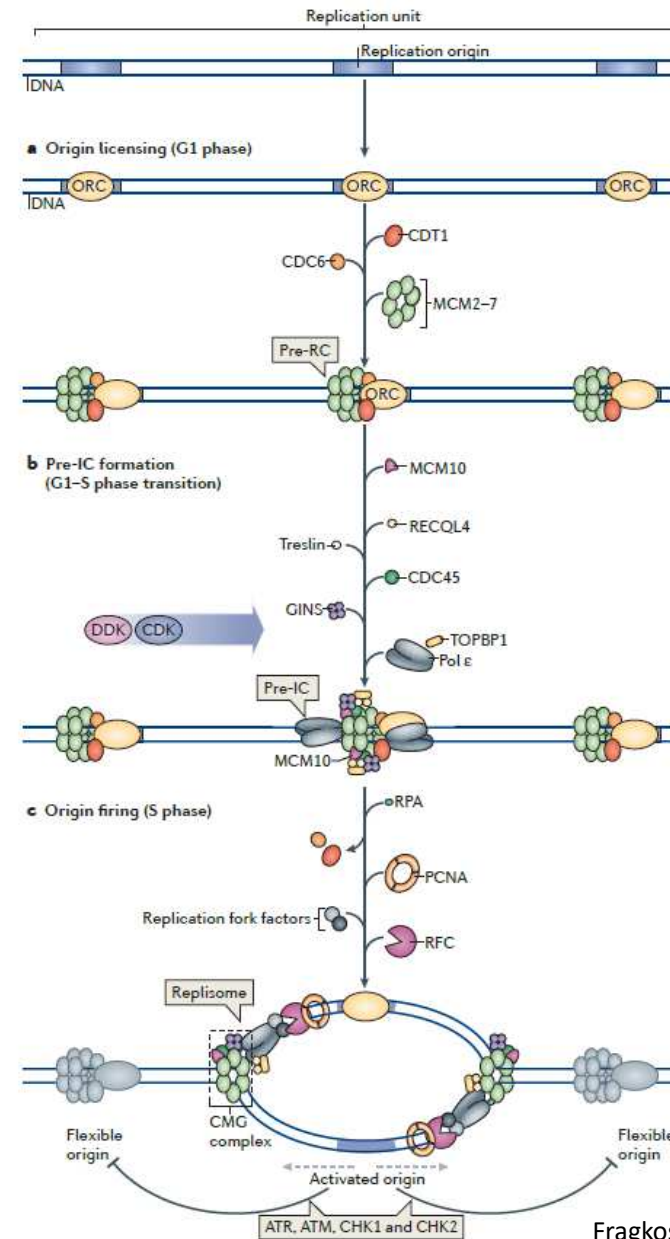
(topologický stres, ťažko replikovatelné lokusy, proteíny na DNA, transkripcia, poškodená DNA)

## 3. terminácia

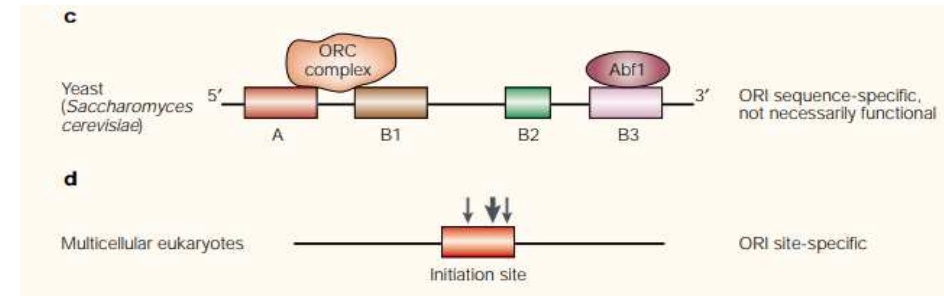
- ukončenie replikácie

# 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



Méchalí, 2001\_NatRev\_Genetics

- **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)

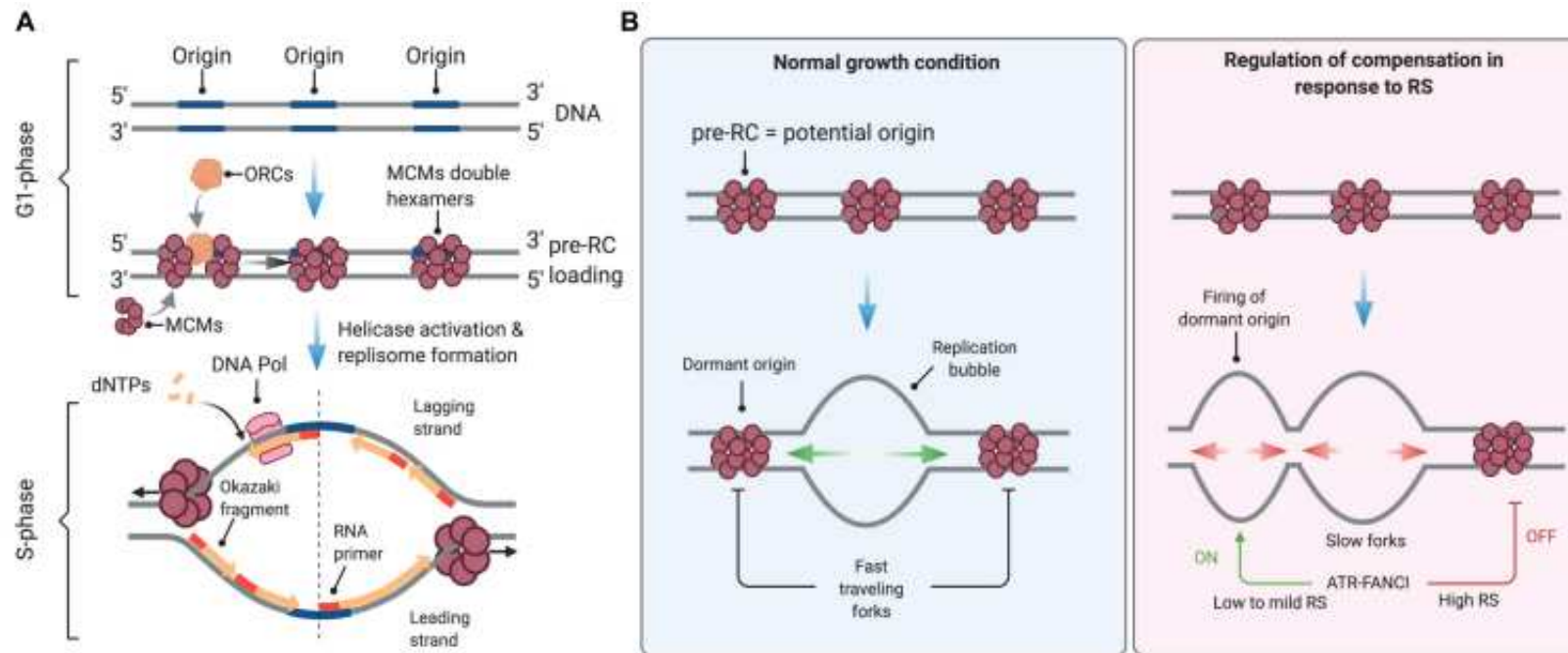
Vyššie eukaryota –konzervovanosť sa vytratila

- 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

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

# Origin licencing /Origin firing

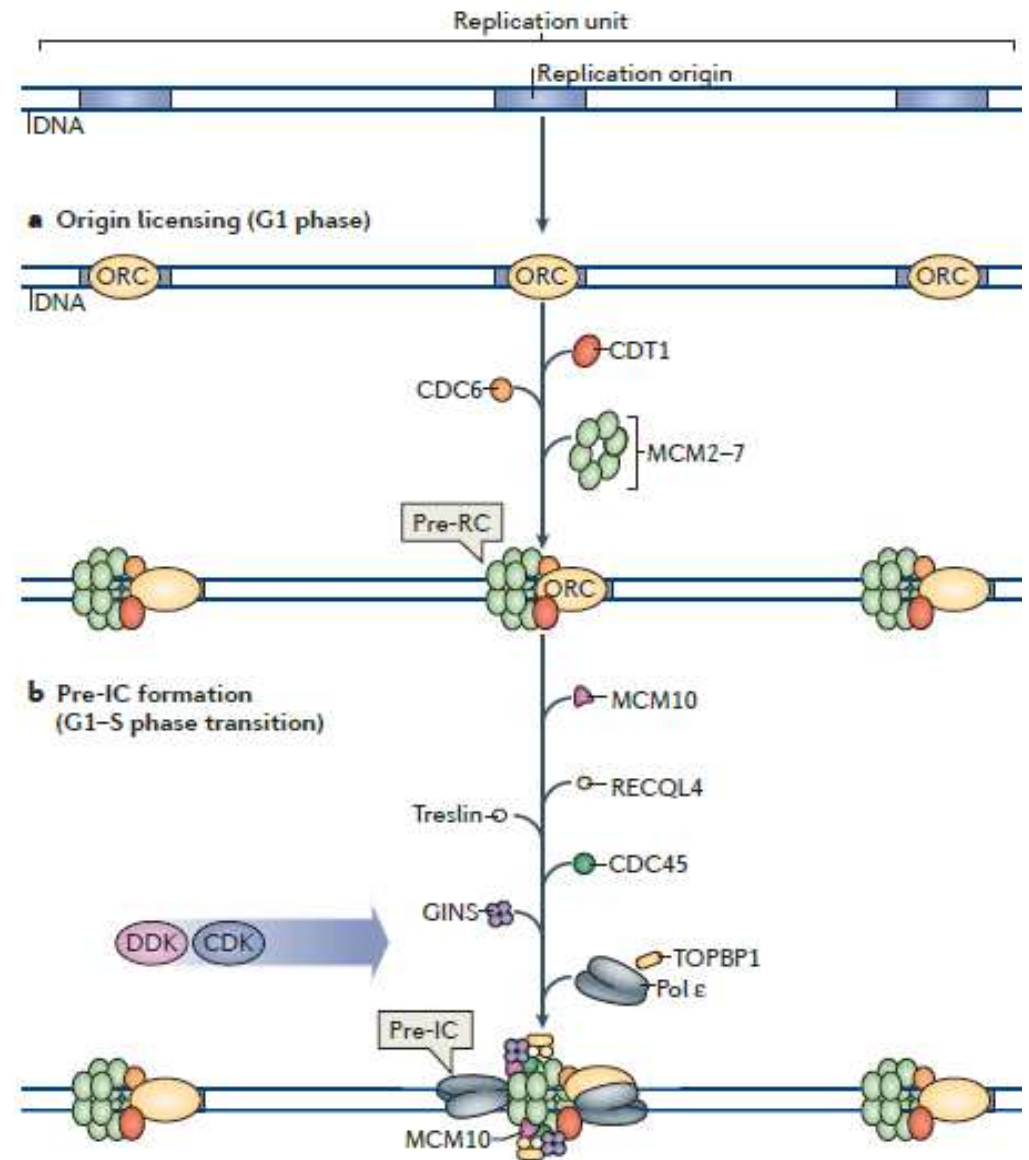
- M/G1 fáza
- **Origin licencing** = označenie všetkých potenciálnych počiatkov (ORC + inaktívna MCM2-7)
- **Origin firing** = výber aktívnych počiatkov, na ktorých dôjde k vytvoreniu replikačnej vidlice a syntéze DNA
- ostatné počiatky –backup pre prípad spomalenia alebo zastavenia susedných replikačných 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

