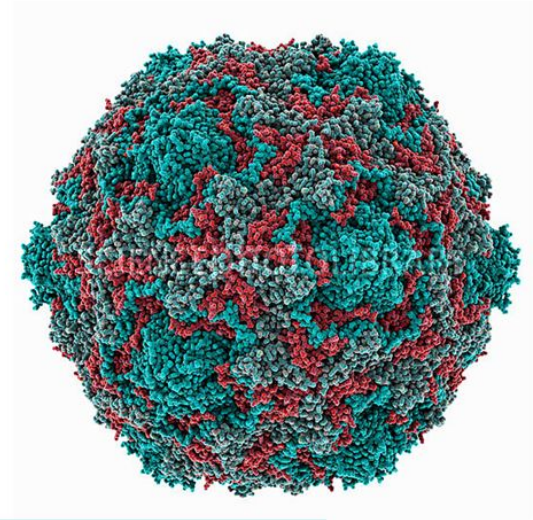


РЕПЛИКАЦИЯ. ПРОКАРИОТЫ

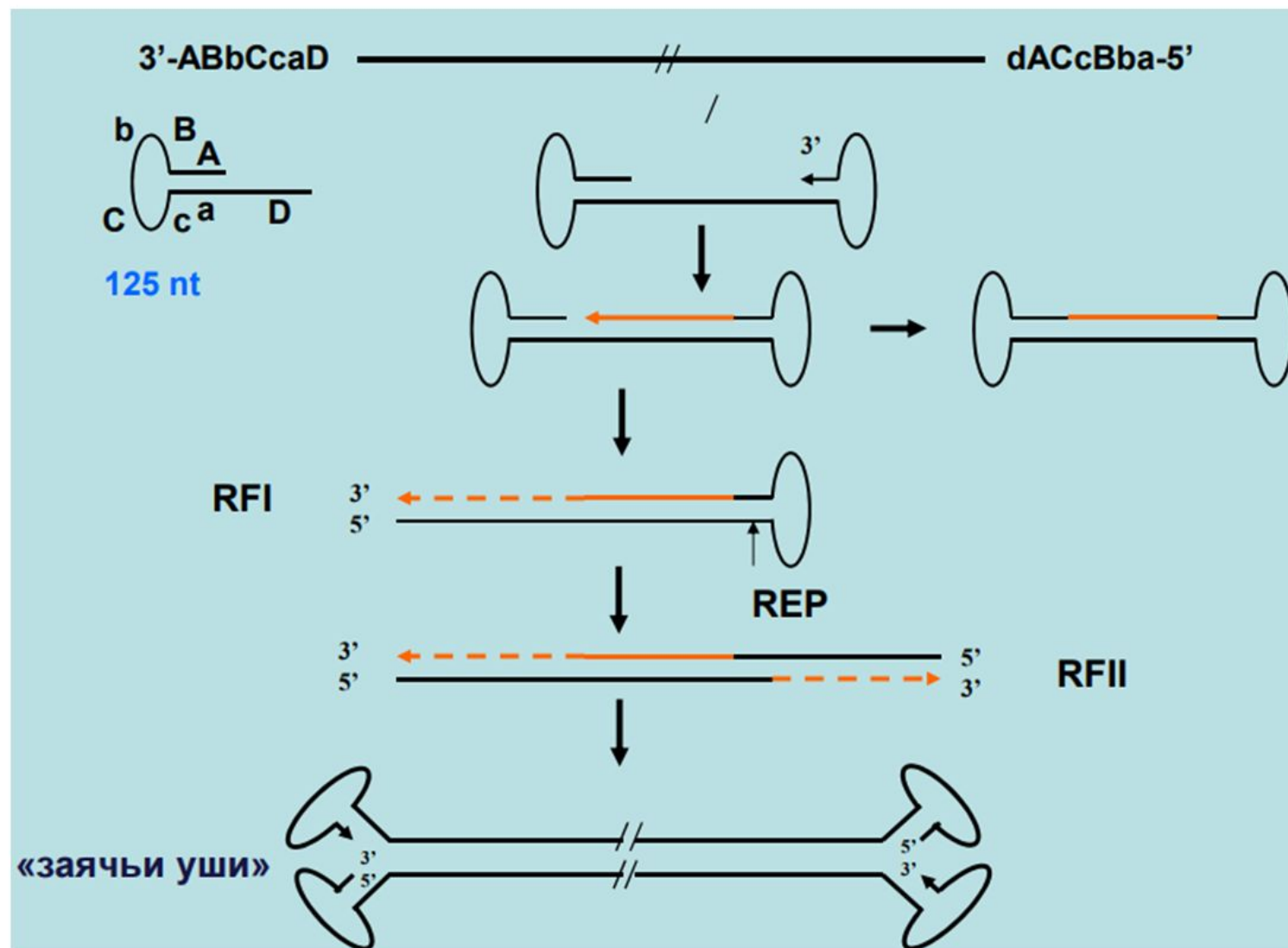
3

РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: парвовирусы

-) линейная оцДНК;
-) ~5000 нт;
-) концевые повторы 100-300 нт.

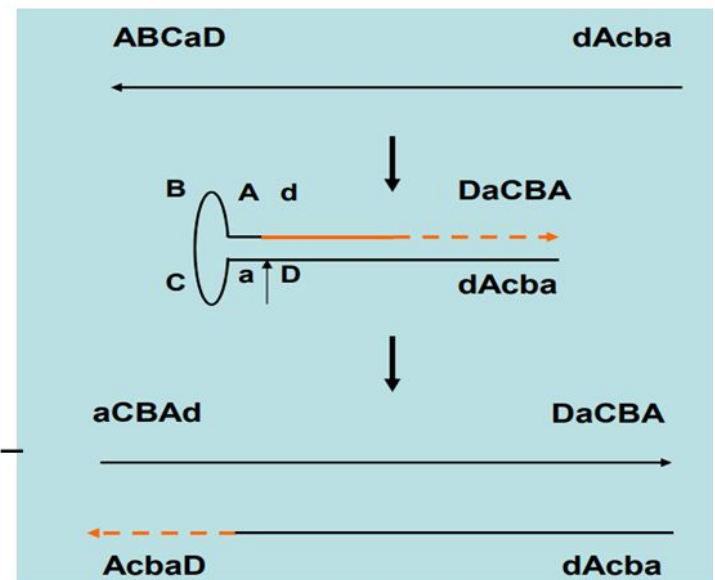


РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: парвовирусы



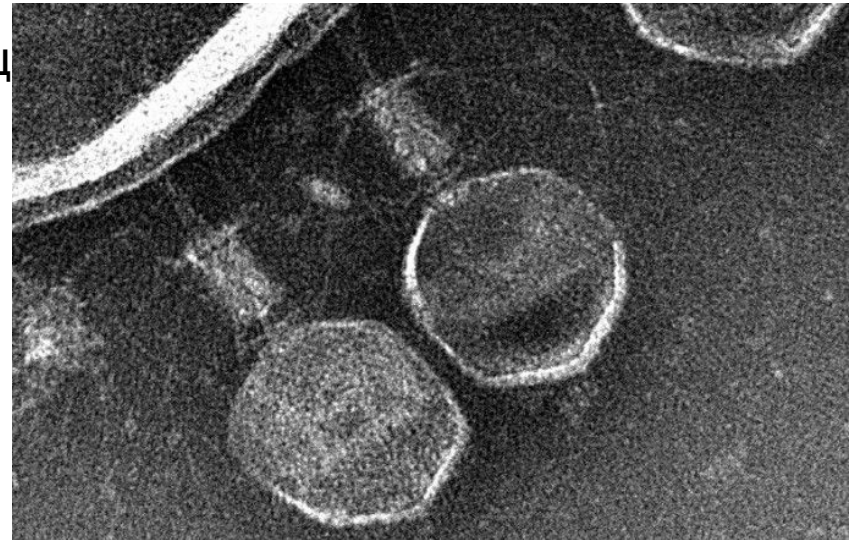
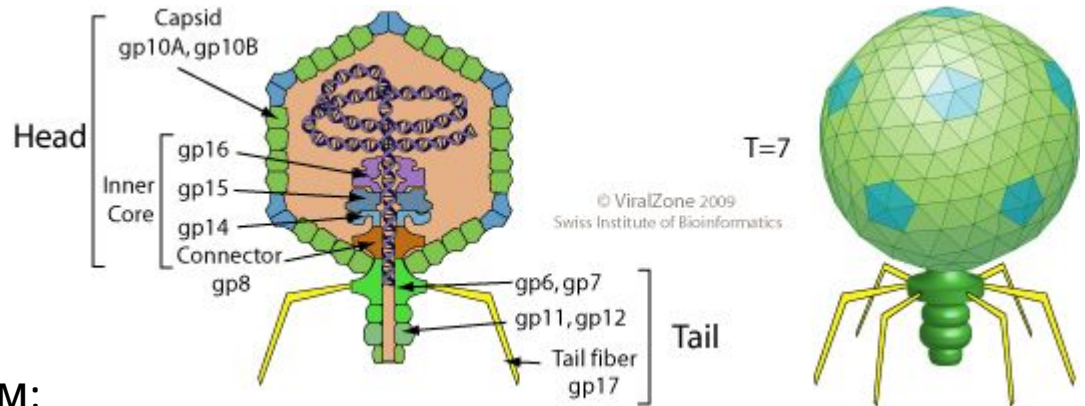
РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: парвовирусы

-) самозатравочный механизм, стартует со стадии элонгации;
-) синтез идет исключительно по лидирующей цепи;
-) часть материнской молекулы входит в состав дочерней молекулы;
-) внутри концевого повтора происходит инверсия нт-последовательности, соответственно, нт-последовательность концевых повторов дочерних материнских молекул различаются, но их структура сохраняется;
-) подобные изменения не затрагивают смысловых нт-последовательностей (кодирующих и регуляторных) и не влияют на репликацию вируса;
-) половина дочерних цепей ДНК в конечных частицах имеет положительную, а другая половина — отрицательную полярность.



РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T7

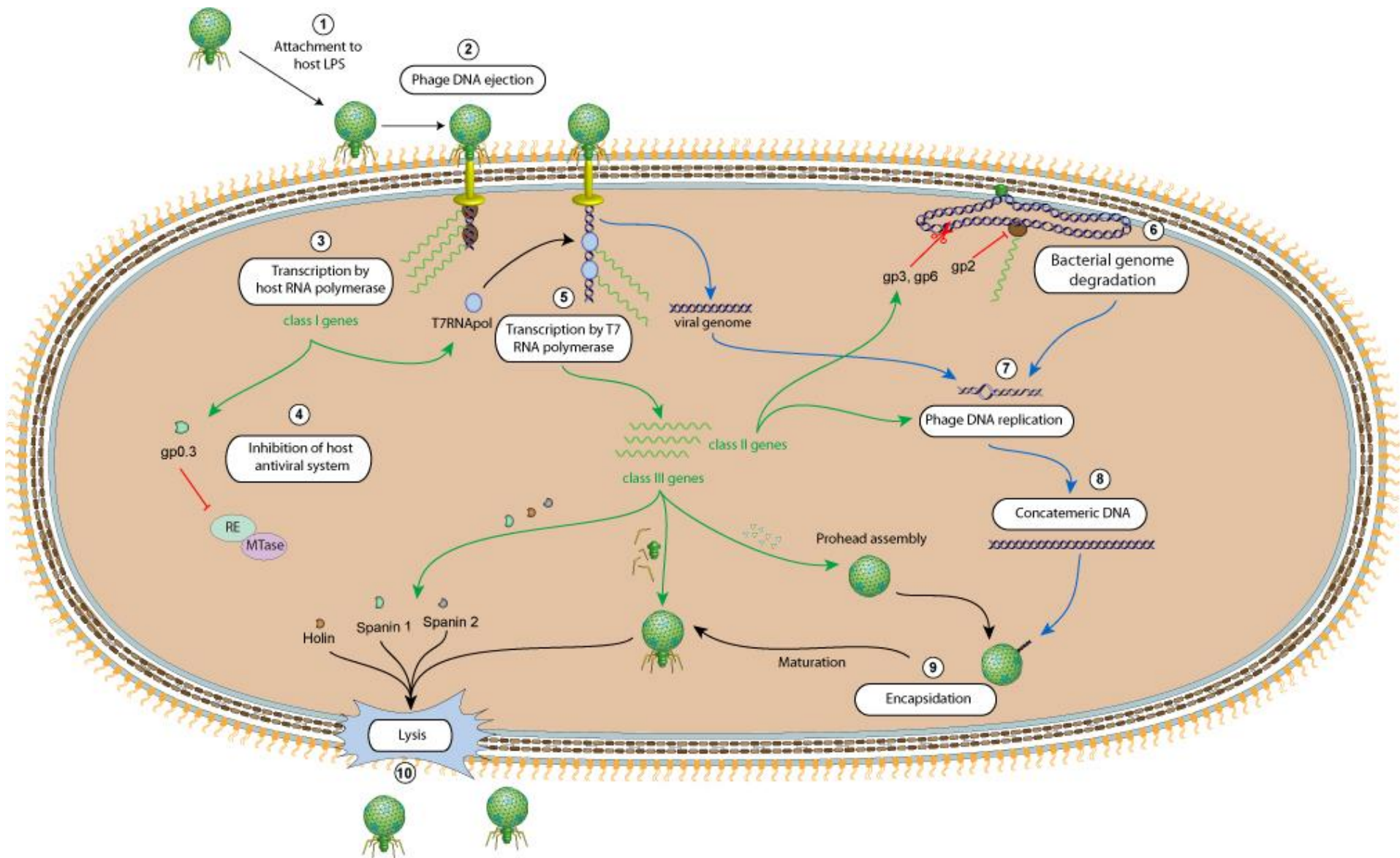
-) линейная дцДНК;
-) ~40 тпн;
-) 55 белков;
-) головка 55 нм, хвост 19*28.5 нм;
-) литический вирус – 100 вирусных частиц
-) 17 мин при 37°C (11-30 мин);
-) скорость размножения 10^{13} / час;
-) наличие концевых повторов – 160 нт.