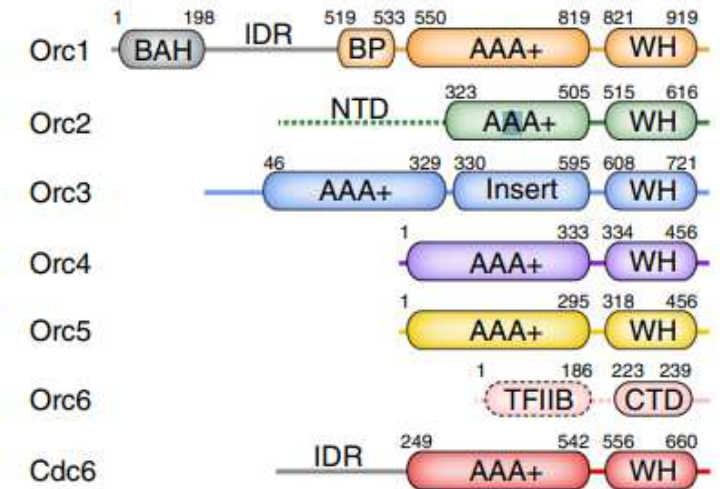
**Orc6**

- 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

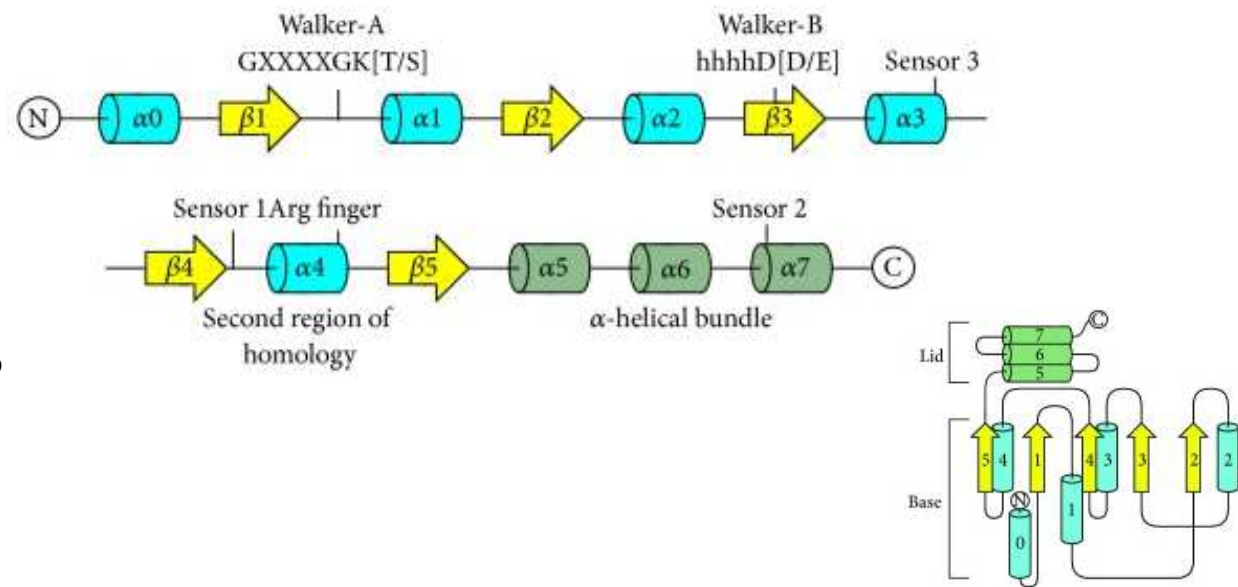
IDR = intrinsically disordered region

BP = basic patch

TFIIIB = transcription factor IIB-like domain

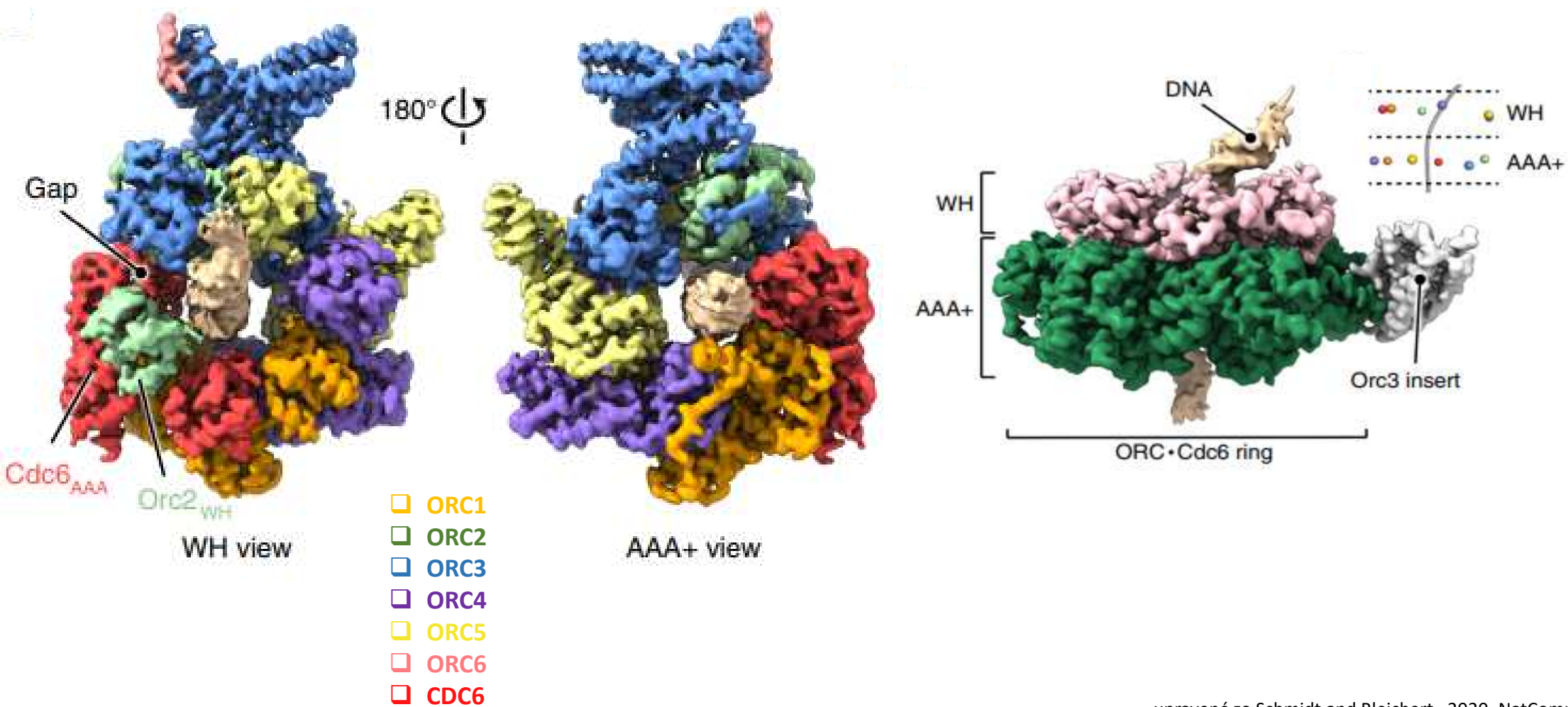
# AAA+ modul

- 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



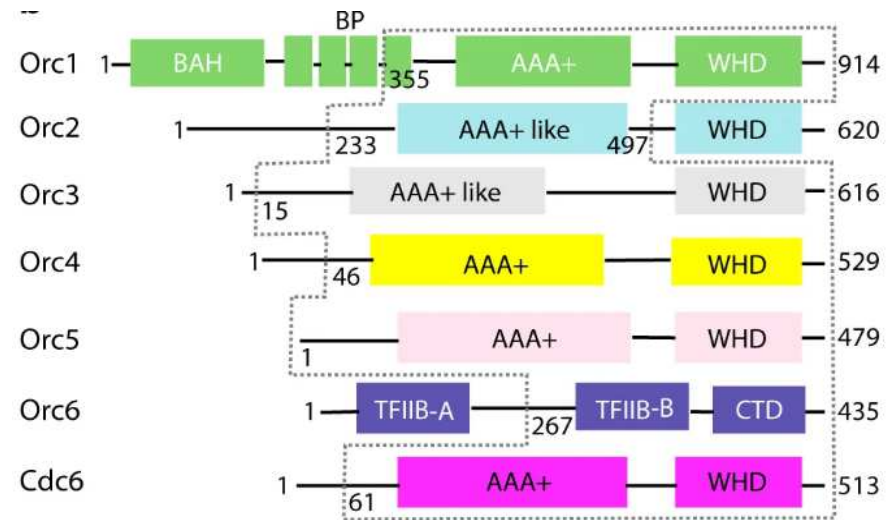
# ORC *D. melanogaster*

cryo EM

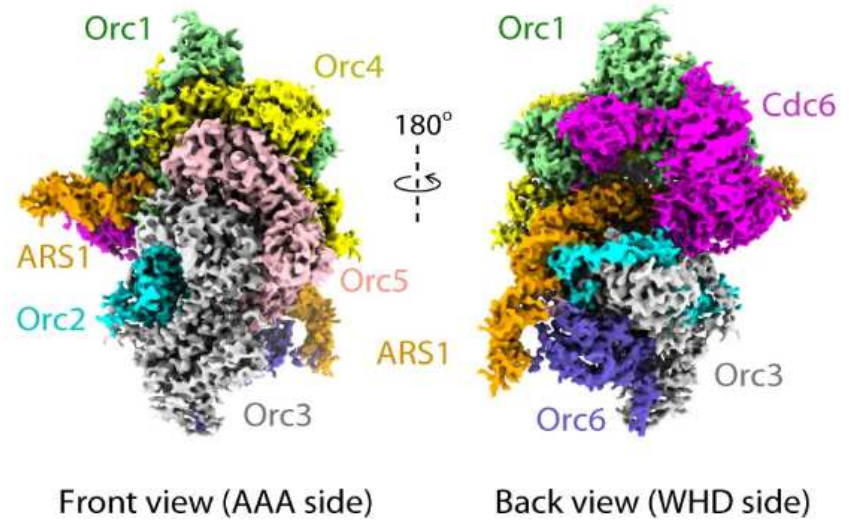


upravené zo Schmidt and Bleichert\_2020\_NatComm

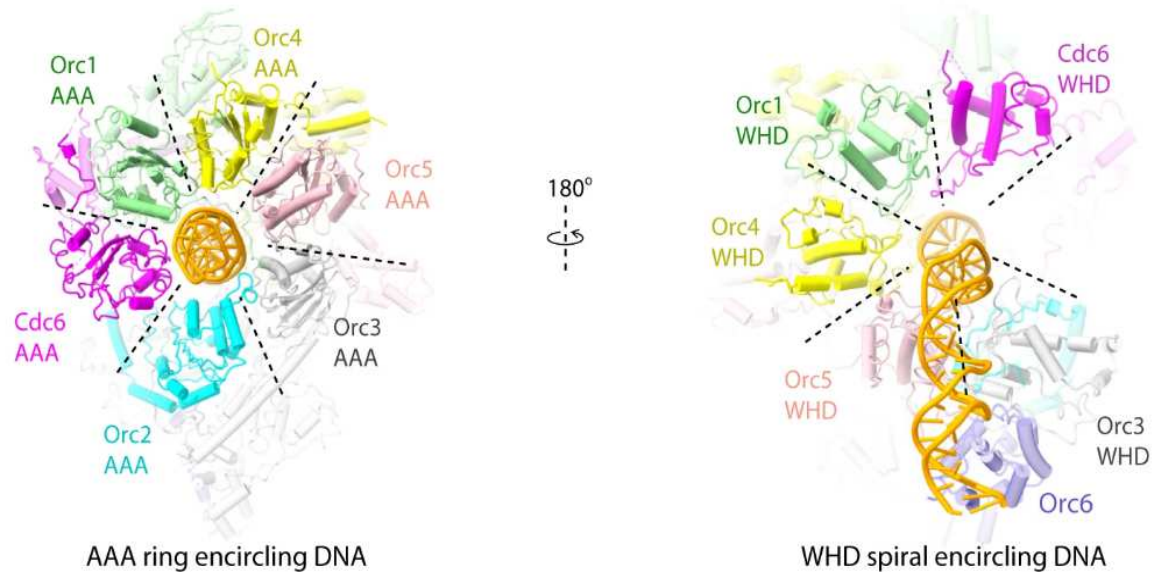
# ORC *S.cerevisiae*



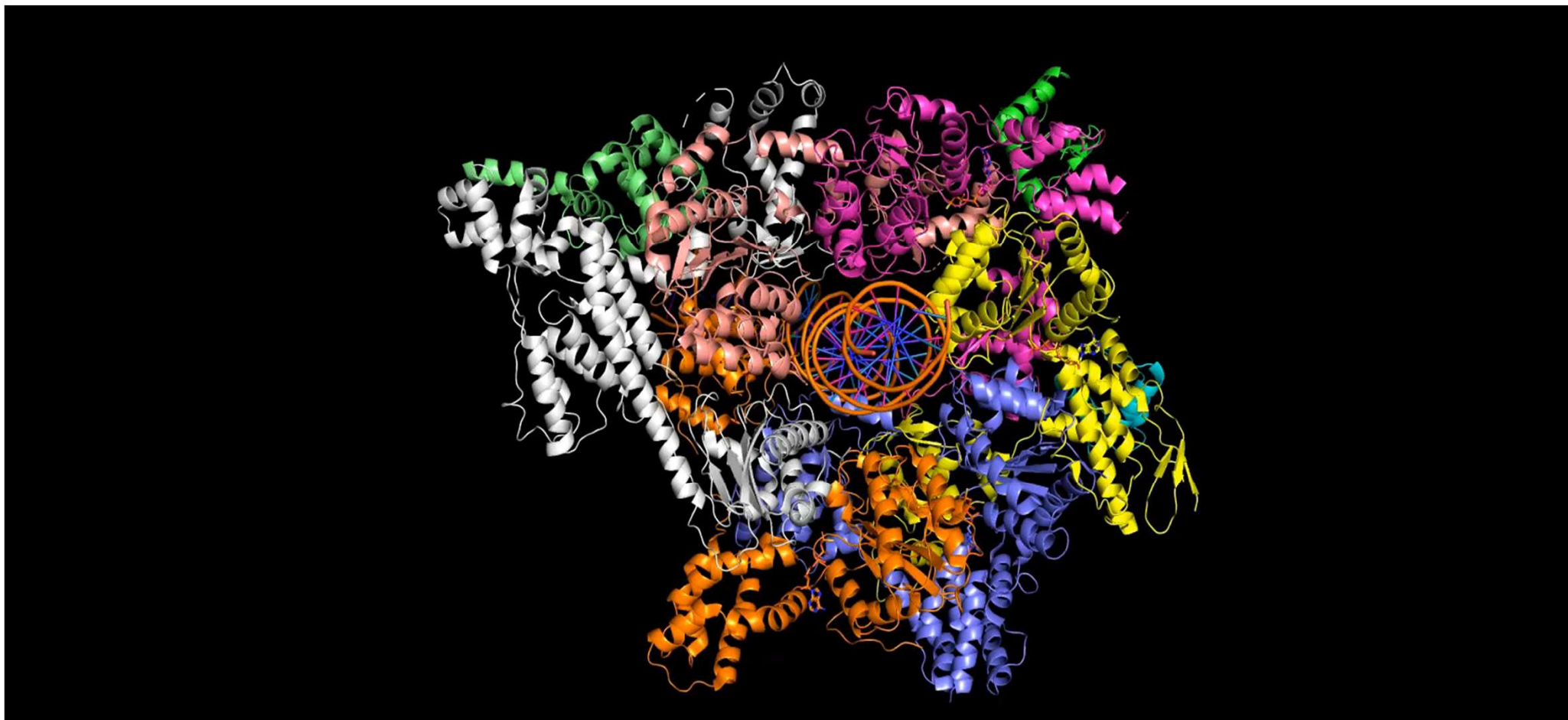
**c**



**d**



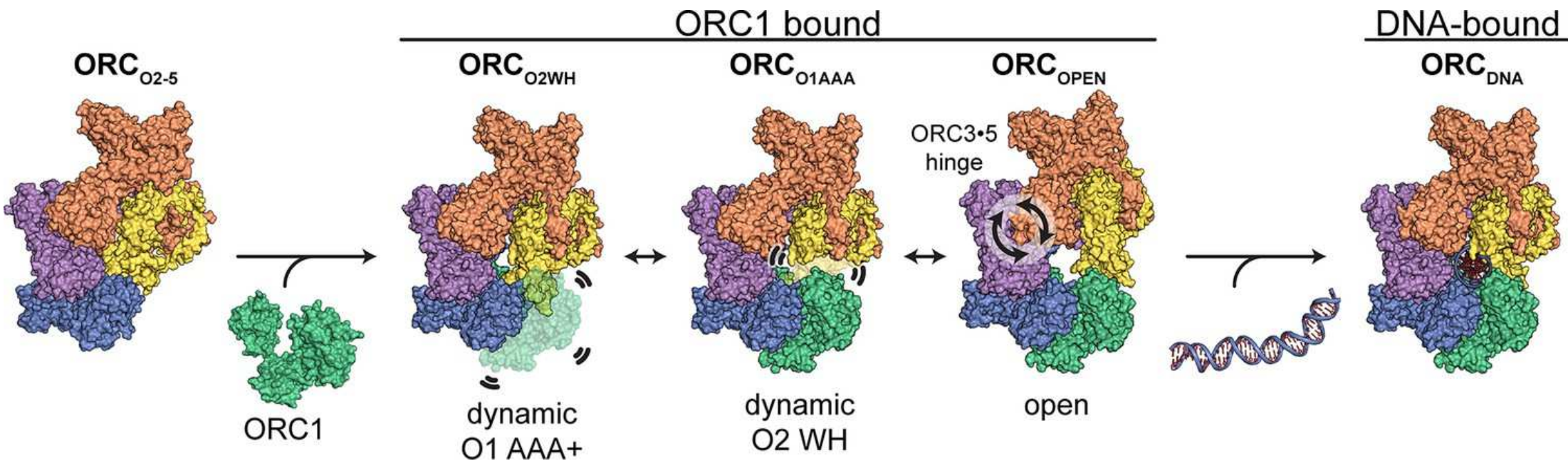
## Winged Helix domény v ORC komplexu (Sc)



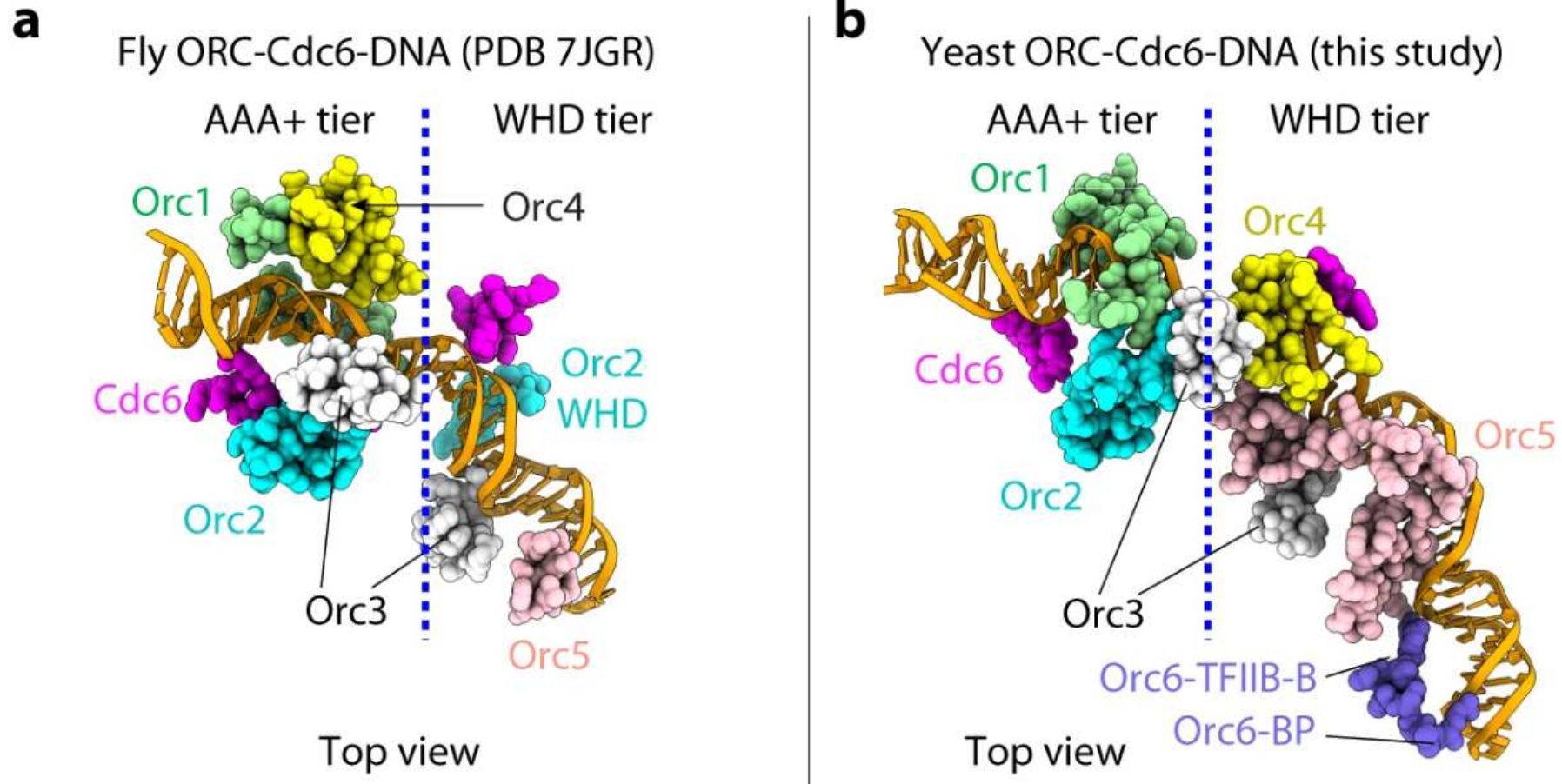
vázba WH cez krídla (špičky tvoria tunel; 6WGC)