[Demerec, M., Fano, U. Bacteriophage-Resistant Mutants in Escherichia Coli. Genetics. 1945, 30(2):119–136]

[Dunn, J. J.; Studier, F. W. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. Journal of Molecular Biology. 1983, 166(4): 77–535]

РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T7

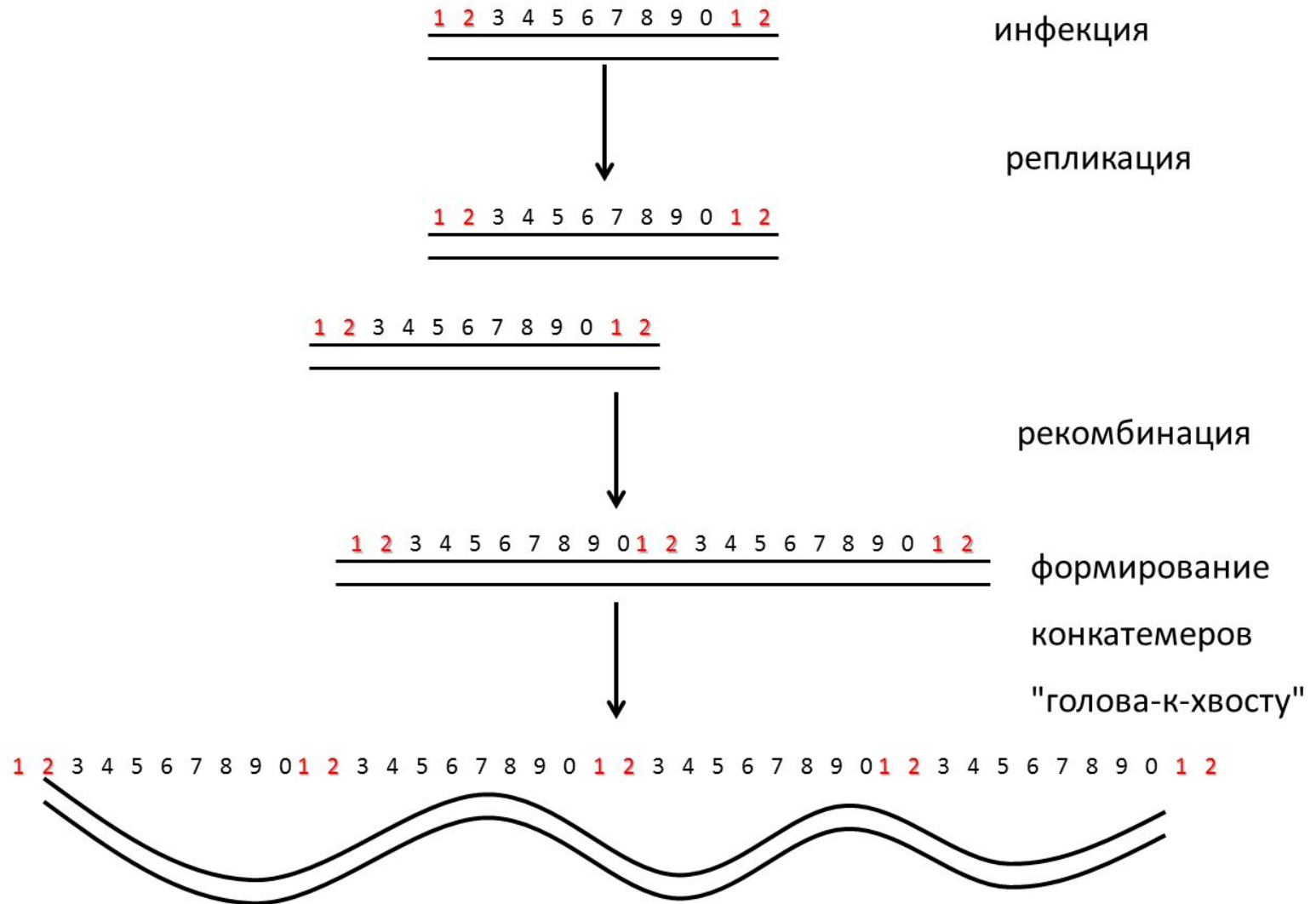


РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T7

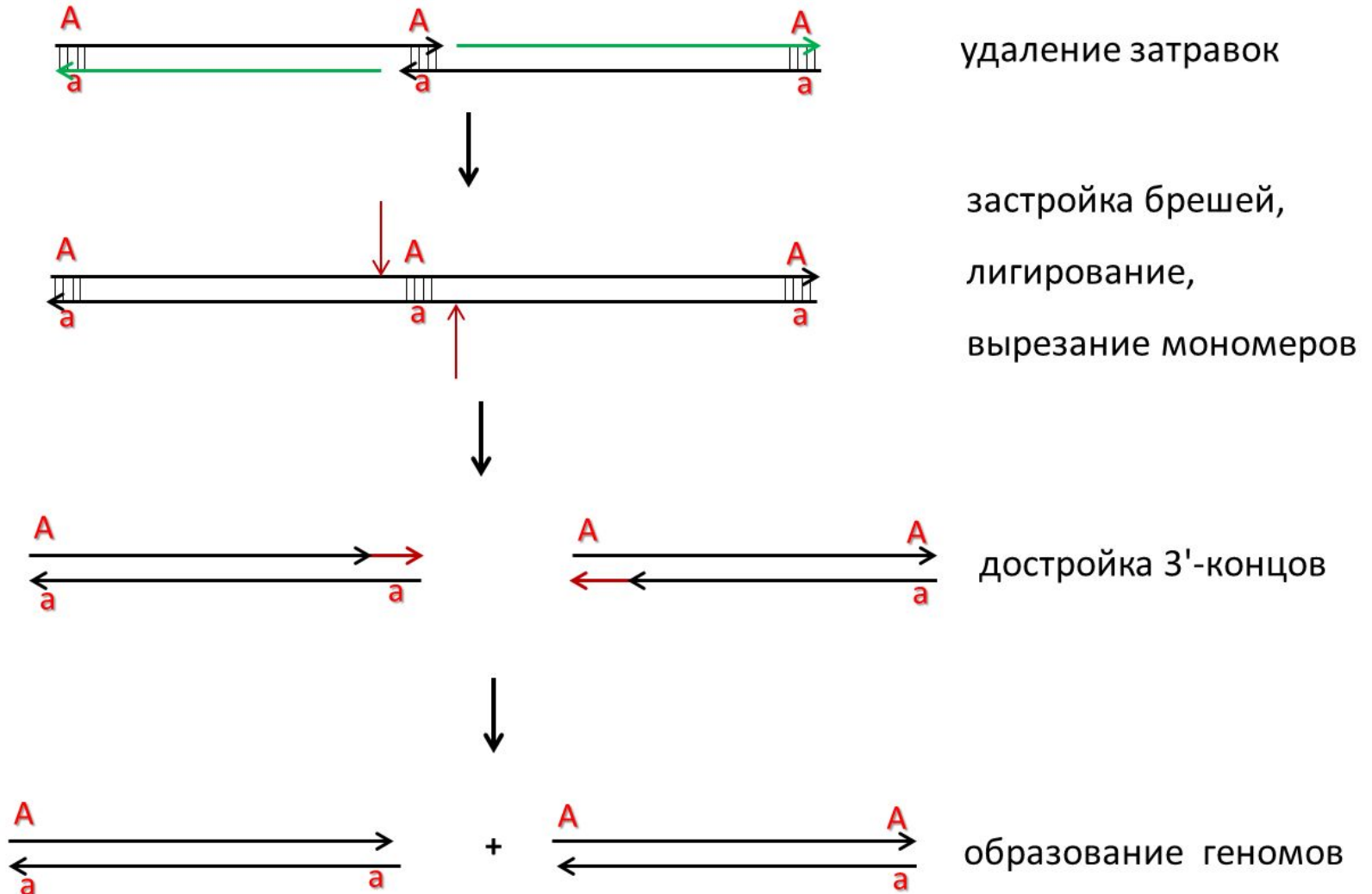


Репликация идет по двум цепям. Обе цепи синтезируются прерывисто.

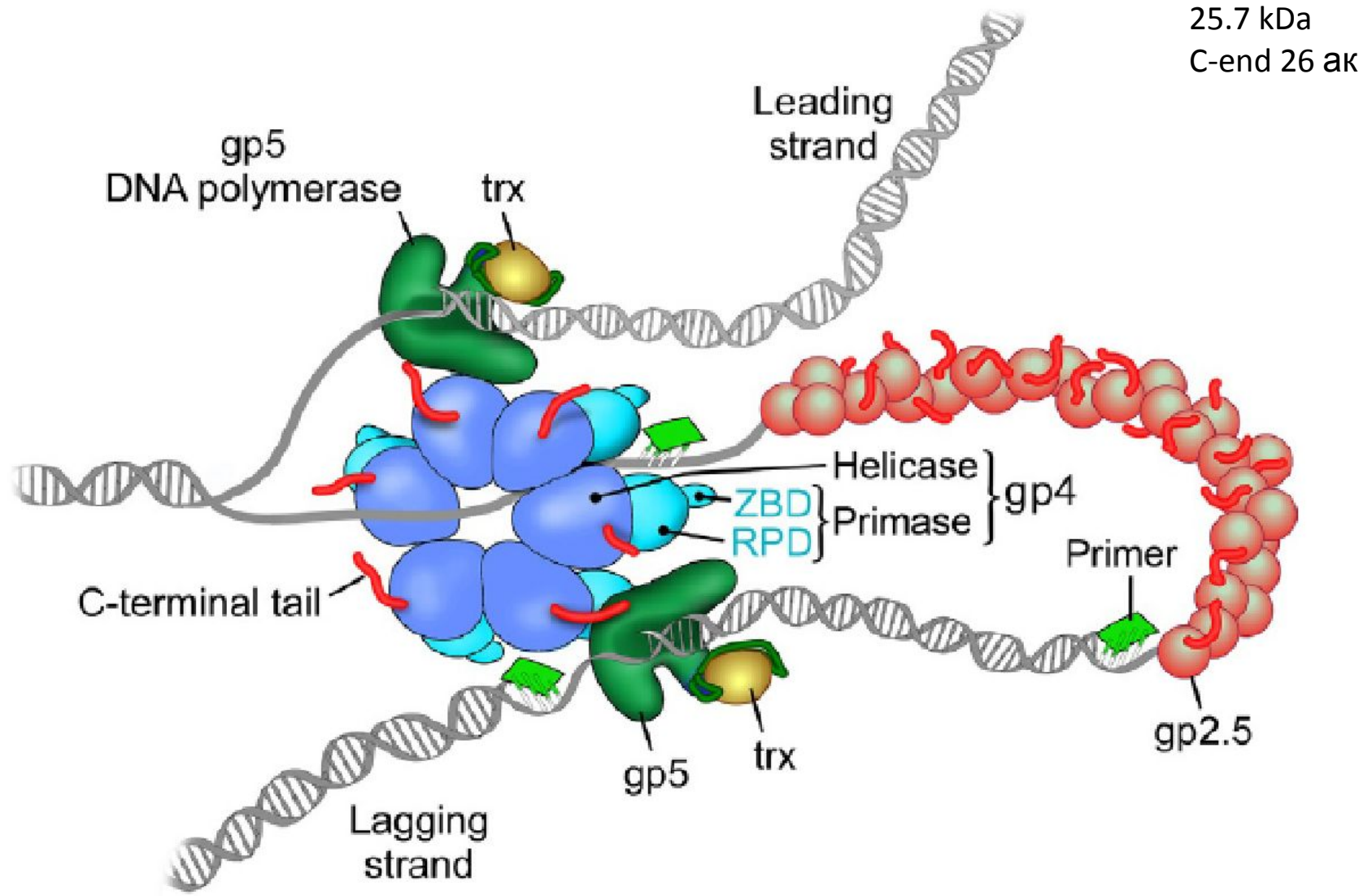
РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T7



РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T7

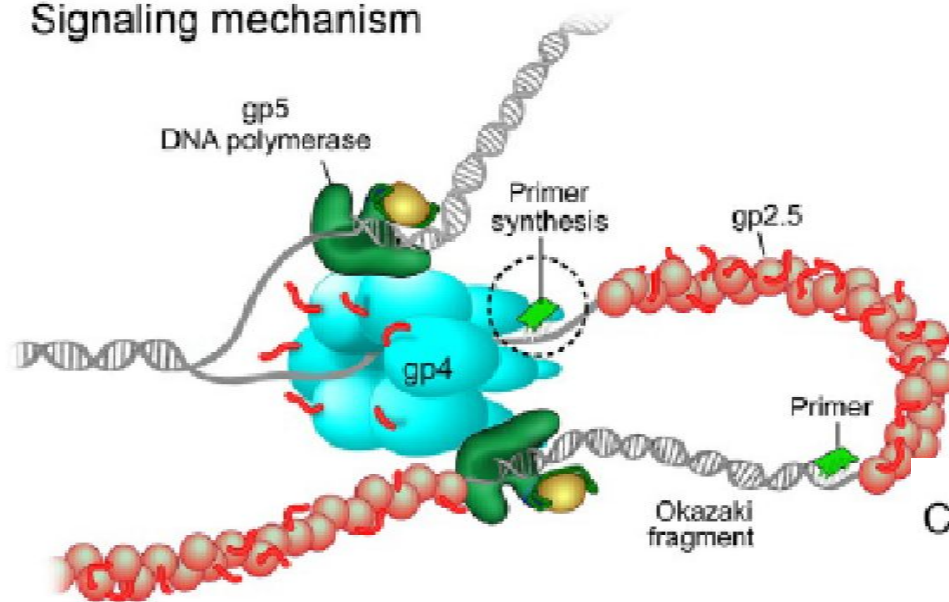


РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: Т7, реплисома

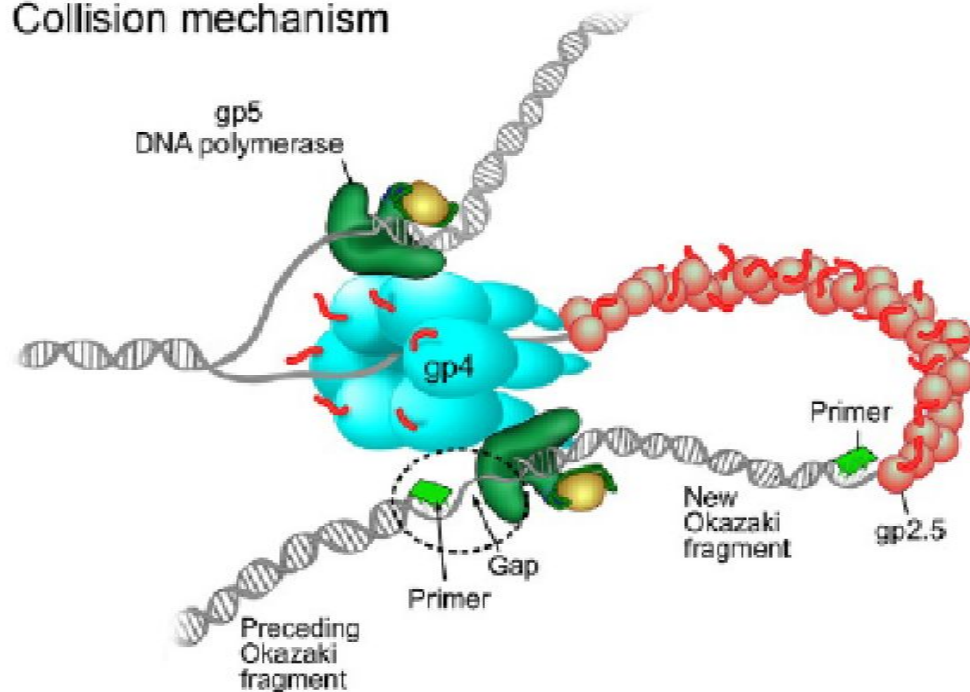


РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: Т7, отстающая цепь

Signaling mechanism



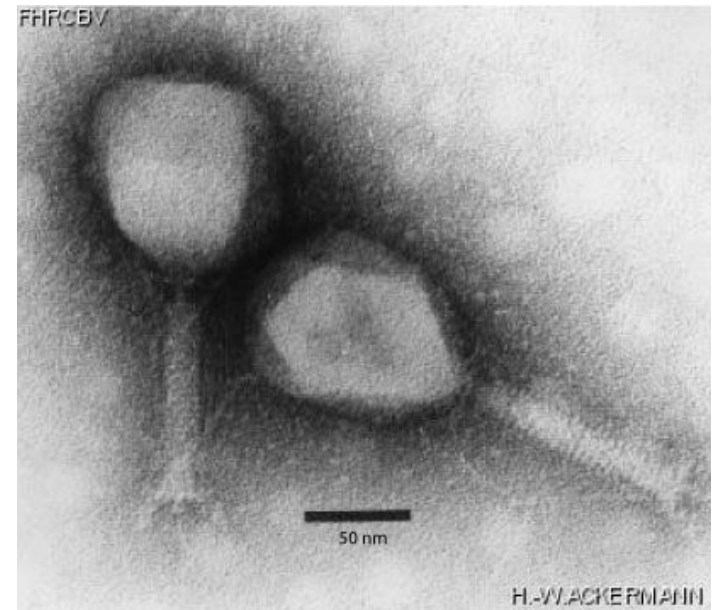
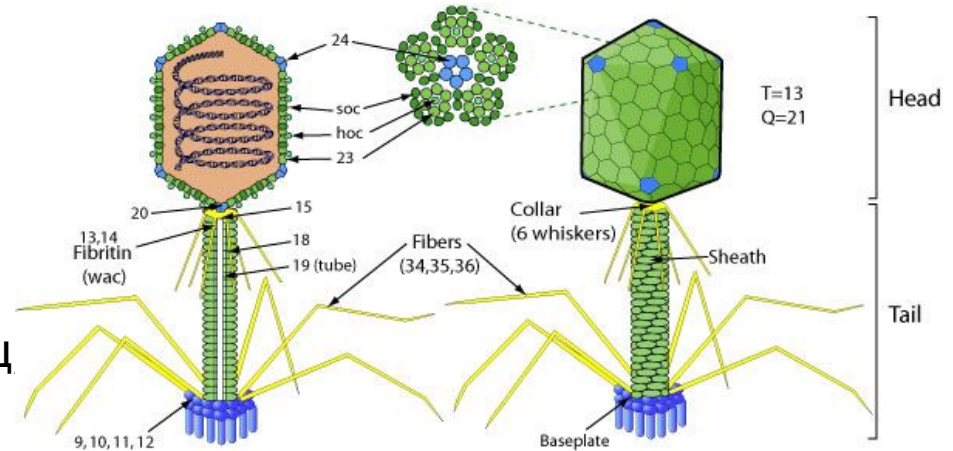
Collision mechanism



РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T4

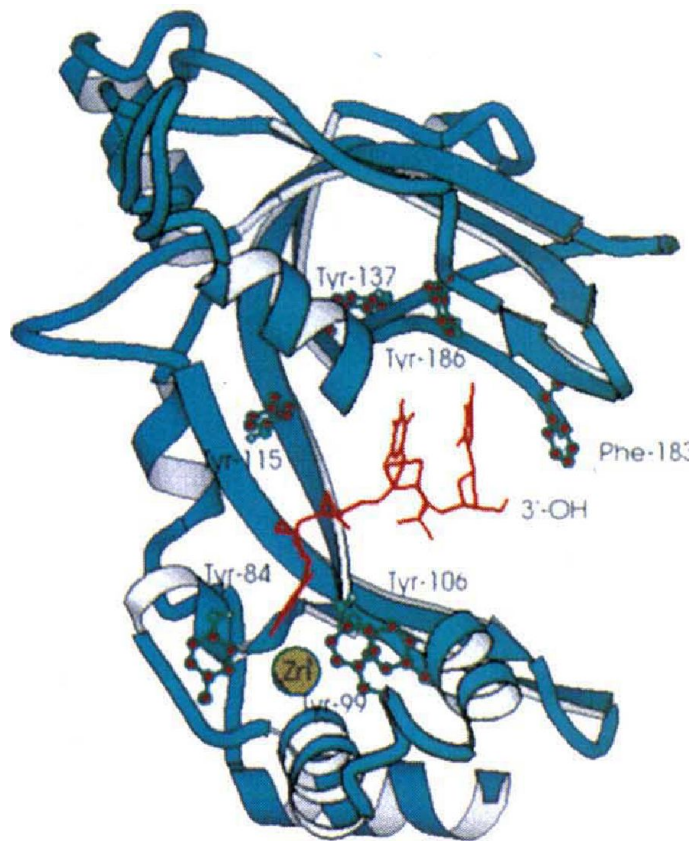
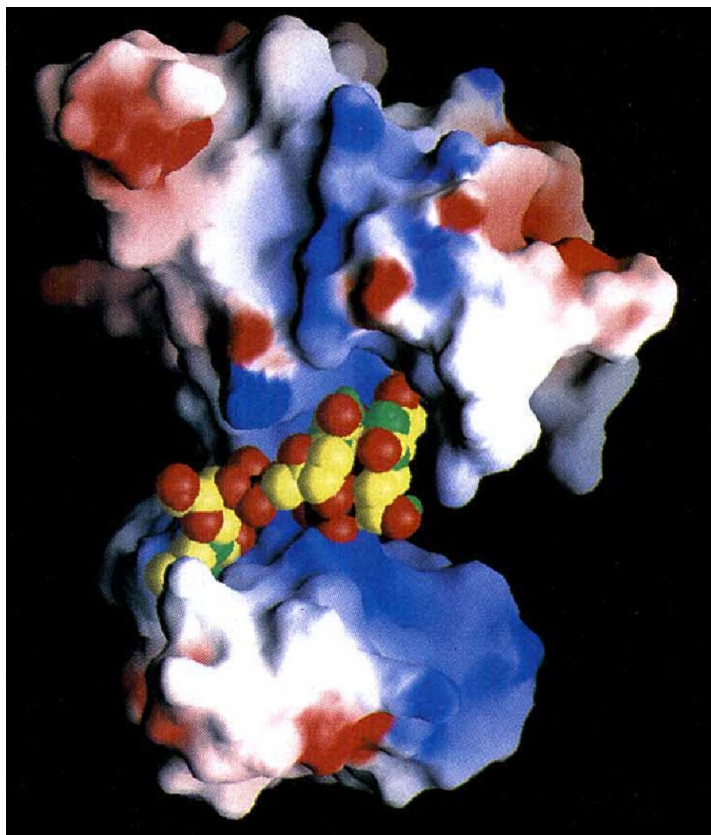
Enterobacteria phage T4

-) линейная дцДНК;
 -) ~170 тпн;
 -) 289 белков;
 -) 90*200 нм;
 -) литический вирус – 100 -150 частиц
 -) 30 мин при 37°C :
- синтез белков к 5мин;
- репликация ("хвост-к-хвосту") к 10 мин;
- сборка новых частиц к 12 мин;
-) наличие концевых повторов.



Брюс Альбертс, конец 1960-х гг. Идентификация гена 1979 г.

РЕПЛИКАЦИЯ ФАГОВ: T4 gp32



301 ак
33.5 kDa

OB-fold, oligonucleotide/oligosaccharide-binding
Zn-finger

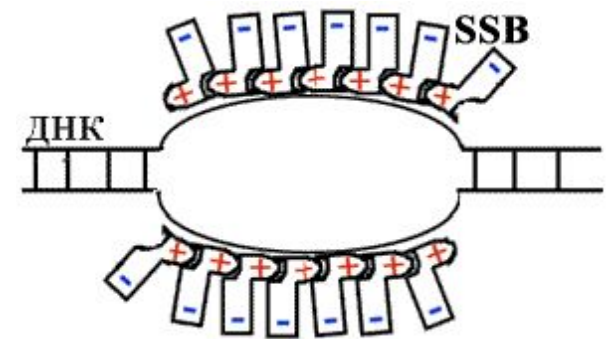
$$K_d (\text{dsDNA}) / K_d (\text{ssDNA}) = 10^4$$

[Shamoo Y., Friedman A.M., Parsons M.R., Konigsberg W.H., Steitz T.A. Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. Nature. 1995. 376, 362-6]

SSB E.coli



178 аа
19 kDa



С-конец (173-178):

б/б

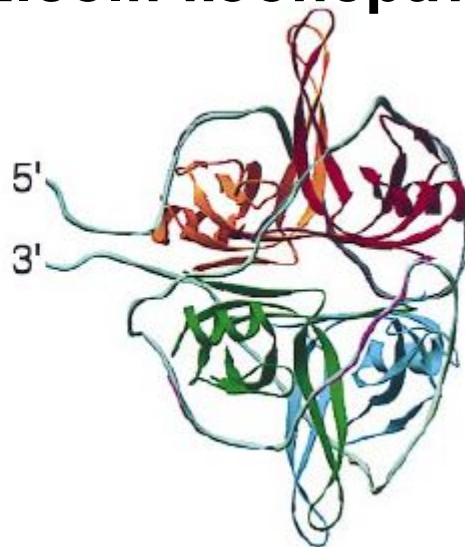
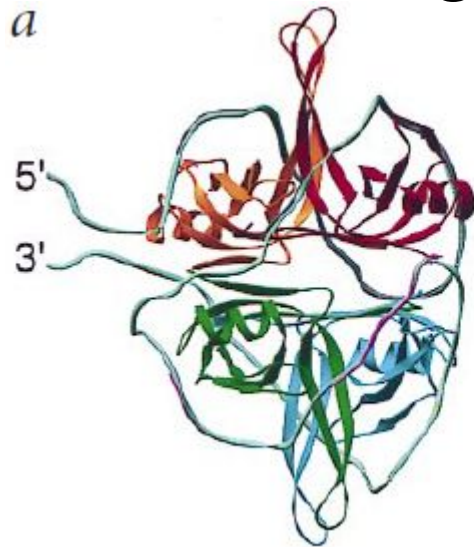
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Pdb 1eqq

[Matsumoto T, Morimoto Y, Shibata N, Kinebuchi T, Shimamoto N, Tsukihara T, Yasuoka N. Roles of functional loops and the C-terminal segment of a single-stranded DNA binding protein elucidated by X-Ray structure analysis. J. Biochem. 2000. 127 329-35]

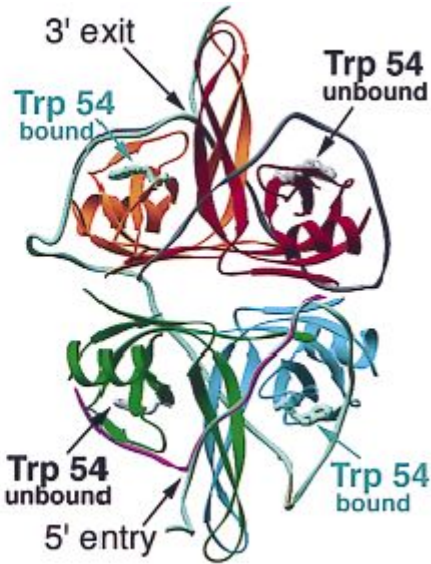
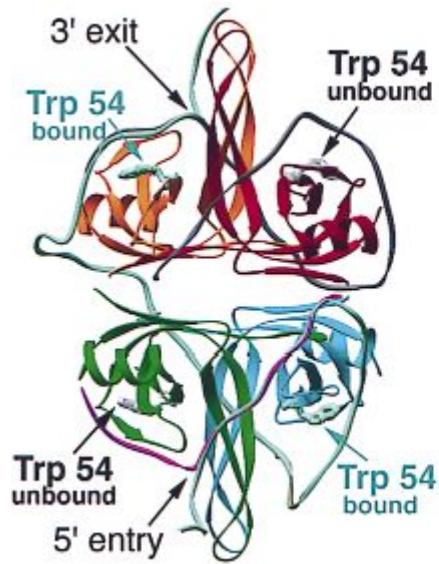
SSB E.coli: кооперативность

a



178 ак
19 kDa

SSB₆₅



SSB₃₅

[Raghunathan S, Kozlov AG, Lohman TM, Waksman G. Structure of the DNA binding domain of E. coli SSB bound to ssDNA. Nat Struct Biol. 2000. 7(8):648-52]

ГЕЛИКАЗЫ



1976 - Открытие и выделение ДНК-геликазы *E.Coli* [Abdel-Monem M, Dürwald H, Hoffmann-Berling H. Enzymic unwinding of DNA. 2. Chain separation by an ATP-dependent DNA unwinding enzyme. Eur. J. Biochem. 1976. 65 (2):441–9].

1978 г. - Открытие первых эукариотических ДНК-геликаз ДНК, выделенных из лилий.

1982 – Белок 41 гена Т4 - первой ДНК-геликаза бактериофага.

1985 - Первые ДНК-геликазы млекопитающих, выделенные из тимуса теленка.

1986 - Большой опухолевый антиген SV40 - первая вирусная ДНК-геликаза.

1986 - ATPaseIII, дрожжевой белок.

1990 - Выделение человеческой ДНК-геликазы ДНК [Tuteja N, Tuteja R, Rahman K, Kang LY, Falaschi Аю А DNA helicase from human cells. Nucleic Acids Res. 1990. 18 (23):6785–92].

1992 г. - Выделение митохондриальной ДНК-геликазы (из головного мозга КРС).

2002 г. - Изоляция и характеристика первой биохимически активной малярийной паразитной ДНК-геликазы *Plasmodium cynomolgi*.

ГЕЛИКАЗЫ



E. coli - 14 ферментов

Бактериофаги – 6

Вирусы - 12,

Дрожжи – 15

Растения – 8

Клетки тимуса теленка - выделено 11

Клетки человека выделено 25

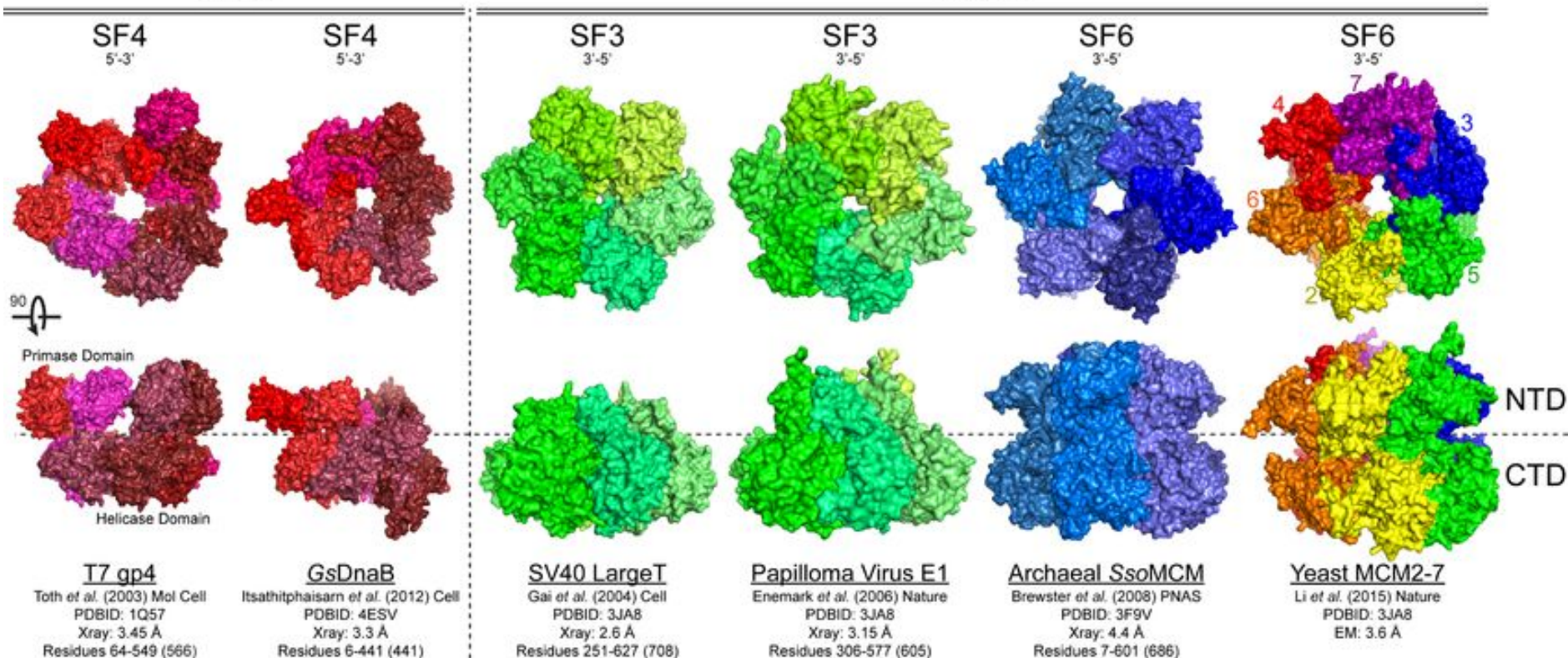
Около 1% генов эукариот кодируют геликазы

Геном человека кодирует 95 не-избыточных геликаз:

64 РНК-геликазы и 31 ДНК-геликазу

RecA

AAA+

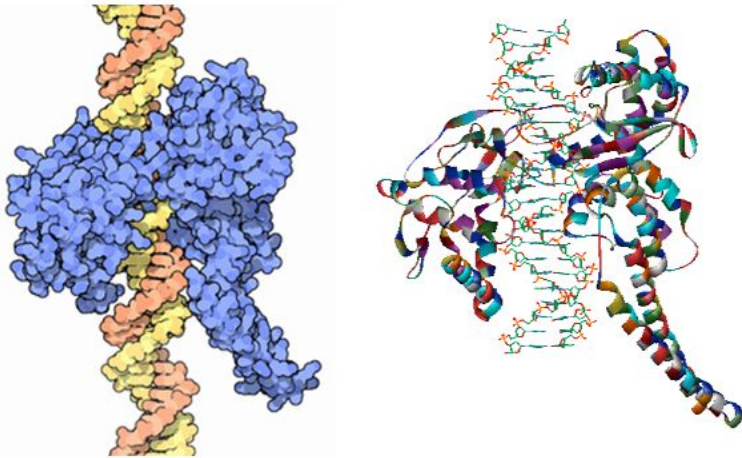


[PARKERS IMA. Structural mechanisms of hexameric helicase loading, assembly, and unwinding. F1000RES.