Yuan et al, PNAS, 2020

# The dynamic nature of the human ORC



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

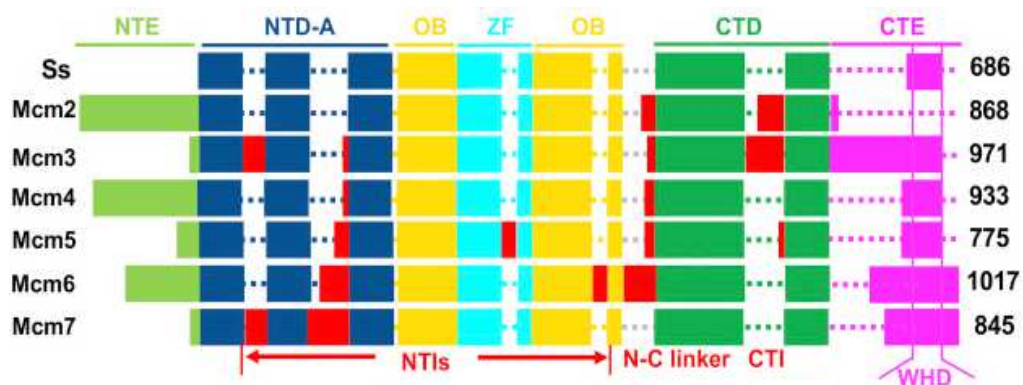




# MCM2-7 -helikáza

- 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

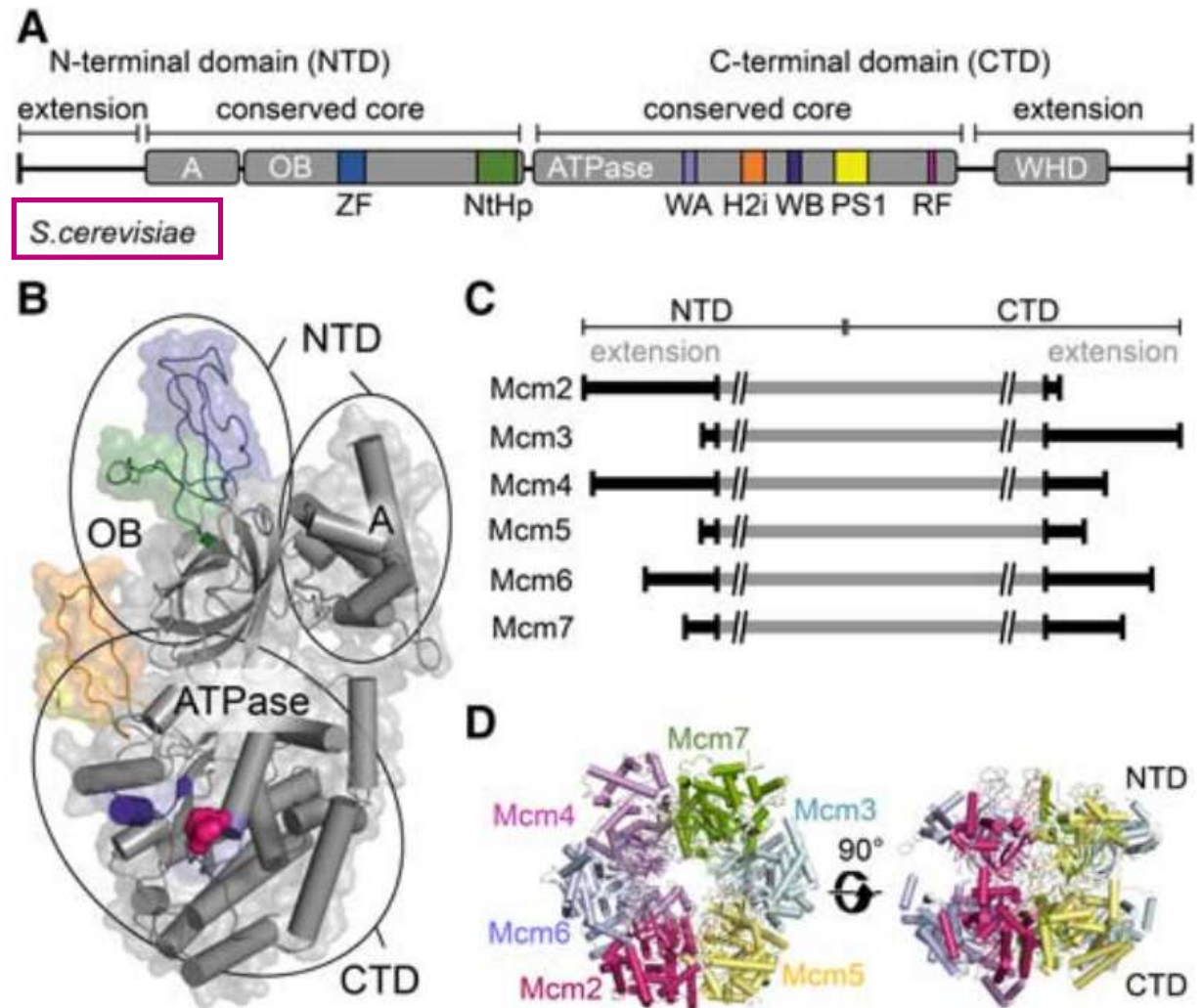
# MCM2-7 –štruktúra podjednotiek

## N-koncová doména NTD

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

## C-koncová doména CTD

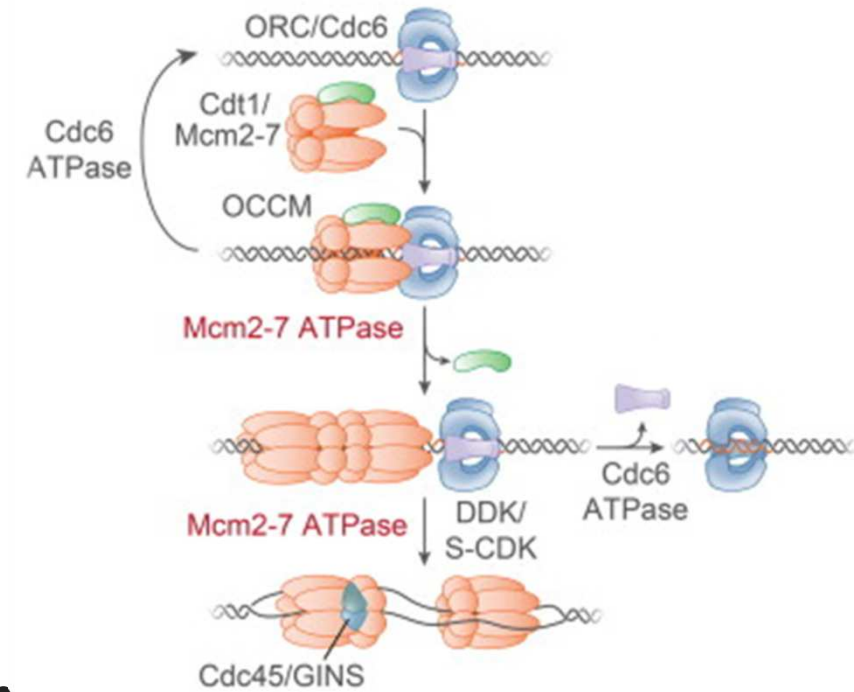
- **AAA+ ATPázová doména**
- evolučne konzervovaná
- Walker A** (väzba ATP), **H2i -helix 2 insertion  $\beta$  hairpin** (väzba DNA), **Walker B** (hydrolýza ATP), **PS1 -presensor 1** (väzba DNA), **RF -arginine finger**
- **Degenerovaná Winged Helix**
- proteín-interakčné motívy



# Aktivácia MCM helikázy

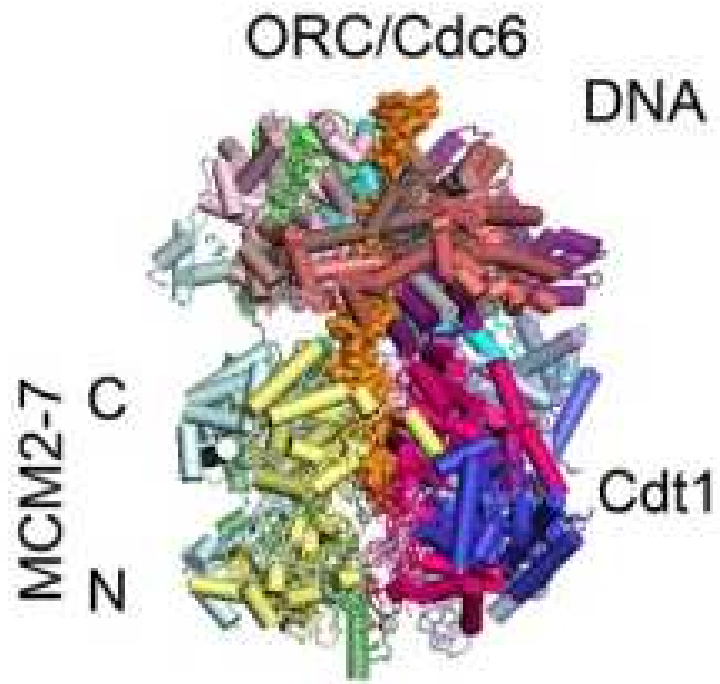
## *S.cerevisiae*:

- 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**

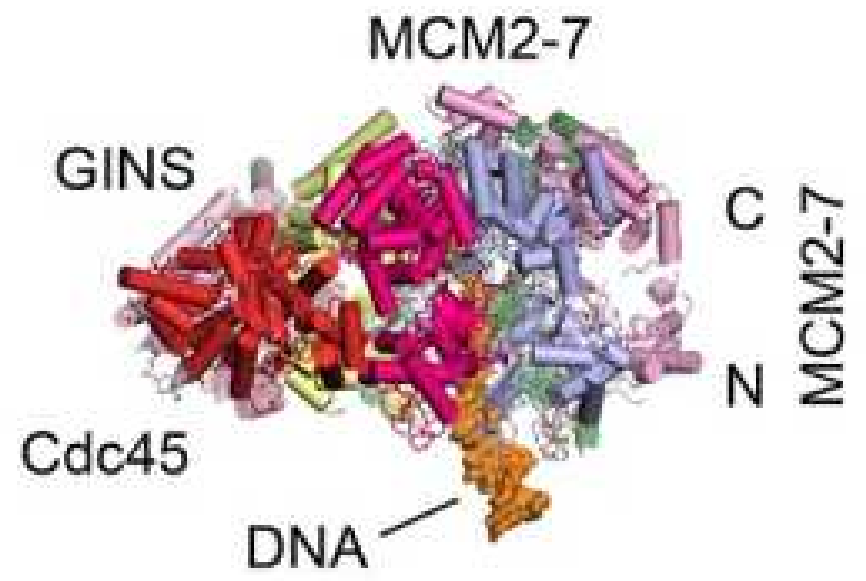
OCCM

**B**

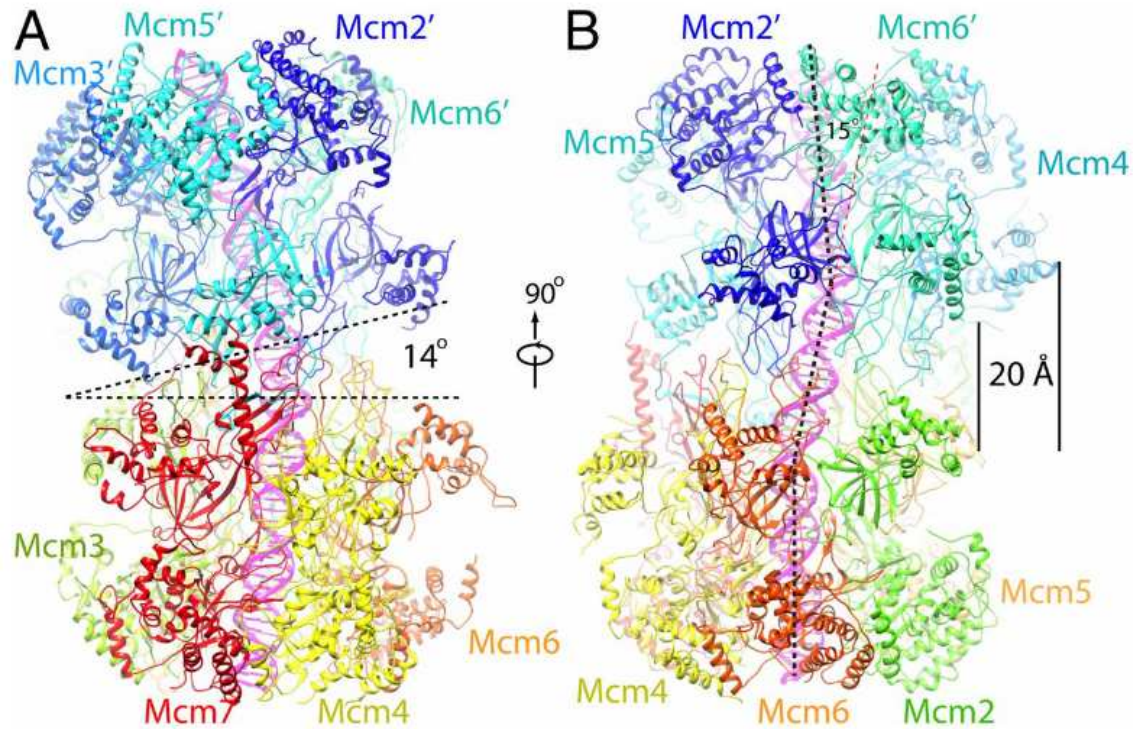
DH

**C**

CMG

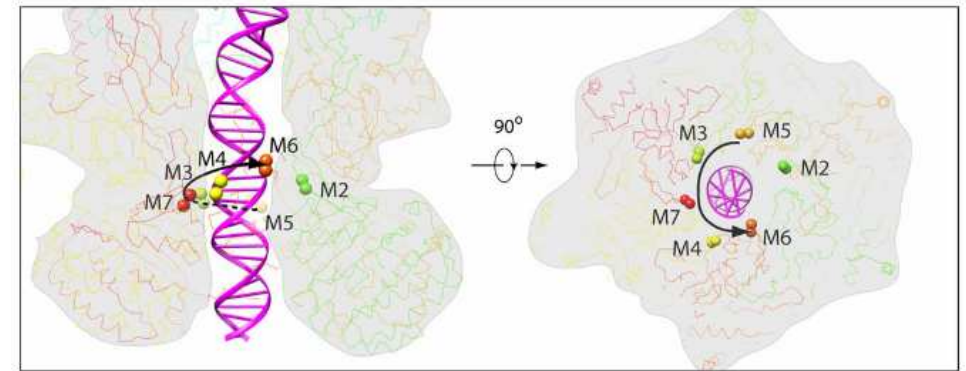


# MCM2-7 –cryo-EM štruktúra, *S.cerevisiae*

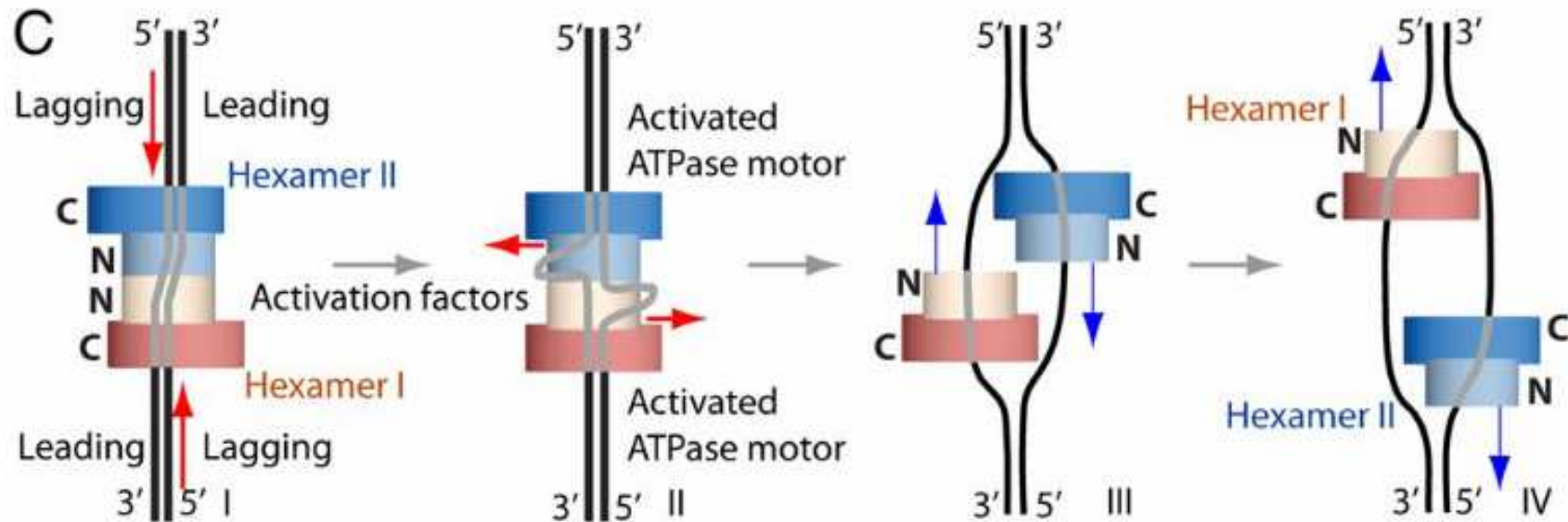


Kontakty s DNA:

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



# A lagging-strand DNA extrusion model

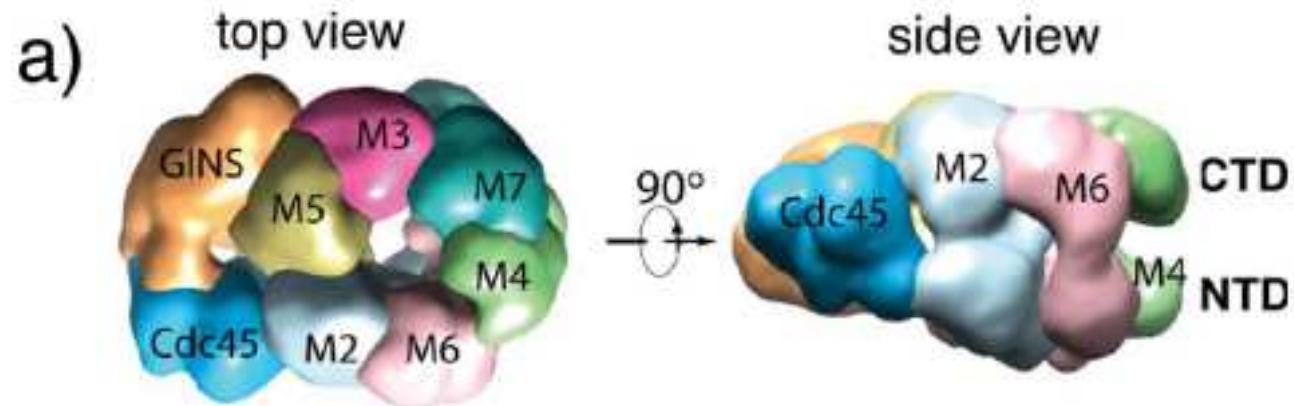


Noguchi et al\_2017\_PNAS

- 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

- Cdc45
- MCM2-7 hexamér
- GINS komplex



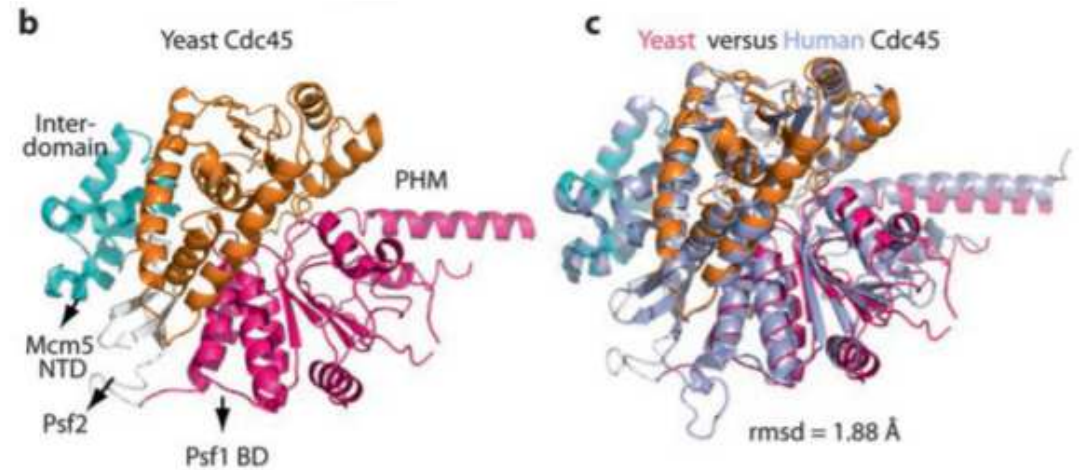
Sun et al\_ 2016\_Nucleus

- Cdc45 a GINS sa viaže na NTD MCM komplexu
- helikázová aktivita na dsDNA
- väzba 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

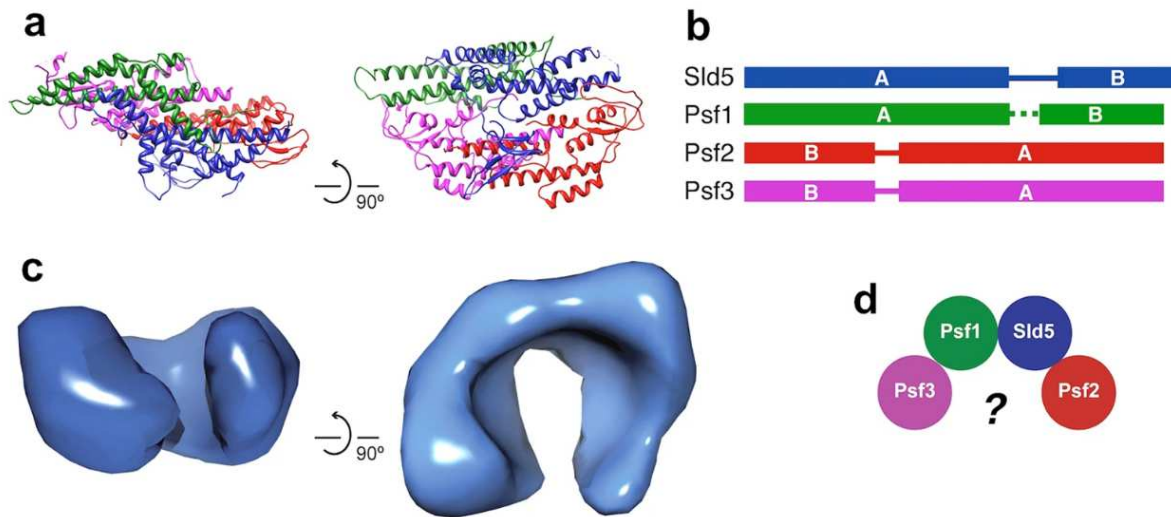
- konzervovaný
- dve **RecJ-like  $\alpha/\beta$**  domény oddelené krátkou helikálnou inter-doménou (ID)
- **ID** stabilizuje NTD domény Mcm2 a Mcm5
- **protruding helical motif (PHM)**- stabilizácia Pol $\epsilon$
- Meier-Gorlin syndróm



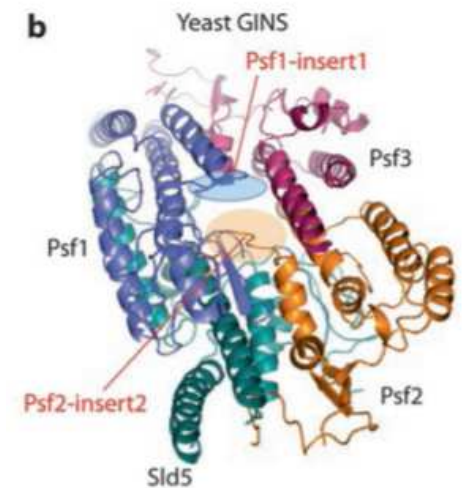
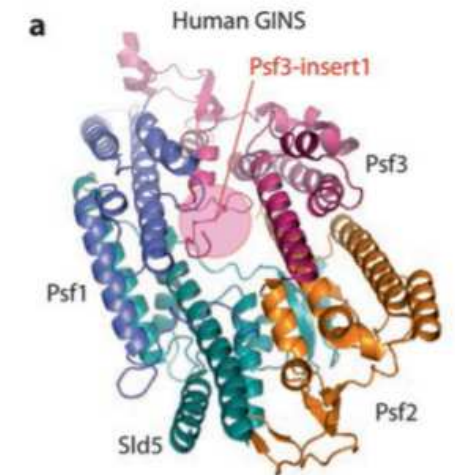


# GINS

- 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 $\alpha$ , Pol $\epsilon$ ...)
- 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
- Primáza-Pol $\alpha$ : RNA/DNA primery na oboch ssDNA vláknach DNA
- PCNA + RFC
- polymerázy: Pol $\alpha$ , Pol $\delta$  a Pol $\epsilon$  -syntéza
- vyštiepenie primerov, dosyntetizovanie medzier
- spojenie pomocou ligázy
- relaxácia: topoizomerázy I a II

# RPA

- Replication Protein A

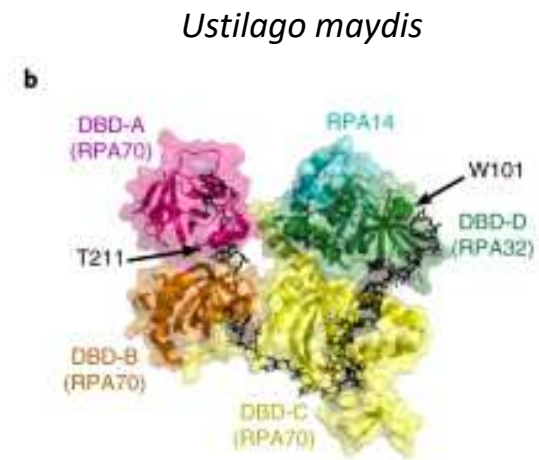
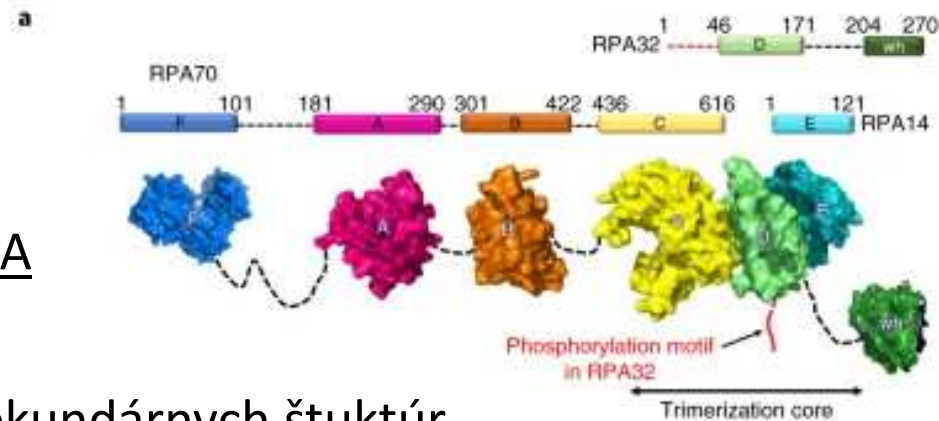
- zabraňuje tvorbe sekundárnych štruktúr
- chráni ssDNA pred endonukleázami
- úloha v replikácii a v oprave DNA
- heterotrimér 1:1:1

**RPA70** (70 kDa subunit)

**RPA32** (32 kDa subunit)

**RPA14** (14 kDa subunit)

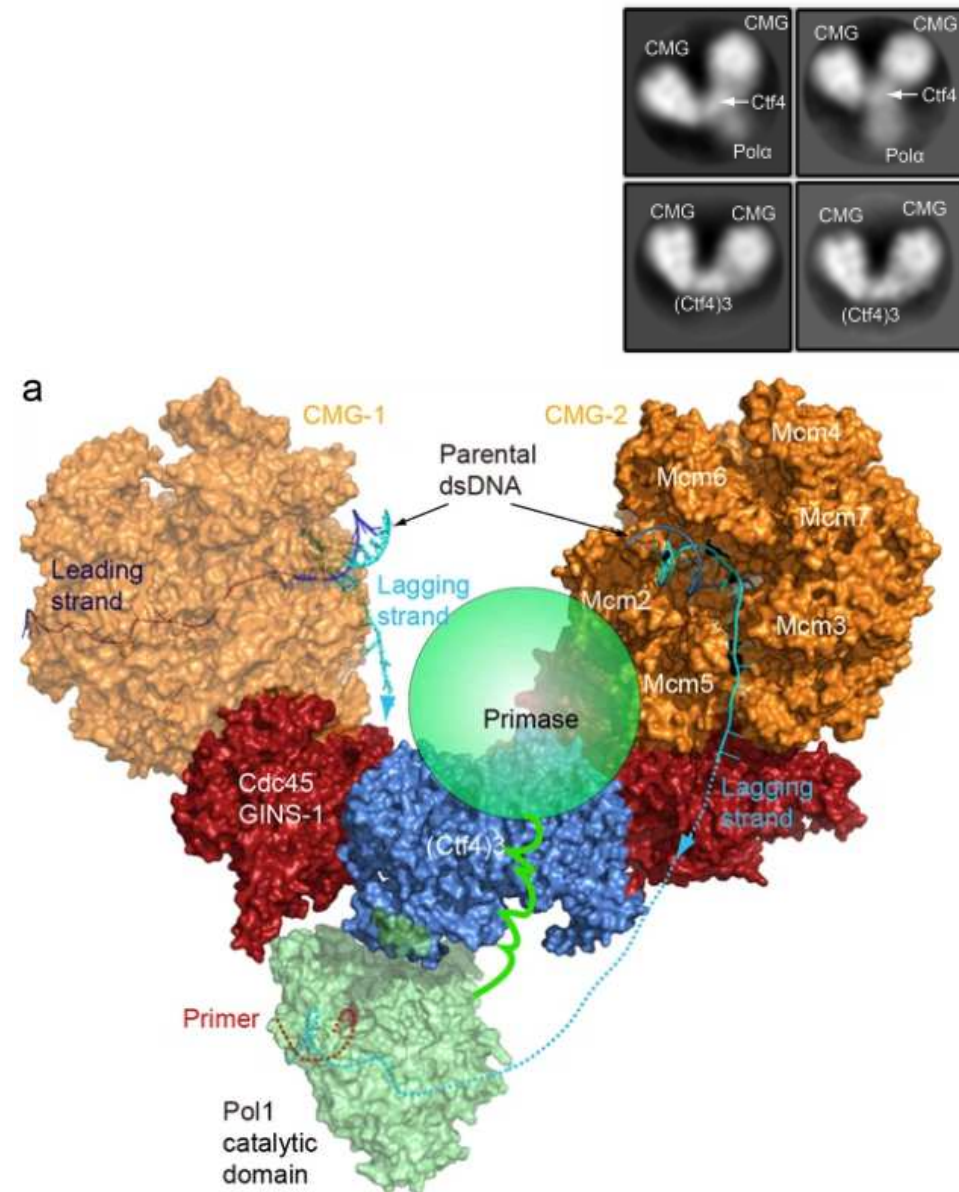
- väzba na DNA pomocou **OB foldov** A-E (oligonucleotide/oligosaccharide binding motívov)