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I topo I

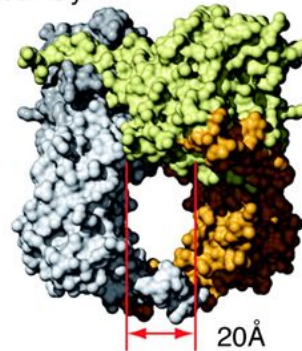
одноцепочечные разрывы в дуплекс ДНК
без затрат энергии



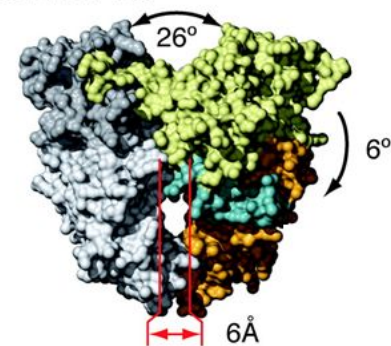
ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II topo II

двухцепочечные разрывы в дуплекс ДНК
с гидролизом АТФ

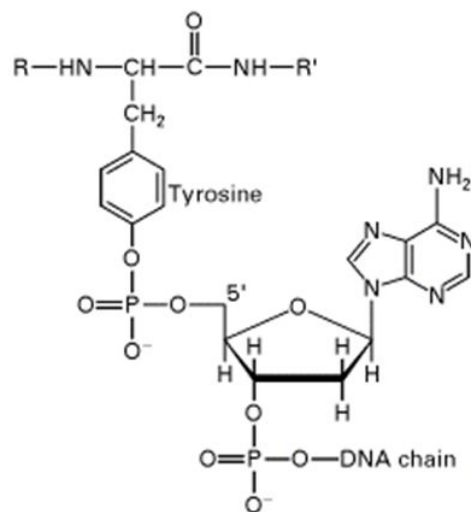
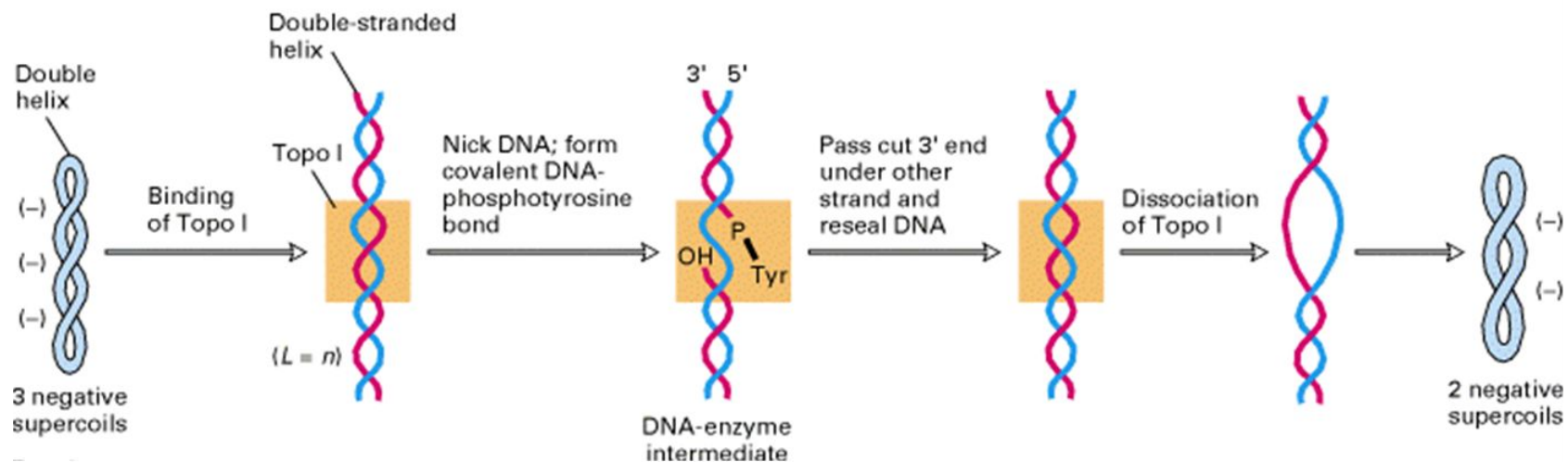
E.coli GyrB



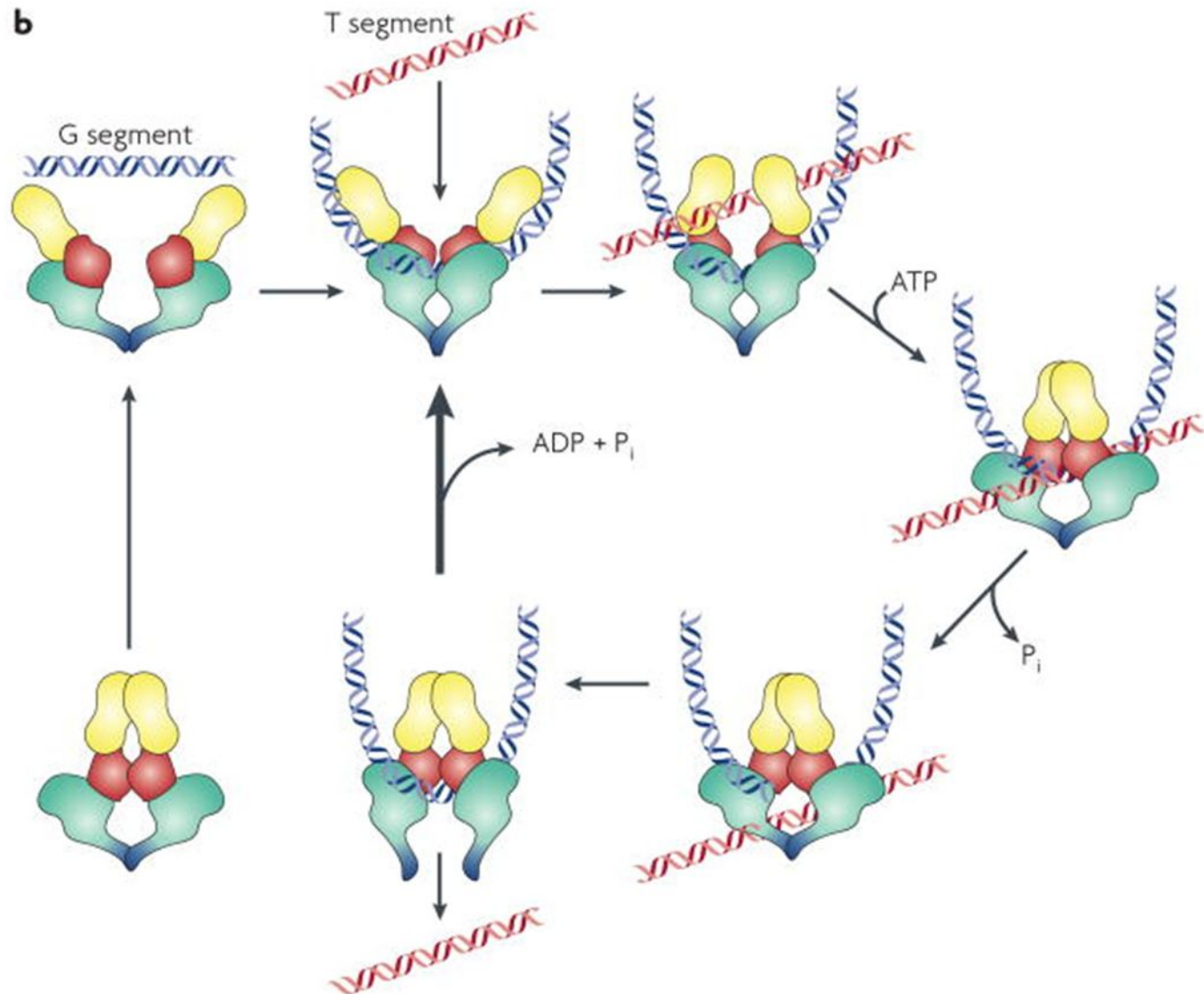
ScT2-ATPase



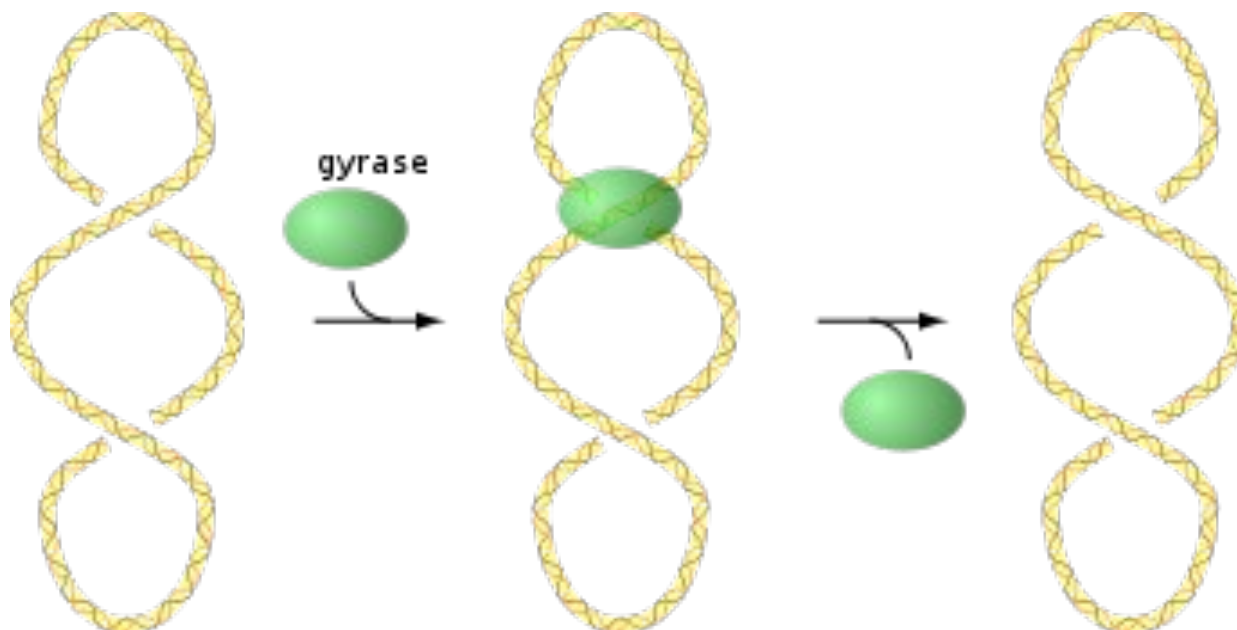
ТОПОИЗОМЕРАЗЫ: topo I



ТОПОИЗОМЕРАЗЫ: topo II



ТОПОИЗОМЕРАЗЫ: гираза *E.coli*



21 нт 5'-RNNNRNNRTGRYCTYNNGNY-3'

R – пурины, Y – пиримидины, N - любой

45-50 сайтов → 10000 сайтов

100 супервитков/мин

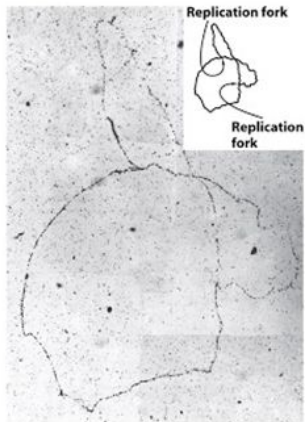
[Scott Classen, Stephane Olland, and James M. Berger Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. 2003. PNAS. 100:10629-10634]