Pokrhel et al\_ 2019\_NSMB

# DNA Pol $\alpha$

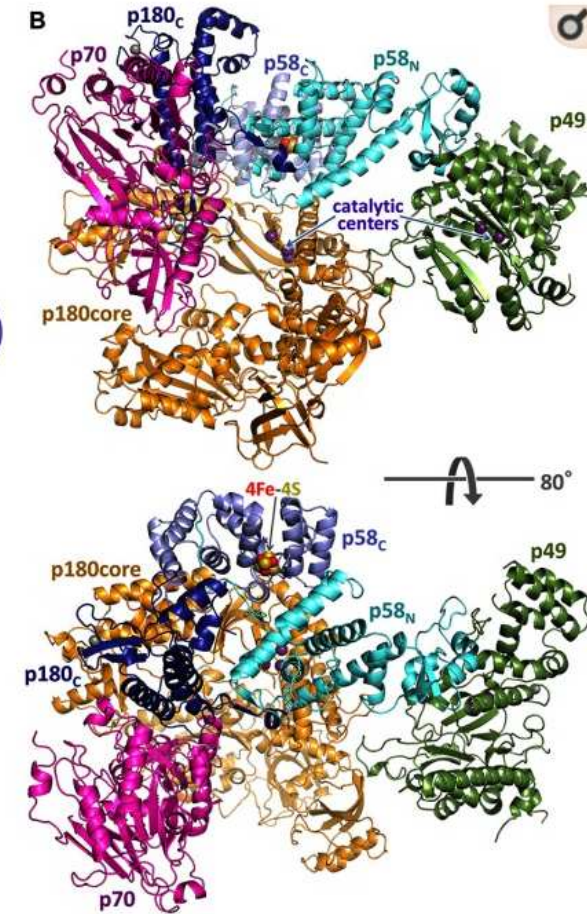
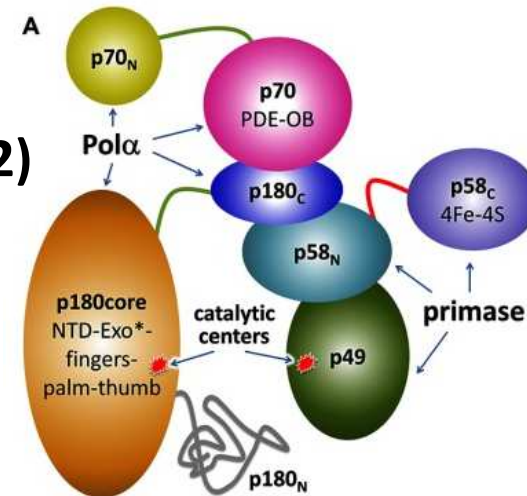
- nízka procesivita
- bez proofreadingovej aktivity = nemá 3'  $\rightarrow$  5' exonukleázovú aktivitu
- asociovaná s **primázou**
- inicializuje syntézu DNA na oboch reťazcoch
- pre aktivitu potrebuje CMG helikázu a RPA
- väzba na CMG helikázu pomocou **Ctf4 homotrimeru** (Chromosome Transmission Fidelity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



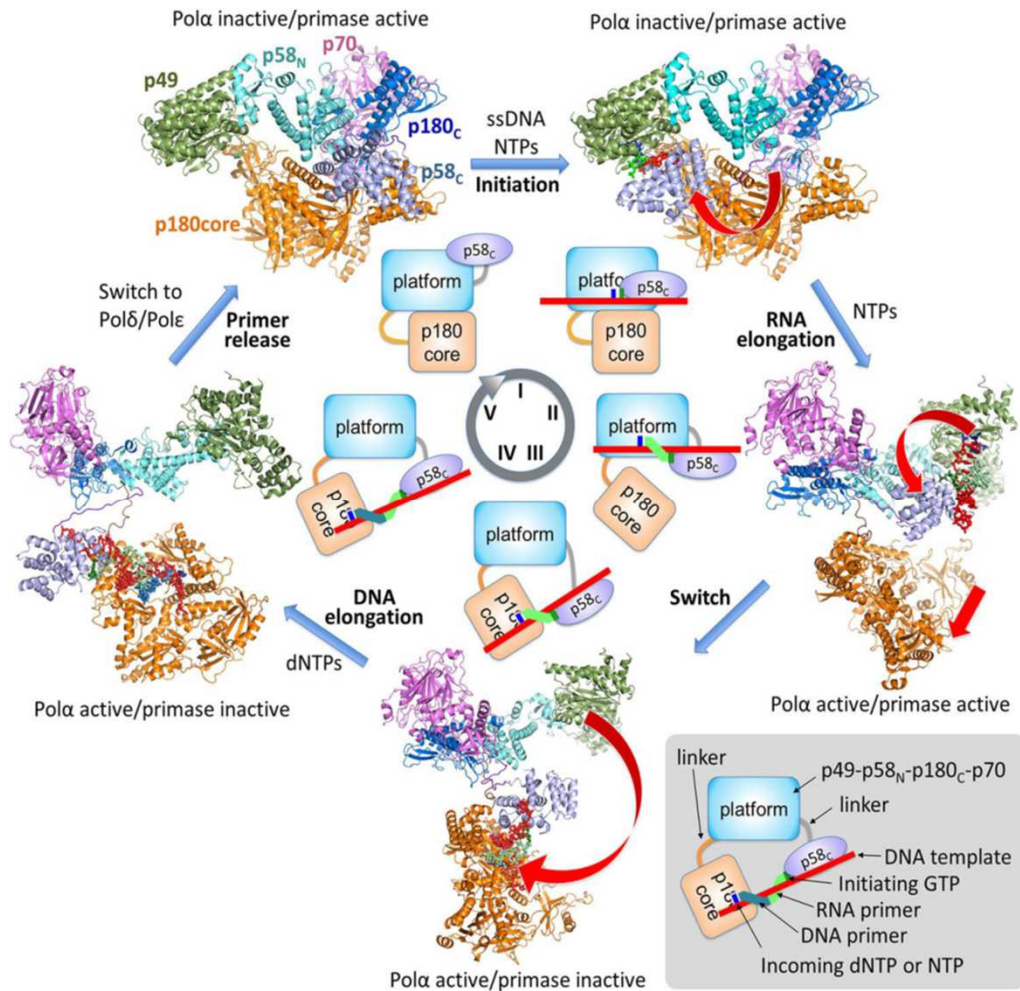
# Primozóm = Pol $\alpha$ -primáza

- 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



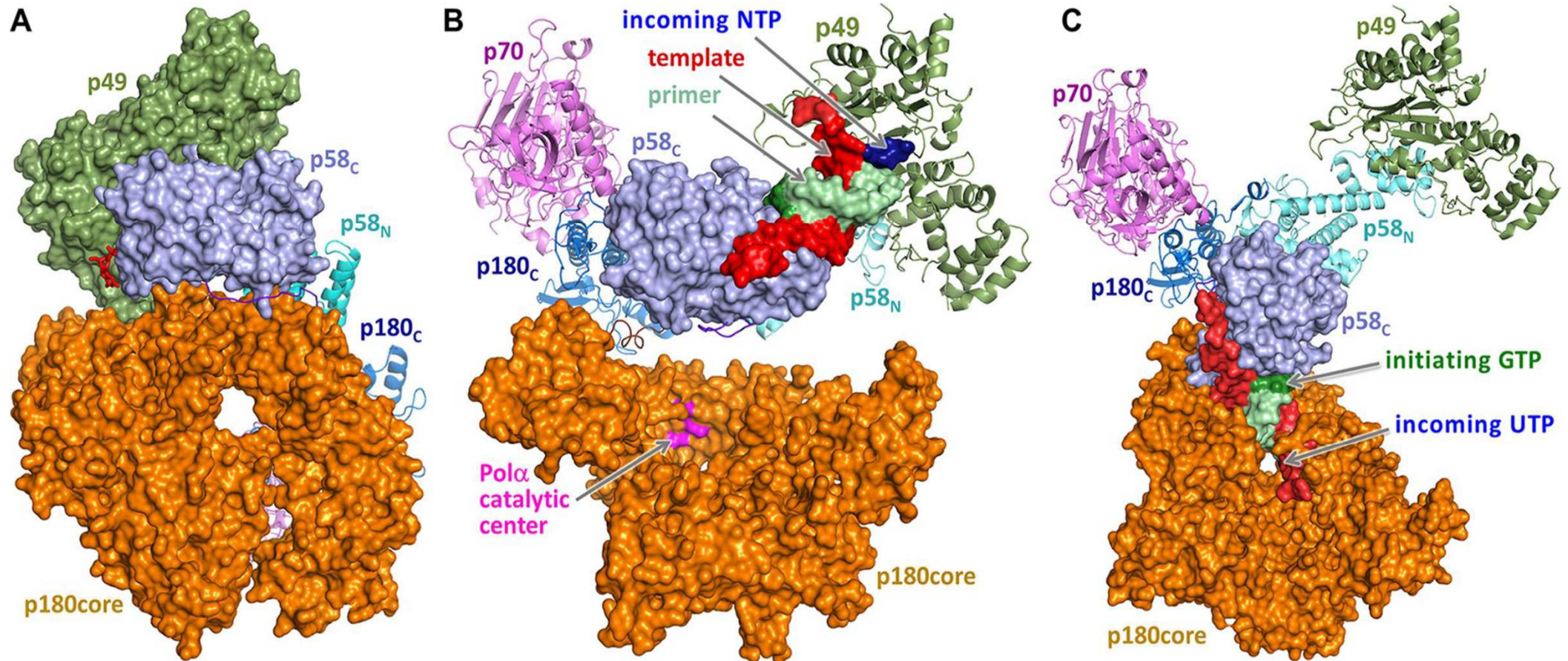
# Syntéza primerov



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

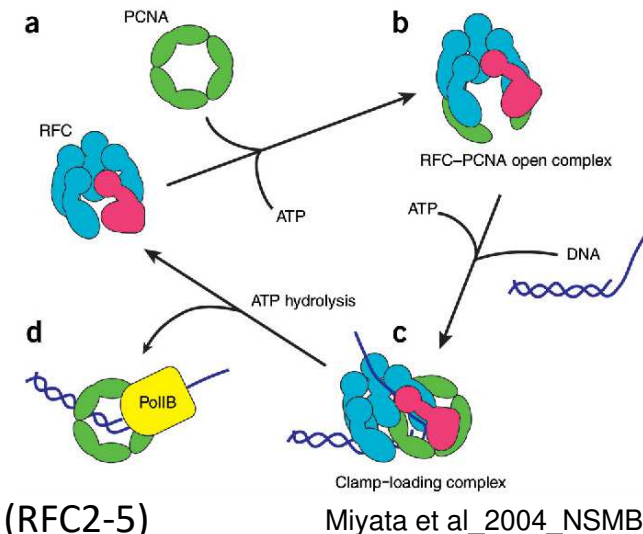
- PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
- konzervovaný od Archaea až po eukaryota
- kĺzavá svorka na DNA

- 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  $\alpha$  za Pol  $\delta/\epsilon$
- 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 $\delta$ , p21, DNA ligáza...)
- **C-terminálna časť**: interakcia s Pol $\epsilon$ , RFC, ...
- **vnútorná časť**: pozitívne nabitú šroubovice – kontakt s DNA

## PIP box (PCNA Interacting Peptide):

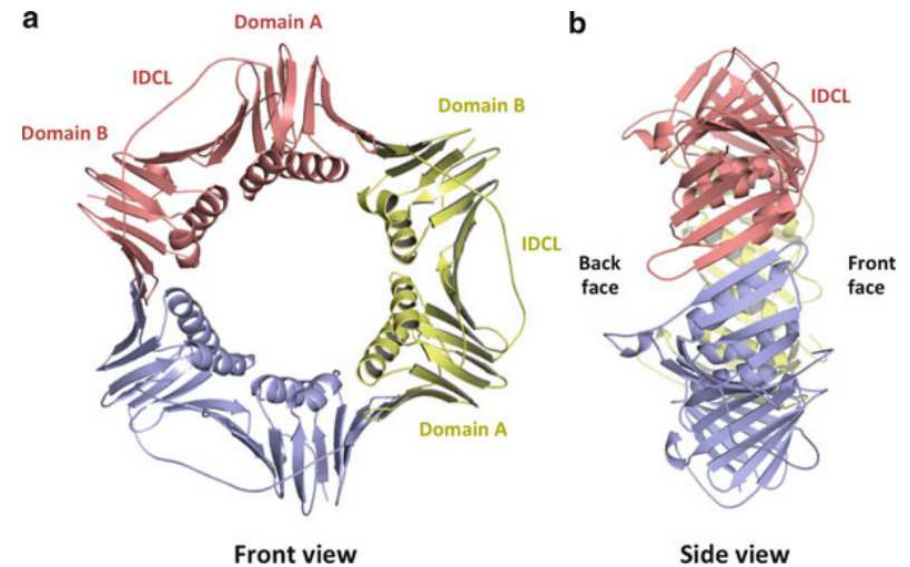
- Q-X-X-L/M/I-X-X-F/Y-F/Y
- motív interagujúci s PCNA IDCL
- DNA polymerázy, p21, Fen1, DNA ligáza...

## APIM (AlkB homologue 2 PCNA Interacting Motif)

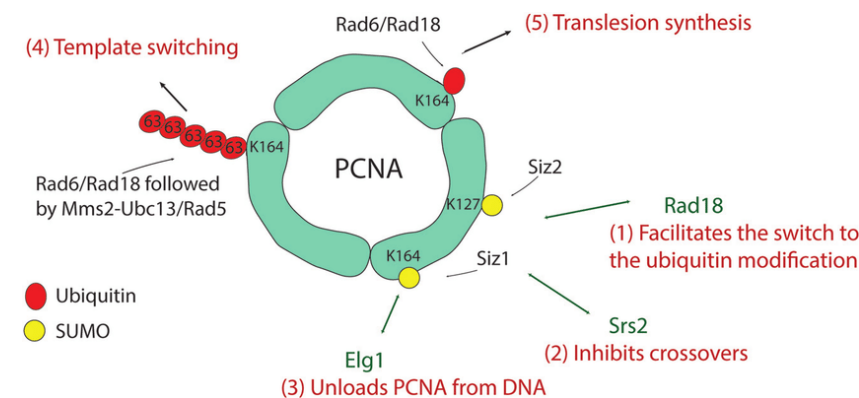
- proteiny zúčastňujúce sa opravy DNA

## PCNA kód

- posttranslačné modifikácie PCNA určujúce väzbových partnerov a funkciu PCNA



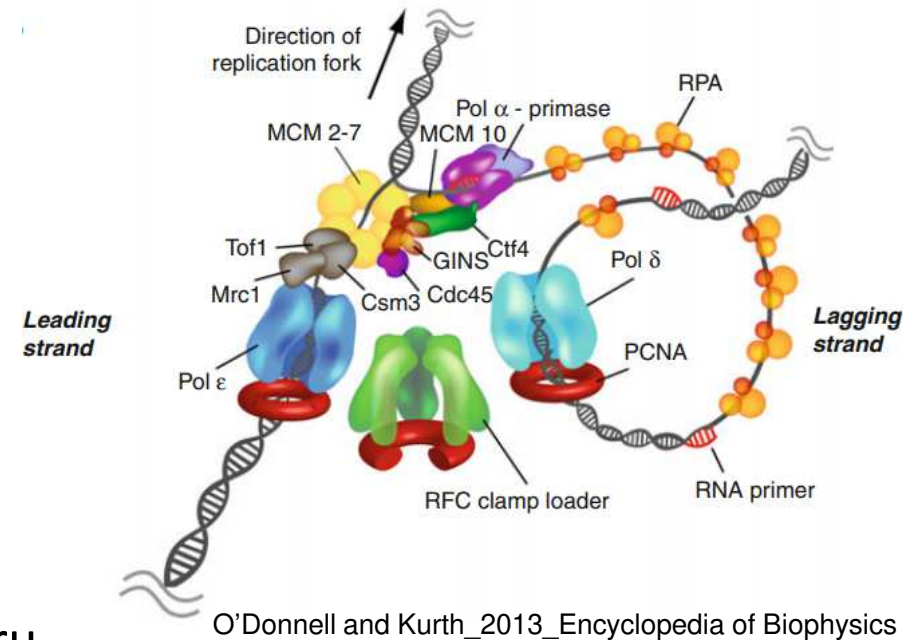
Dieckman et al\_2012\_The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function



Ahmed et al\_2017\_NAR

# DNA polymerázy $\delta$ a $\epsilon$

- 5'  $\rightarrow$  3' DNA polymerázová aktivita
- 3'  $\rightarrow$  5' exonukleázová aktivita
- po DNA putujú pomocou PCNA
- **výmena polymerázy  $\alpha$  za  $\delta$  alebo  $\epsilon$  po syntéze primeru**
- RFC loaduje PCNA na koniec primeru a na PCNA sa naviaže Pol  $\delta$  alebo  $\epsilon$
- **Pol $\delta$  syntetizuje opožďujúci sa reťazec**
- **Pol $\epsilon$  syntetizuje vedúci reťazec**
- Pol $\delta$  a Pol $\epsilon$  nemajú 5'  $\rightarrow$  3' exonukleázovú aktivitu, nevedia vyštípieť primery - **RNáza H1 a FEN1**
- polymerázy zaplnia medzery, spojenie koncov pomocou **DNA ligázy**

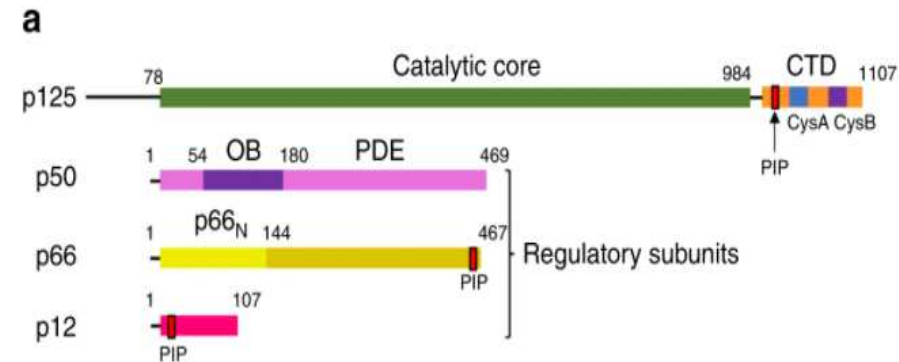


# Polymeráza $\delta$



- katalytická podjednotka polymeráz: tvar ľudskej ruky

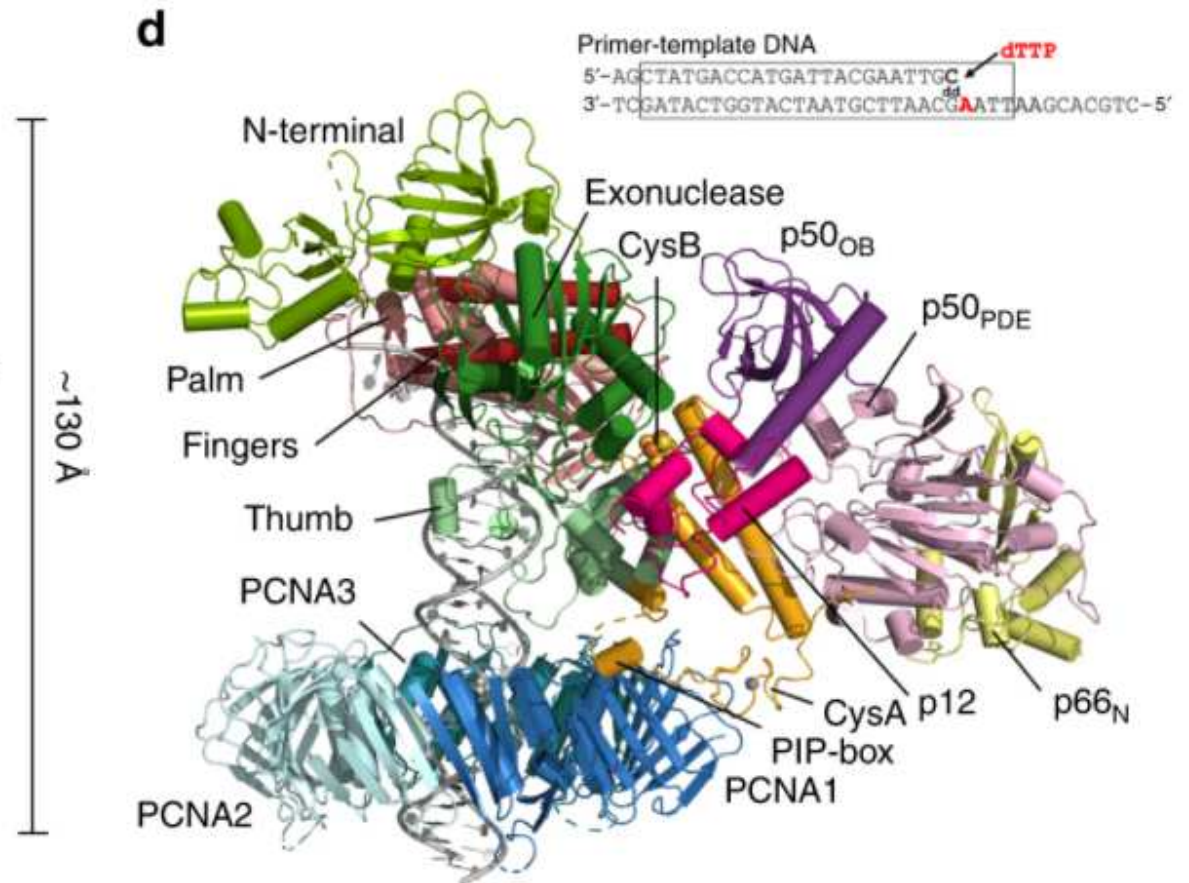
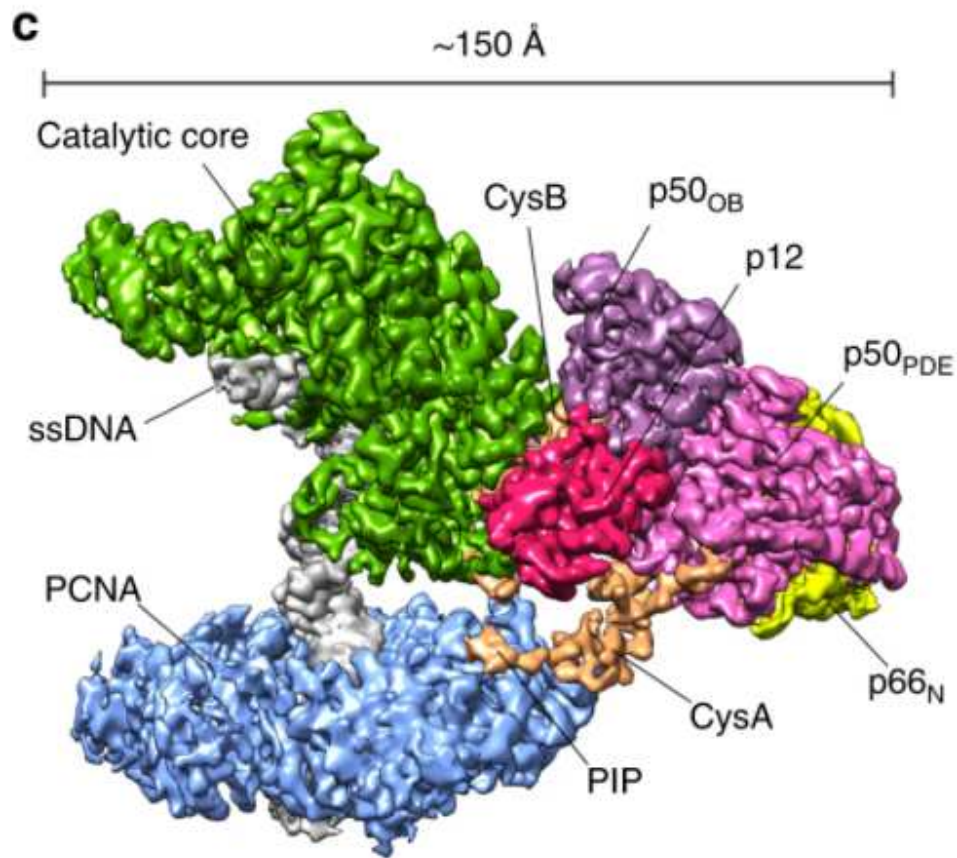
„dlaň“ je vysoko konzervovaná –polymerázová aktivita  
„palec“ drží DNA na mieste a zvyšuje procesivitu



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 $\delta$ )
- DNA ligáza spojí Okazakiho fragmenty

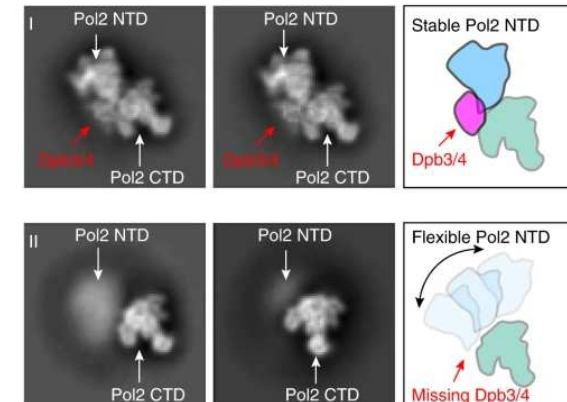
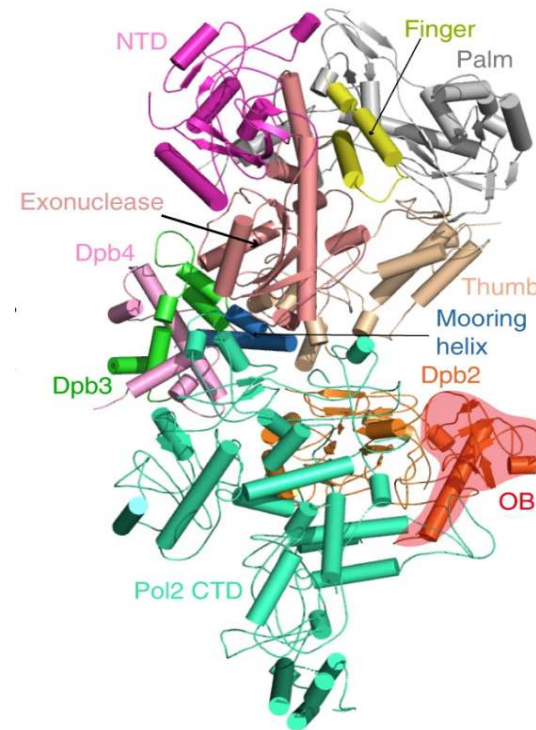
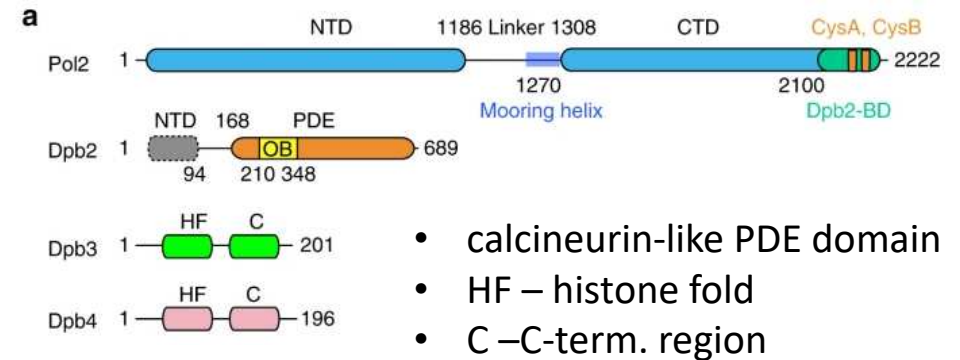
# Polymeráza $\delta$ –ľudská, cryoEM



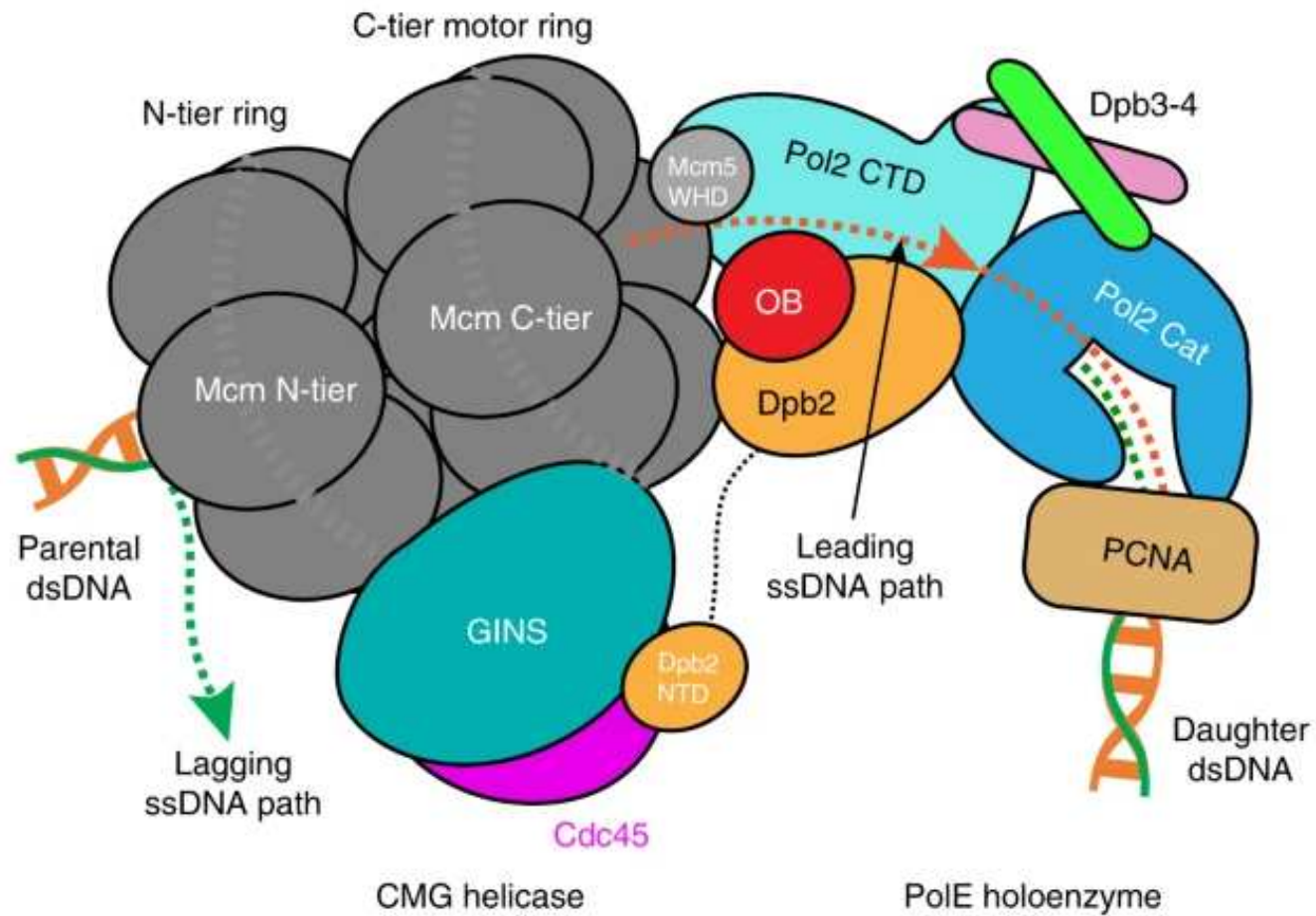
# Polymeráza $\epsilon$



- objavená v 1990 ako tretia DNA polymeráza esenciálna pre replikáciu *S. cerevisiae*
- dvojnásobná veľkosť oproti Pol $\delta$
- 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 $\epsilon$