ТОПОИЗОМЕРАЗЫ

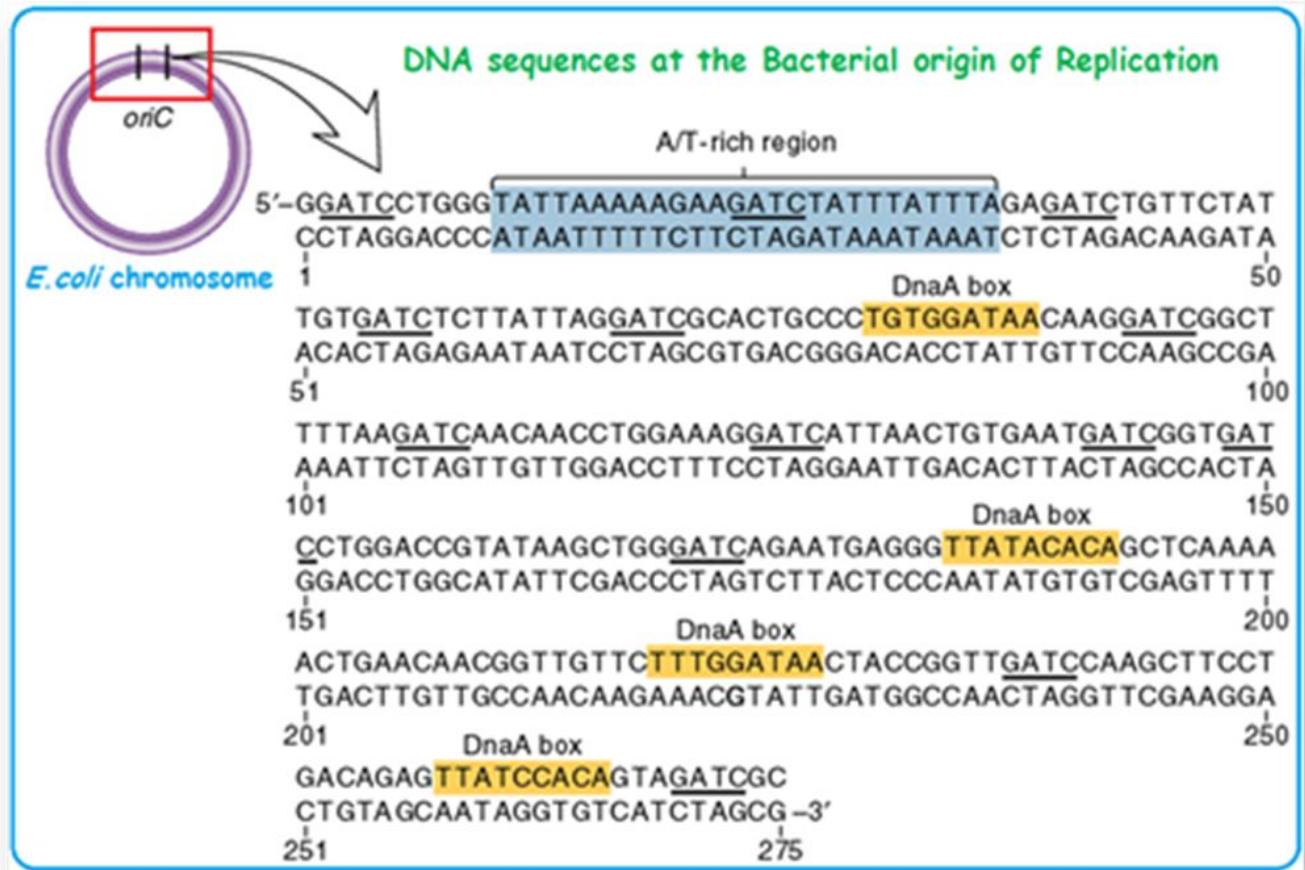
Топоизомеразы	IA	IB	IIA	IIB
Необходимость в ионах металлов	Да	Нет	Да	Да
Зависимость от АТФ, кол-во мол	Нет	Нет	Да 2	Да 2
Разрыв	оц	оц	дц	дц
Конец прикрепления	5'	3'	5'	5'
Изменение числа супервитков	± 1	± 1	± 2	± 2

РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: инициация

OriC - origin of chromosomal replication



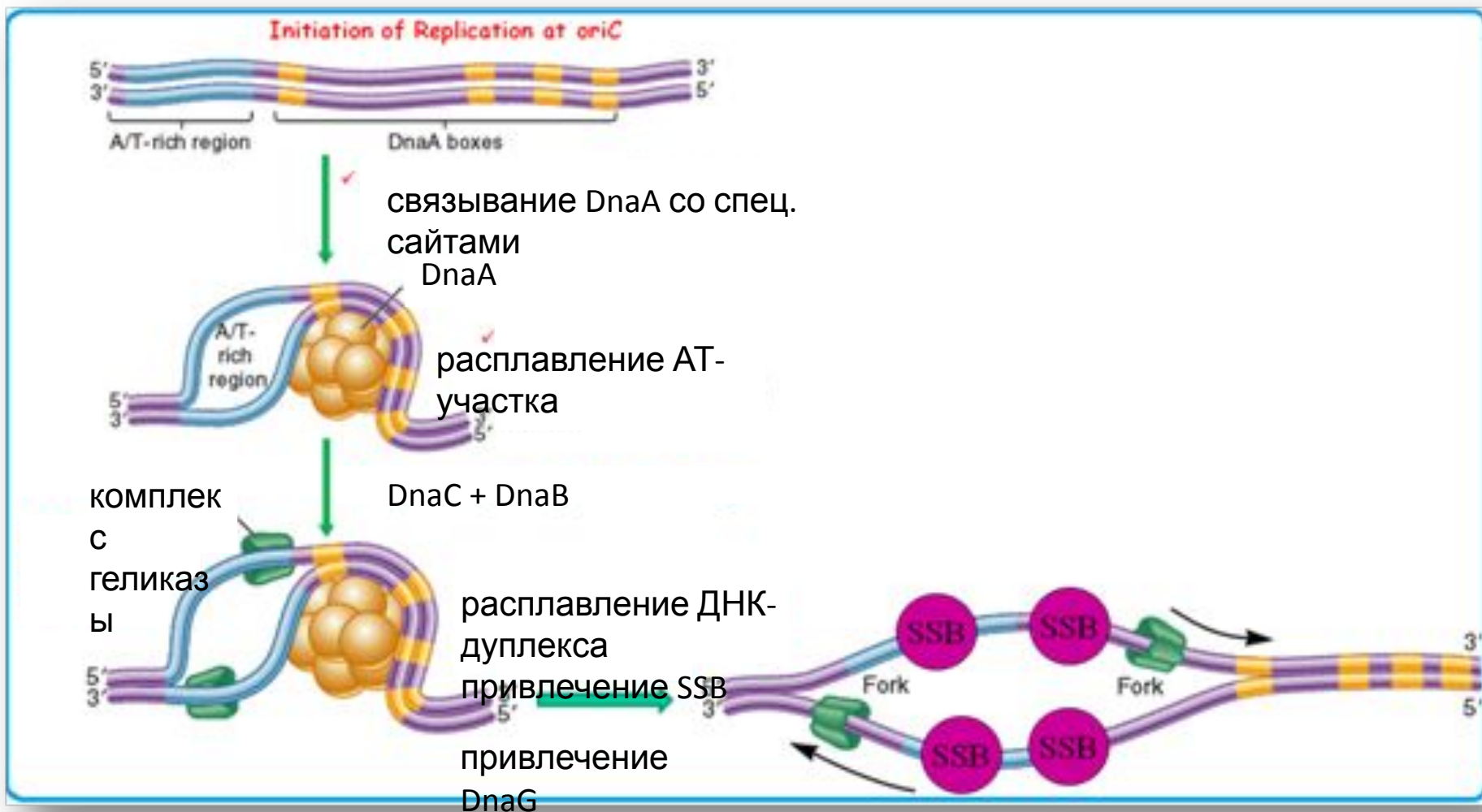
[из Карла Зиммера]



DnaA: 467 аа, 52.5 kDa

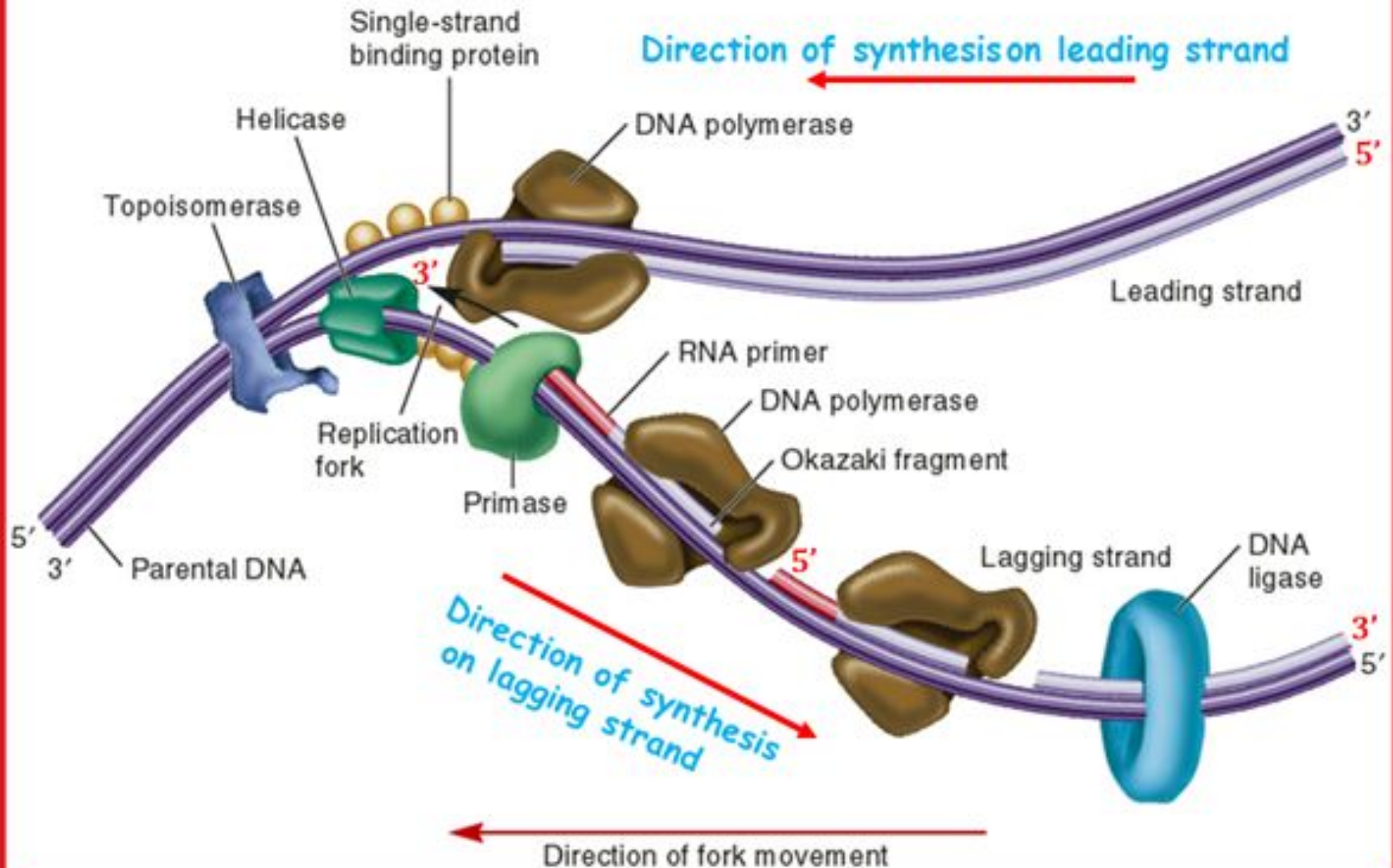
R1, R2, R4: 5'-TTAT(C/A)CACA-3', АТР-зависимое связывание

РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: инициация

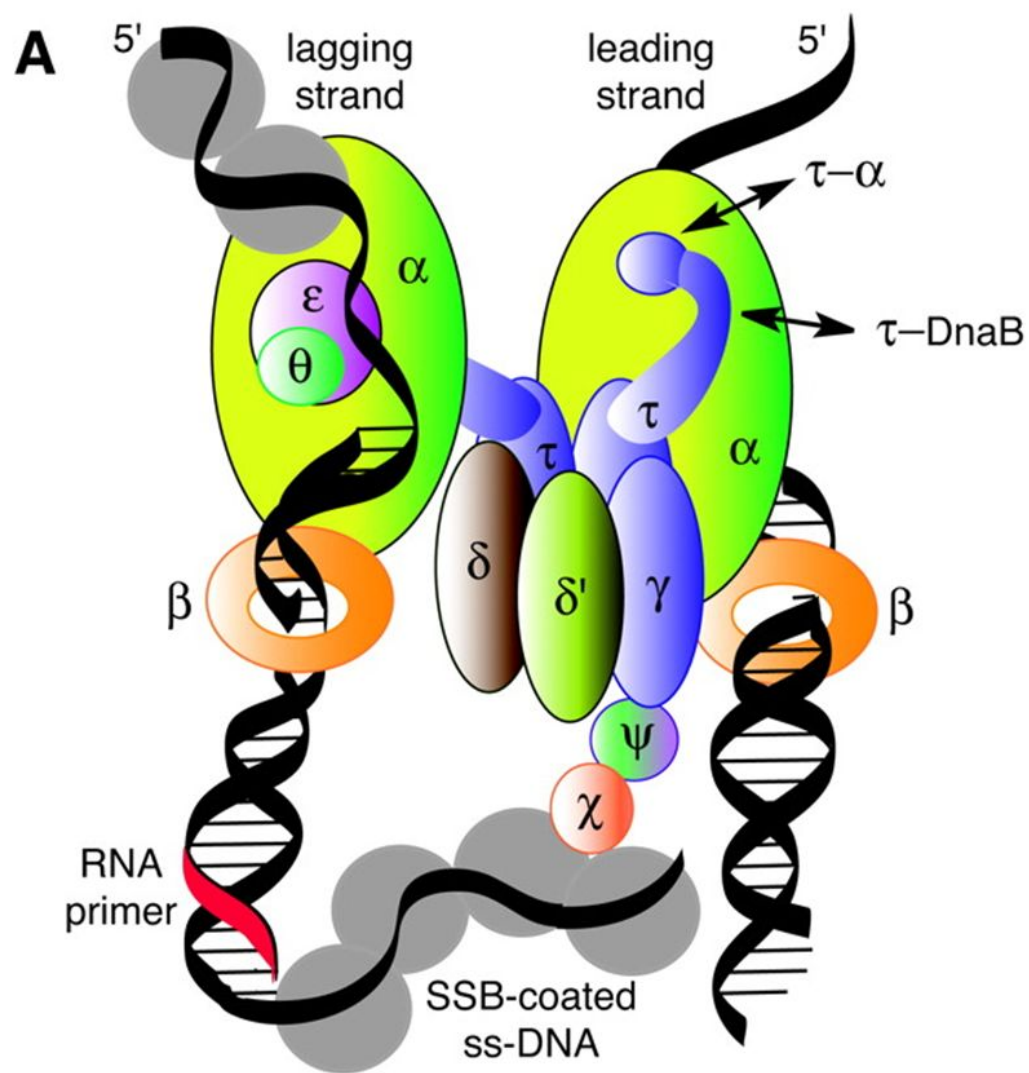


РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: элонгация

Two dimensional view of a replication fork



РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: элонгация



DnaA

SSB

DnaC – loader

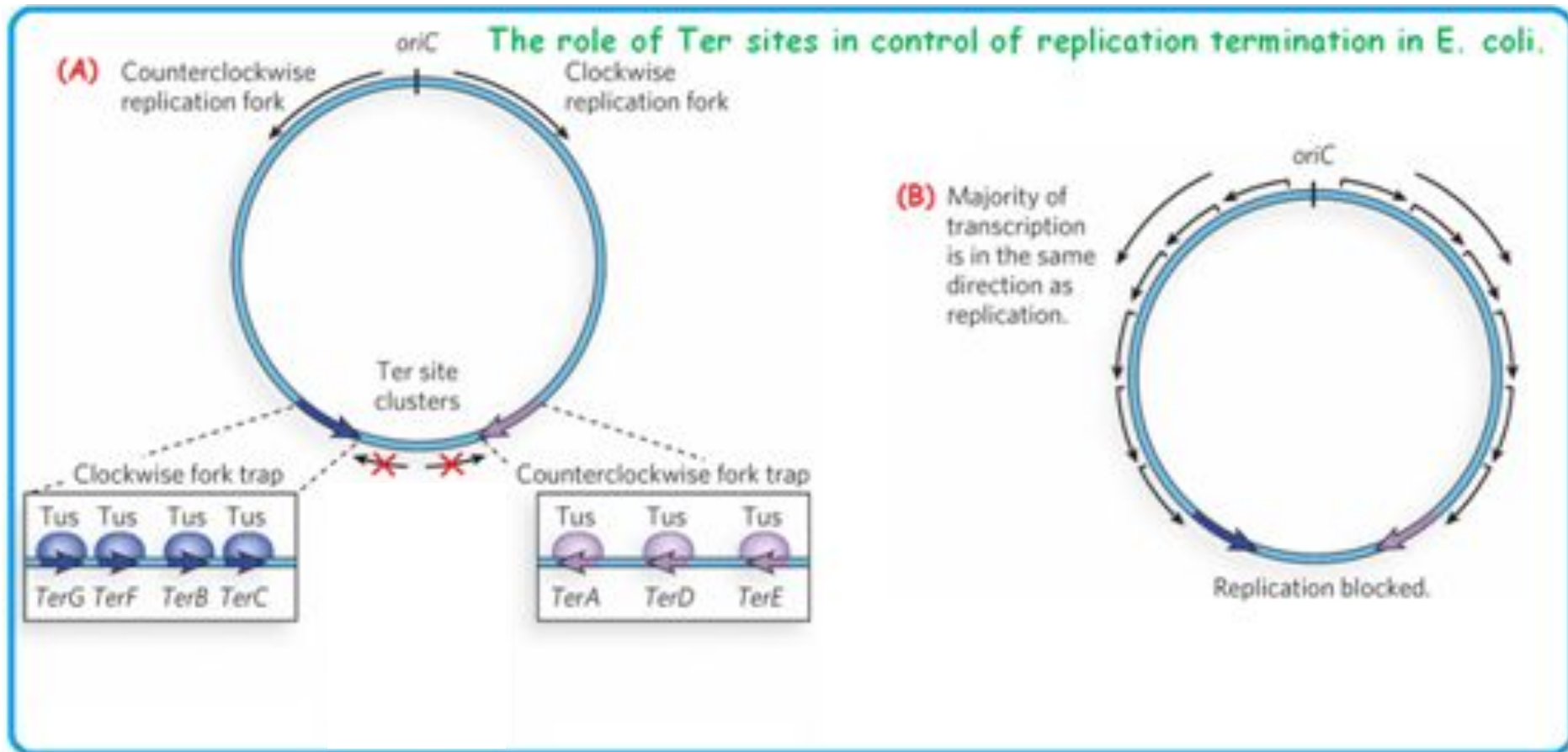
DnaB – helicase

DnaG – primase

PriA,B – priming

holo pol III

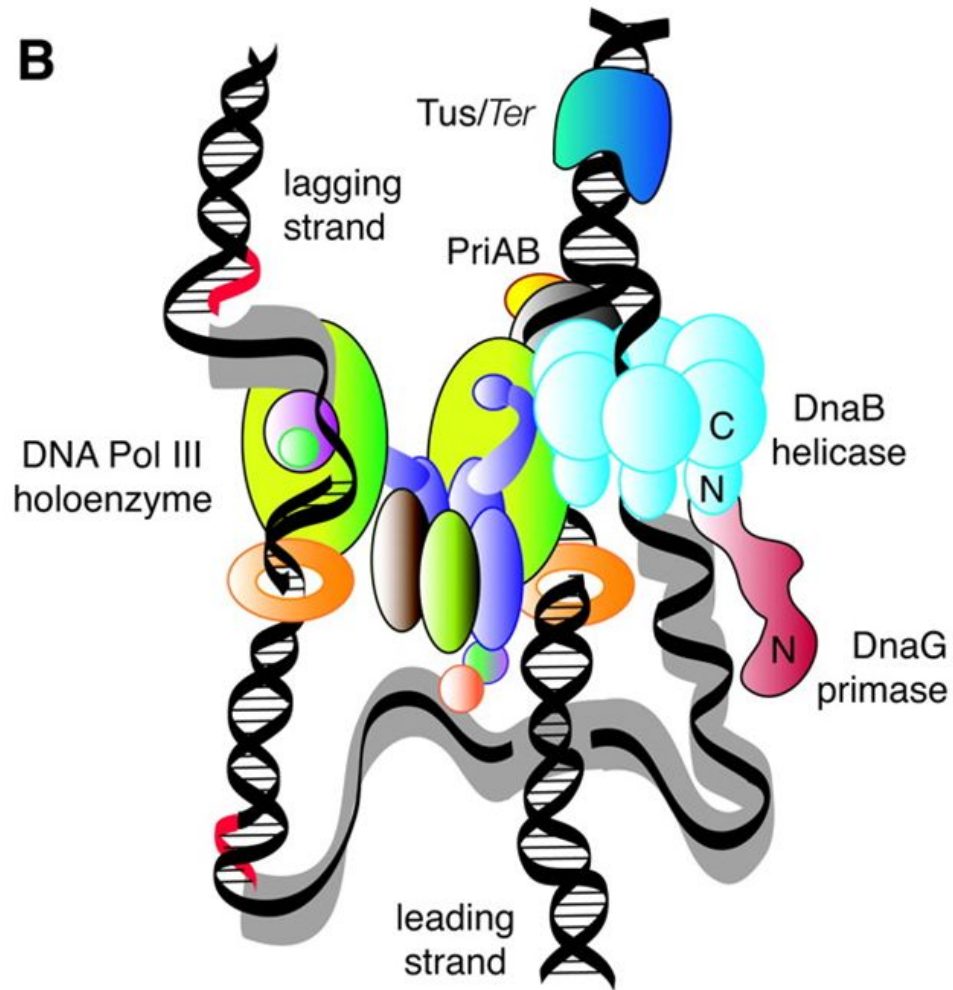
РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: термизация



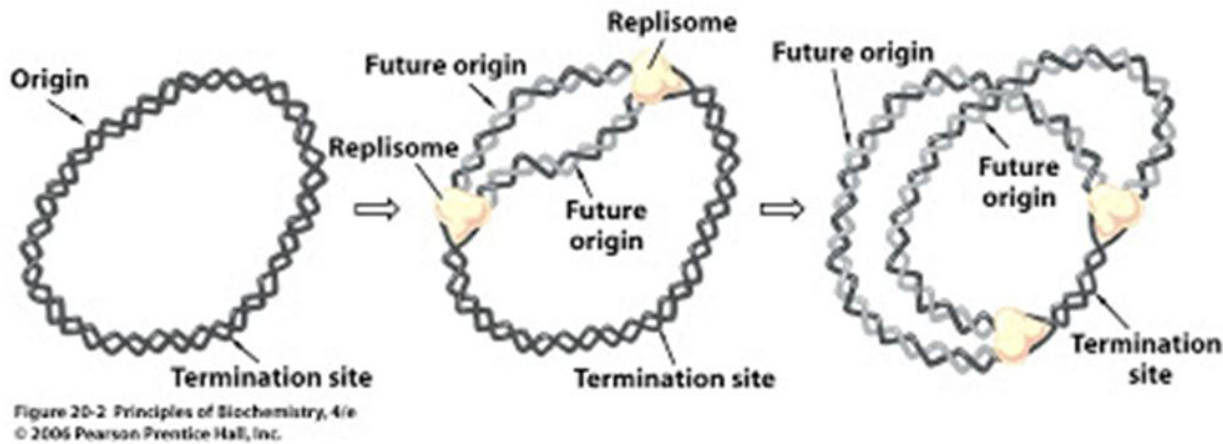
10 Ter-сайтов, 23 пн, TerA, ..., TerJ

Tus - terminus utalization substance

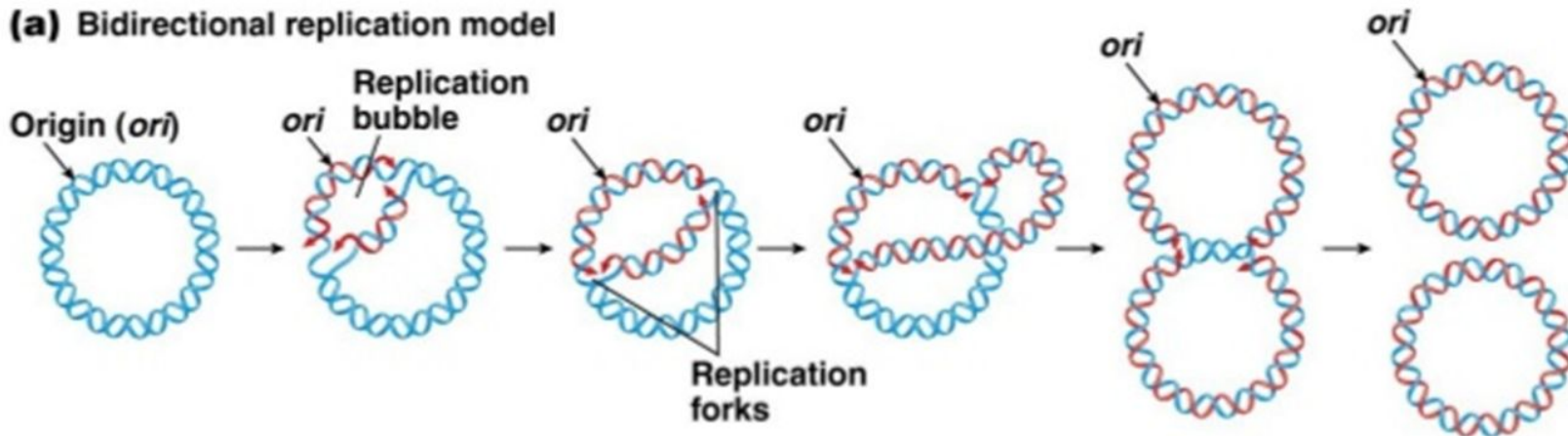
РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: терминиация



РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: термициация



(a) Bidirectional replication model



[W Seufert and W Messer. Start sites for bidirectional in vitro DNA replication inside the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. EMBO J. 1987. (8): 2469–2472]

РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: регуляция

DnaA

RIDA,
Regulatory Inactivation of DnaA

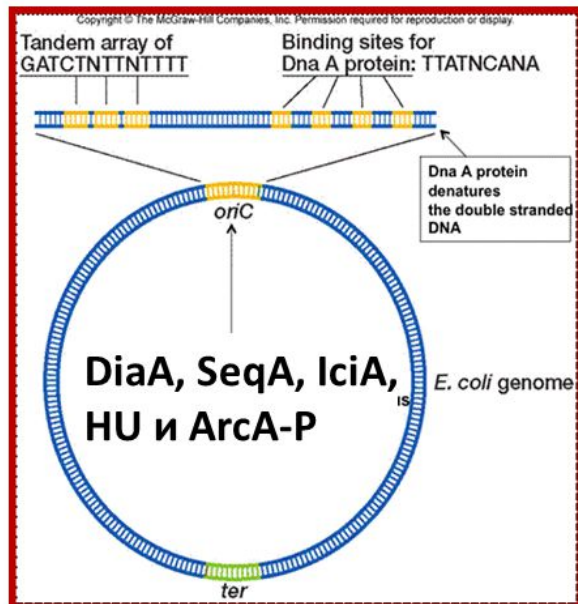


DARS,
DnaA Reactivating Sequence

DDAH, *datA*-dependent DnaA-hydrolysis

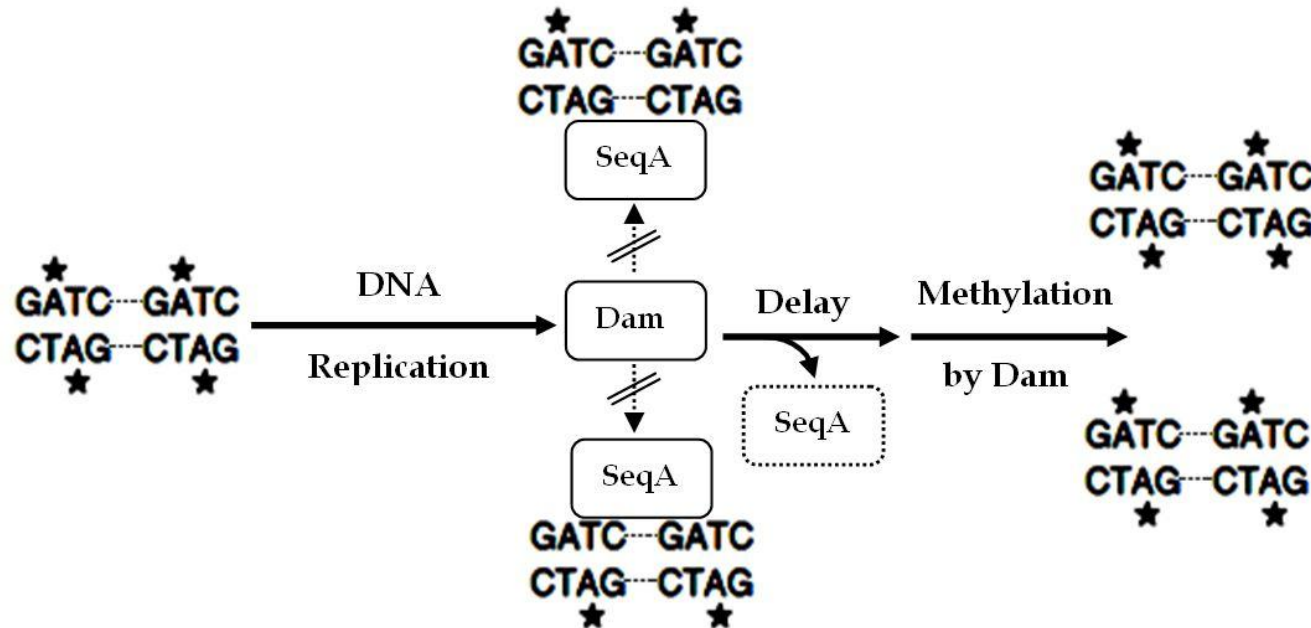
ингибирование экспрессия *dnaA* SeqA

контроль через метилирование



РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: регуляция

11
сайтов
6N-A



Fully methylated

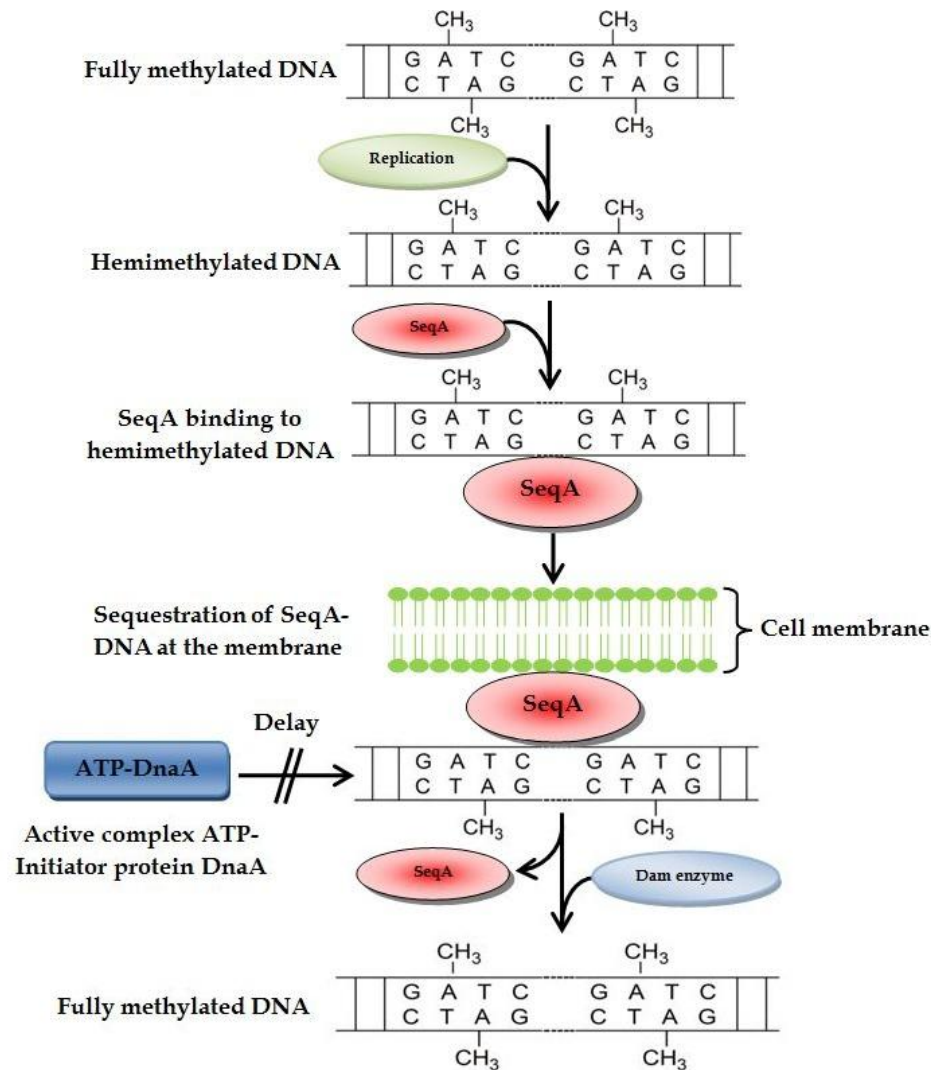
Hemimethylated

Fully remethylated

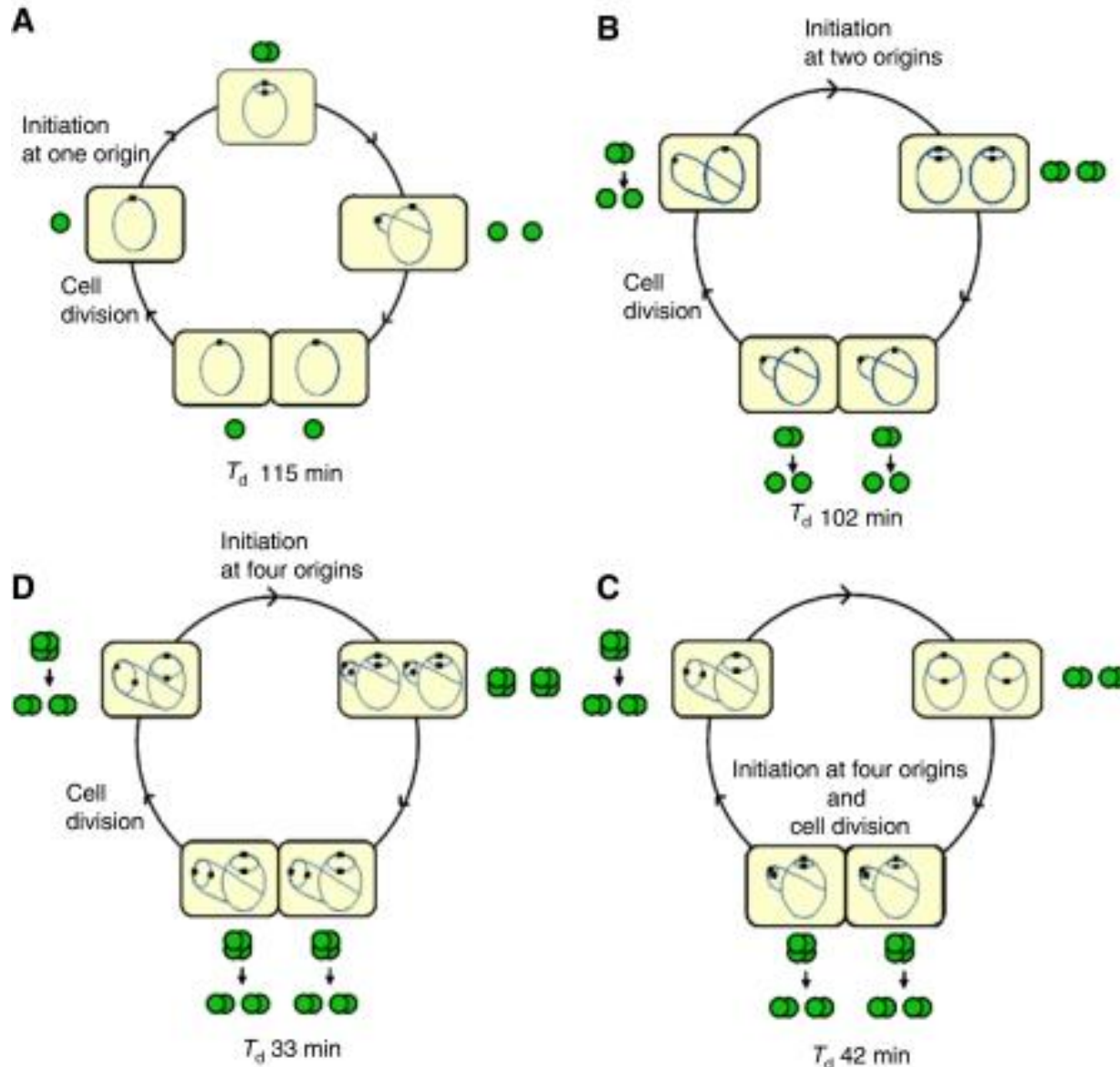
[Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "The Mechanisms of DNA Replication", book edited by David Stuart, ISBN 978-953-51-0991-4, Published: February 20, 2013 under CC BY 3.0 license. © The Author(s).

Chapter 12. Roles of Methylation and Sequestration in the Mechanisms of DNA Replication in some Members of the Enterobacteriaceae Family. Amine Aloui, Alya El May, Saloua Kouass Sahbani and Ahmed Landoulsi]

РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: регуляция



РЕПЛИКАЦИЯ *E.coli*: регуляция



[Solveig Fossum, Elliott Crooke, and Kirsten Skarstad. Organization of sister origins and replisomes during multifork DNA replication in *Escherichia coli* EMBO J. 2007. 26(21): 4514–4522]