# Leading ssDNA path from the CMG helicase to the Pol $\epsilon$

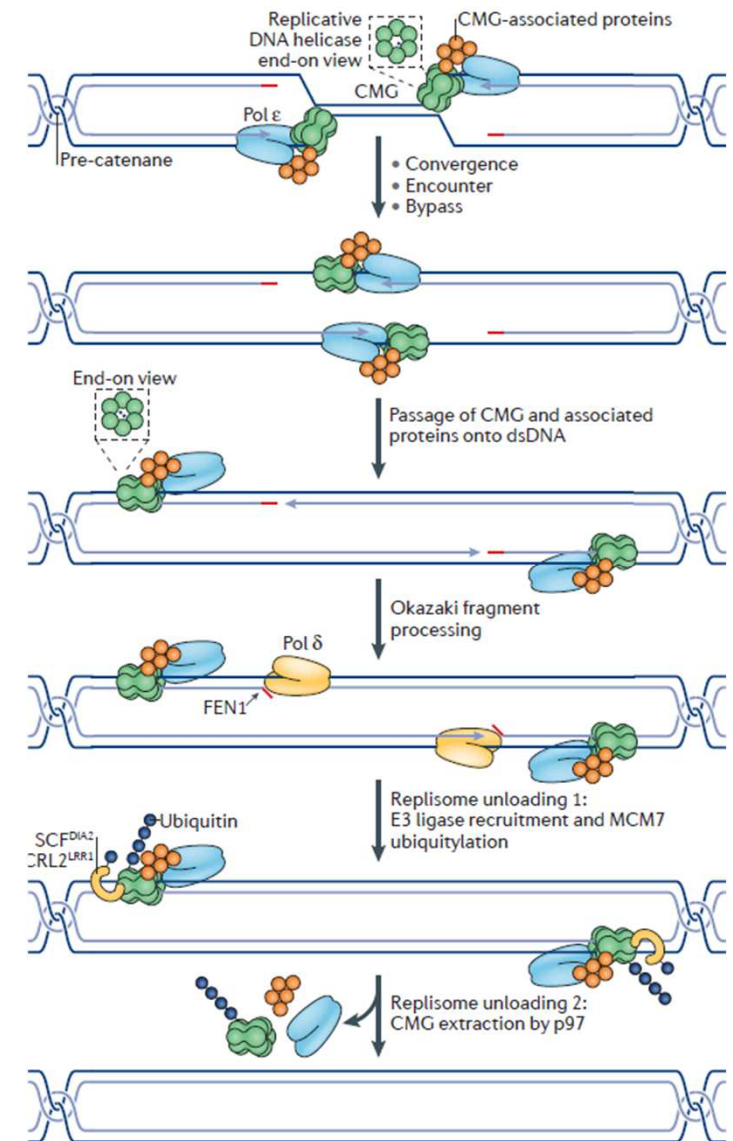


# Podjednotky polymeráz H.s. vs S.c.

Polymerase	Species		Function
<b>Polymerase <math>\alpha</math></b>	<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
<b>Polymerase <math>\delta</math></b>	<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
<b>Polymerase <math>\epsilon</math></b>	<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

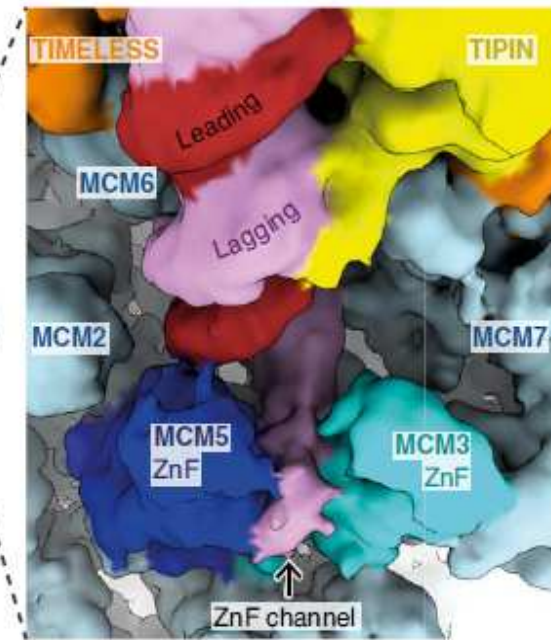
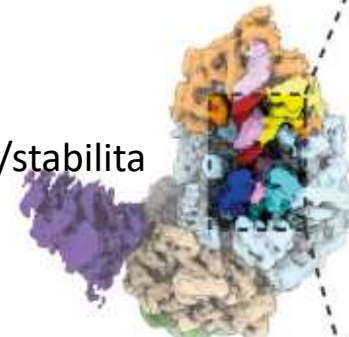
- stretnutie 2 replikačných vidlíc
- v priebehu S-fáze
- veľkosť replikonu: 31 kbp, rýchlosť replikačnej vidlice: 1,5 kb/min
- za 10 minút stretnutie dvoch replikačných vidlíc
- odstránenie CMG:
  - Mcm7 -polyubikvitylovaná na K48
  - Cdc48 rozpozná polyubikvitinylovaný CMG komplex, disociácia
  - PCNA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





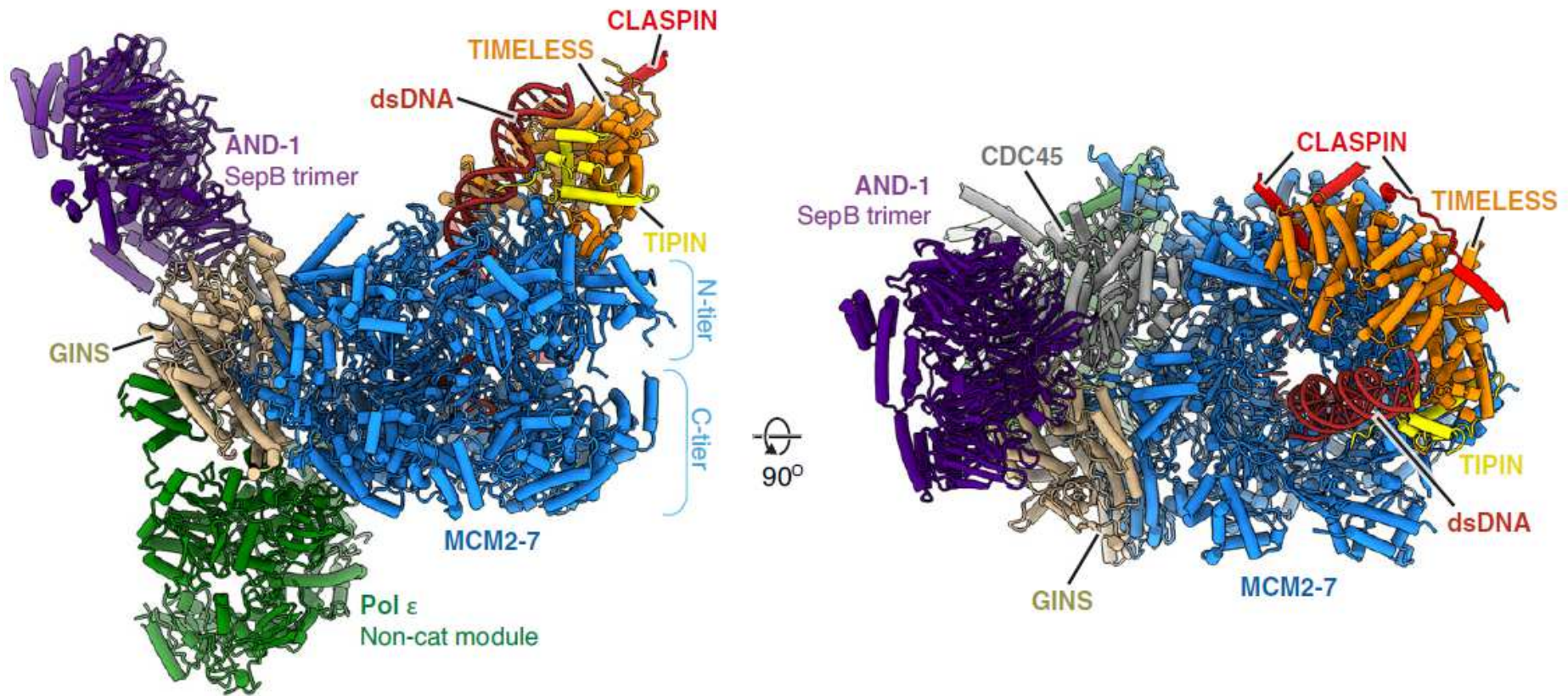
# Ľudský replizóm

- model vychádzal z kvasiniek
  - obsahuje proteíny, ktoré nemajú ortológov v kvasinkách (rozpadnutie/stabilita replizómu, prepojenie replikácie s DNA opravou)
  - model vychádzajúci z cryoEM D.m. CMG:
    - vedúci reťazec je tlačný cez centrálny kanál MCM2-7, zatiaľ čo sa opožďujúci reťazec 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) –udržiava rýchlosť replikácie, smeruje DNA do centrálného póru
- CLASPIN** (S.c. Mrc1) –odpoveď na replikačný stres
- AND-1** (S.c. Ctf4) –trimér, „scaffold“ –základňa pre väzbu ďalších proteínov na replikačnú vidlicu



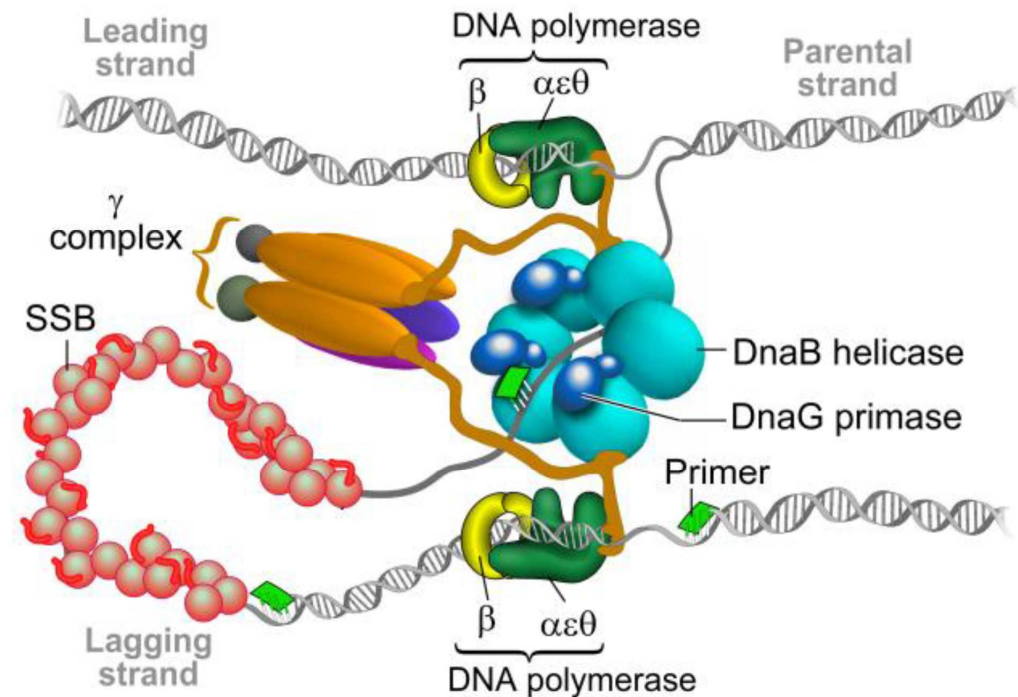
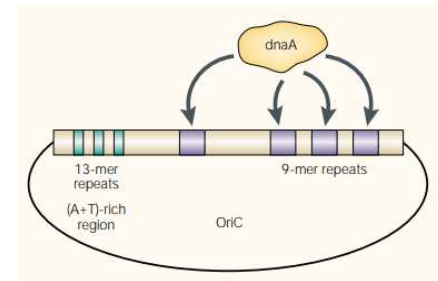
Jones et al\_2021\_EMBOJ

# 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:  $\alpha$ ,  $\epsilon$  a  $\theta$  –syntéza oboch reťazcov
  - PolIII $\alpha$  –syntéza DNA
  - PolIII $\epsilon$  –proofreading (3' → 5' exonukleáza)
  - PolIII $\theta$  –neesenciálna, stabilizuje  $\epsilon$
- **(PolIII $\beta$ )<sub>2</sub>** –kĺzavá svorka, procesivita polymerázy
- **CLC** (Clamp Loader Complex) –loader svorky,  **$\gamma$  komplex**

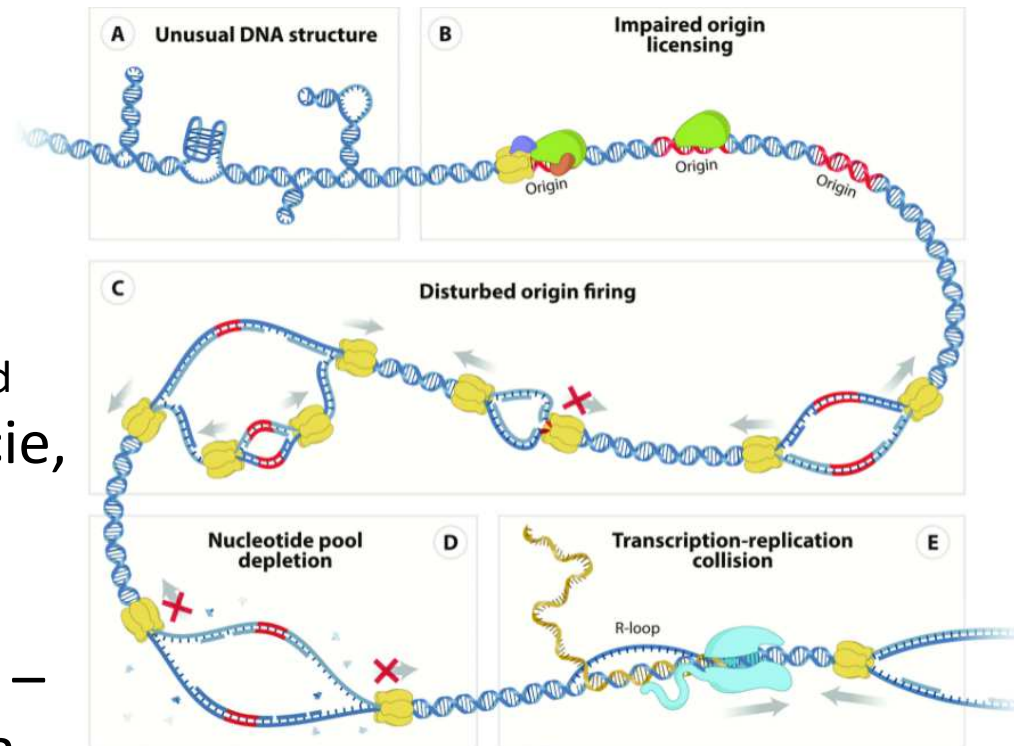


# Replikácia v baktériách *Escherichia coli*

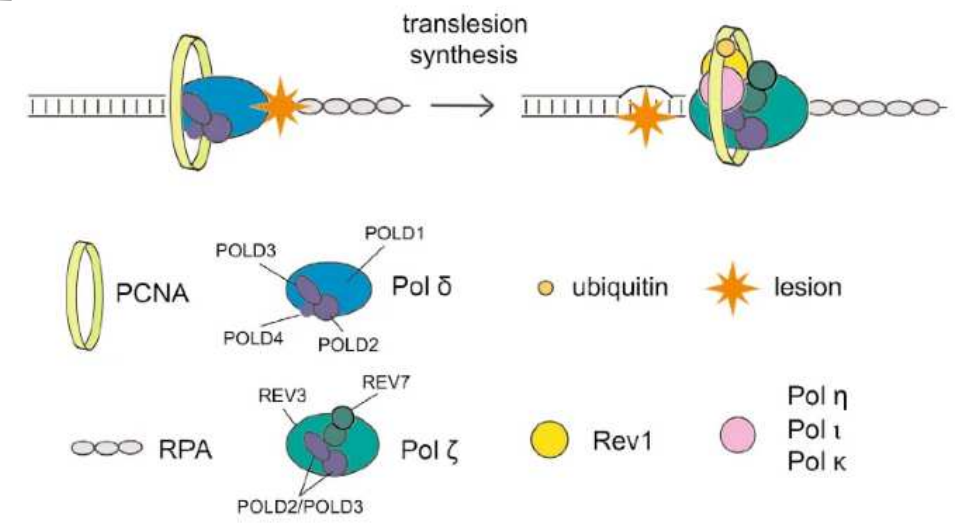
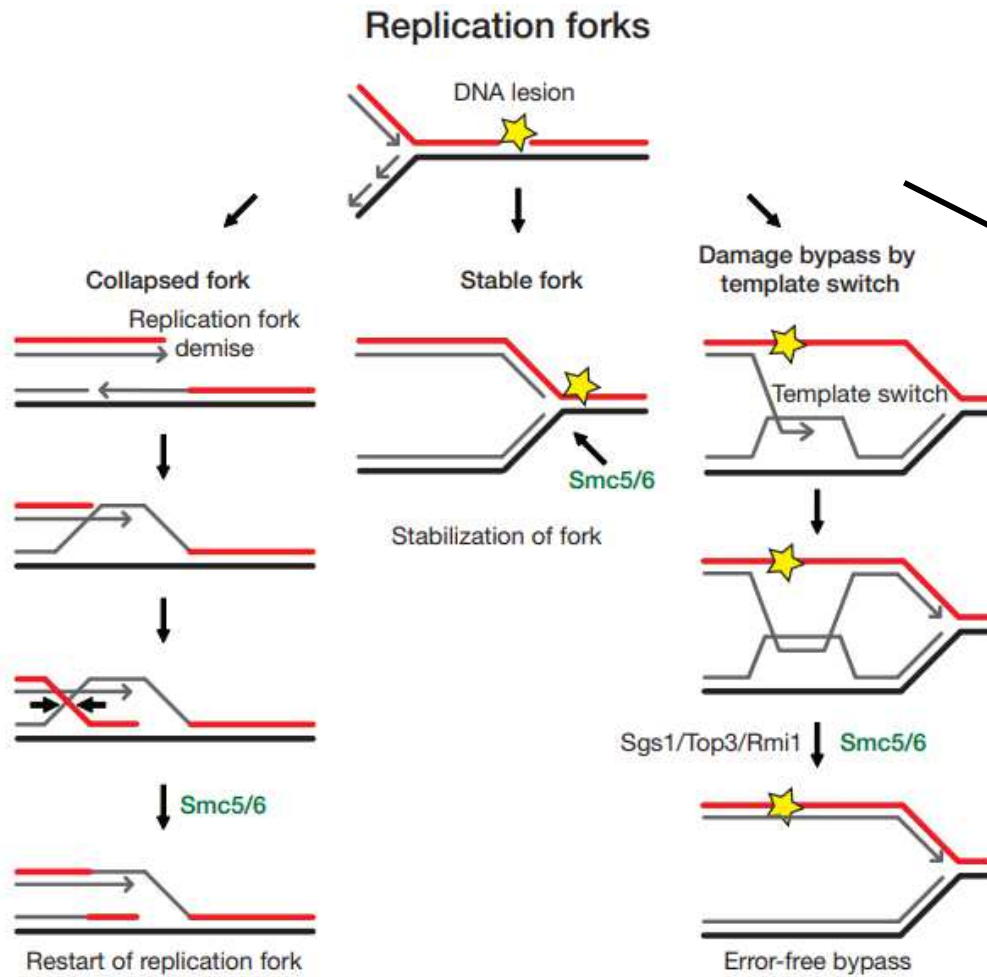
E. coli Gene	Enzyme/Protein Function	Description
<i>dnaA</i>	Initiator Protein	Melts DNA at <i>oriC</i> , exposing two template ssDNA strands
<i>dnaB</i>	Helicase	Unwinds the DNA helix at the front end of each replication fork during replication
<i>dnaC</i>	Helicase Loader	Loads the DnaB Helicase onto the ssDNA template strands
<i>dnaG</i>	Primase	Synthesizes RNA primers used to initiate DNA synthesis
<i>dnaE</i>	$\alpha$ -Catalytic Subunit of DNA Polymerase III	Catalytic subunit of the main replicative polymerase during DNA replication
<i>dnaQ</i>	$\epsilon$ -Editing Subunit of DNA Polymerase III	Editing subunit of the main replicative polymerase during DNA replication
<i>dnaN</i>	$\beta$ -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, starnutie, anémia, rakovina,...



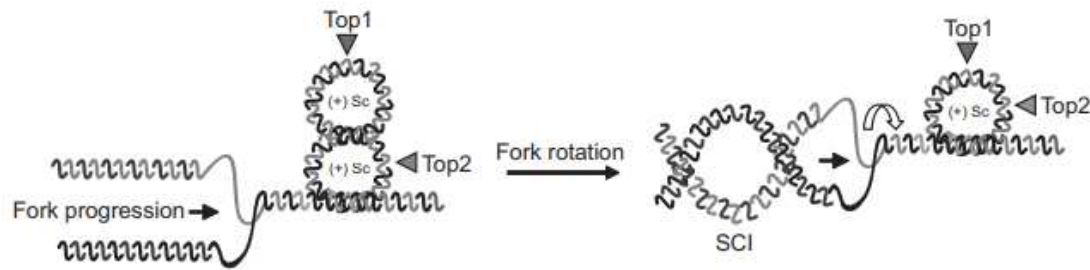
# Replikačný stres



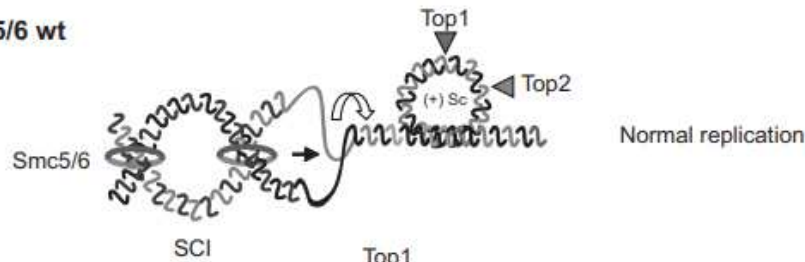
Shilkin\_2020\_Biochemistry

# SMC5/6 v replikácii

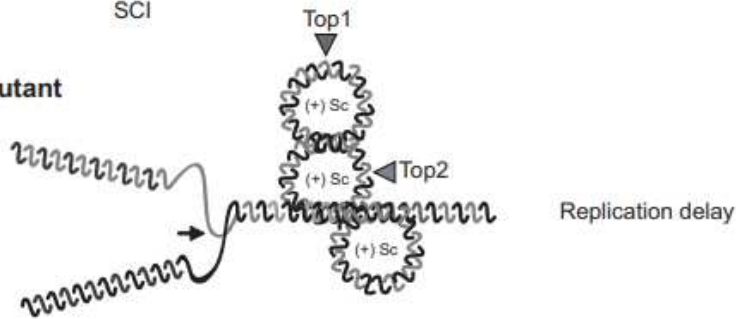
Translokáza, ATPázová aktivita, väzba ssDNA, dsDNA



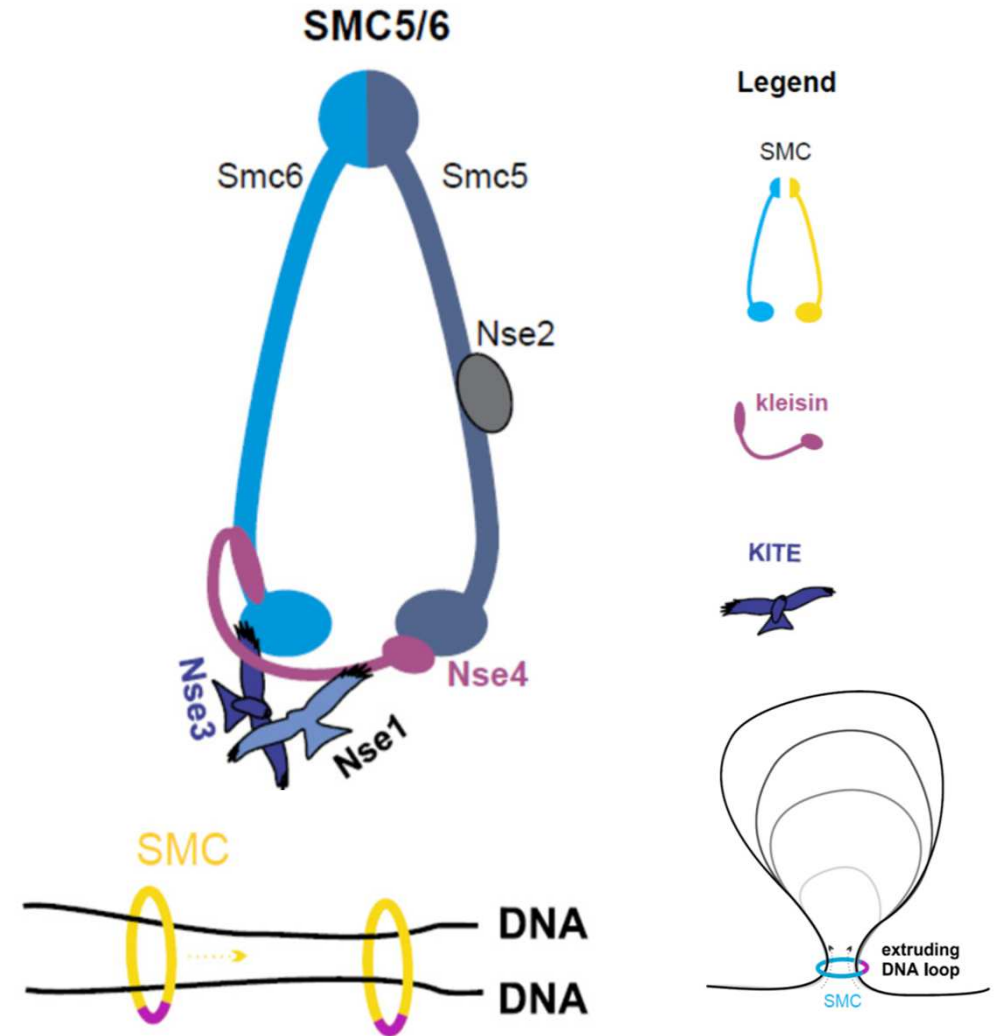
Smc5/6 wt



smc5/6 mutant



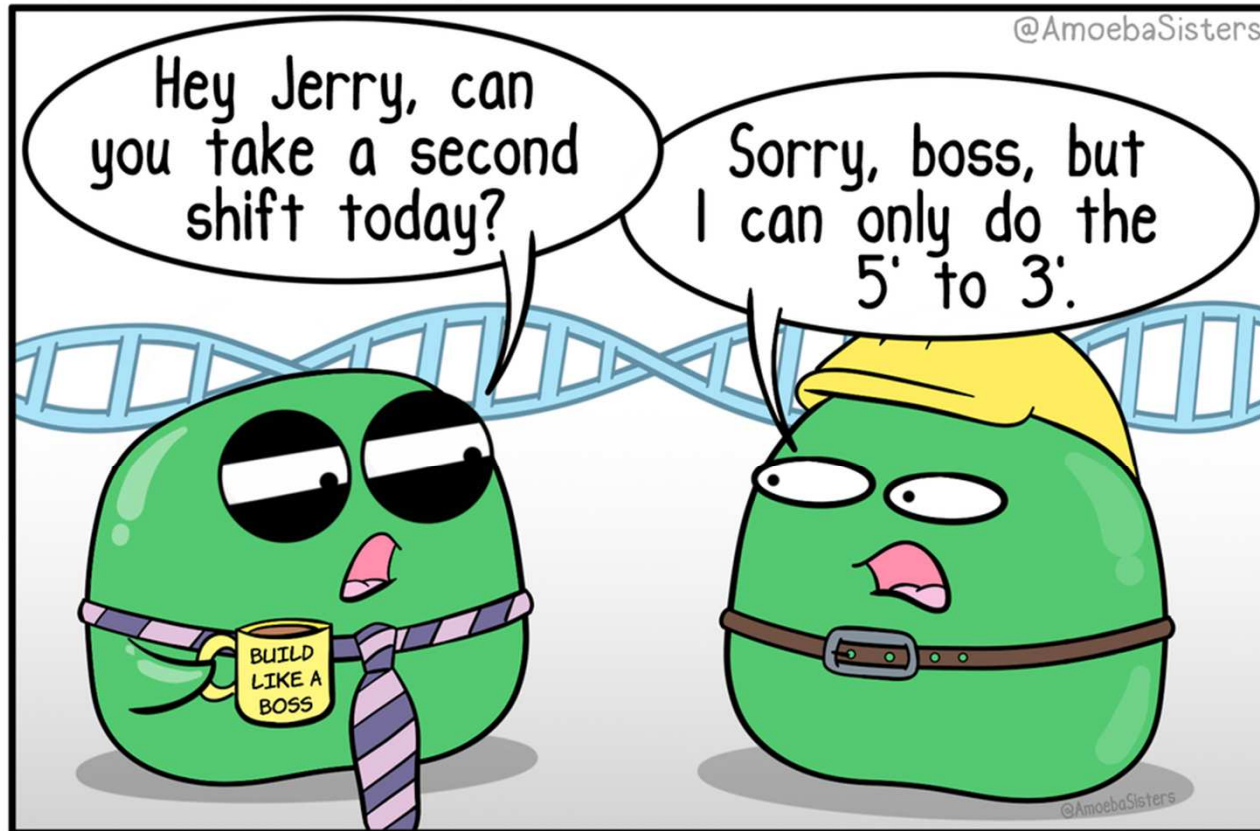
Kegel and Sjögren\_ 2010\_ Cold Spring Harb Symp Quant Biol



upravené z Paleček\_ 2018\_ Genes

# Ďakujem za pozornosť!

Paramecium Parlor



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