

DNA Replikation 3

Replikationsinitiation bei Pro- und Eukaryoten

Regulation der Replikation auf der Ebene der Initiation

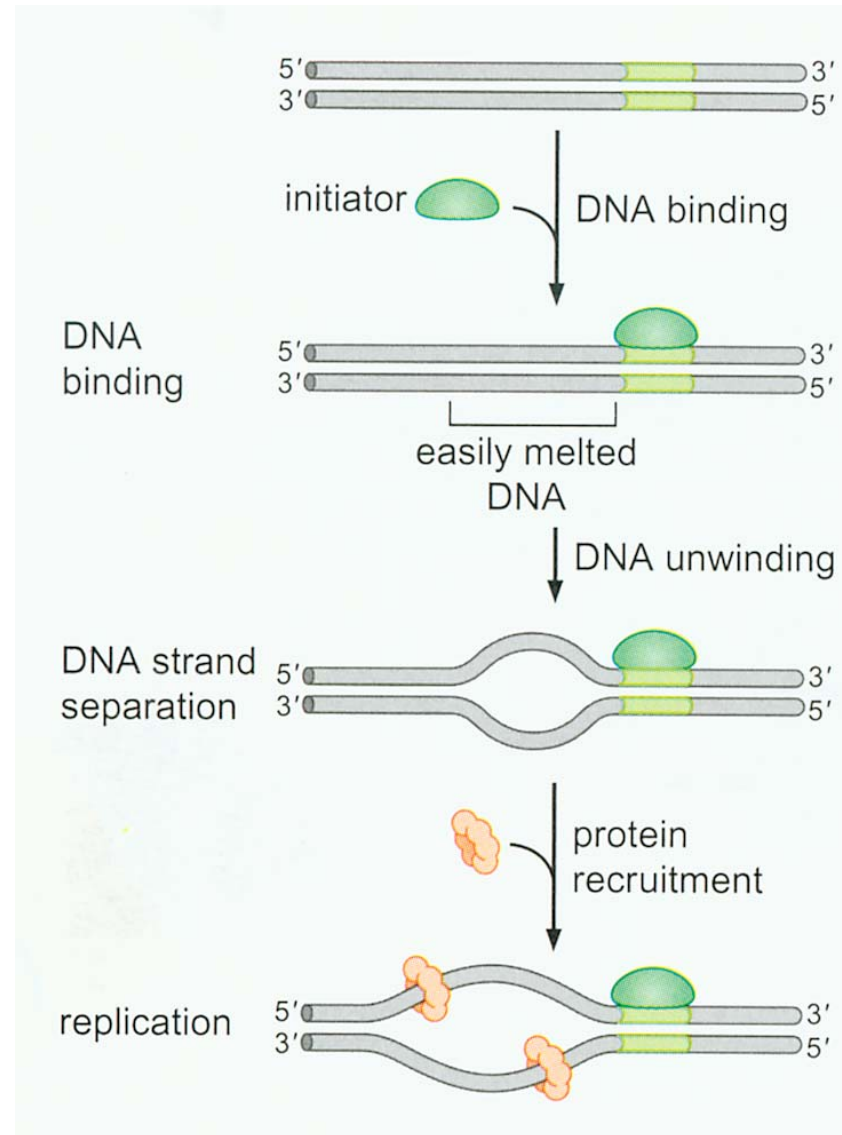
Replikationstermination bei zirkulären Molekülen

Wie man lineare Moleküle repliziert

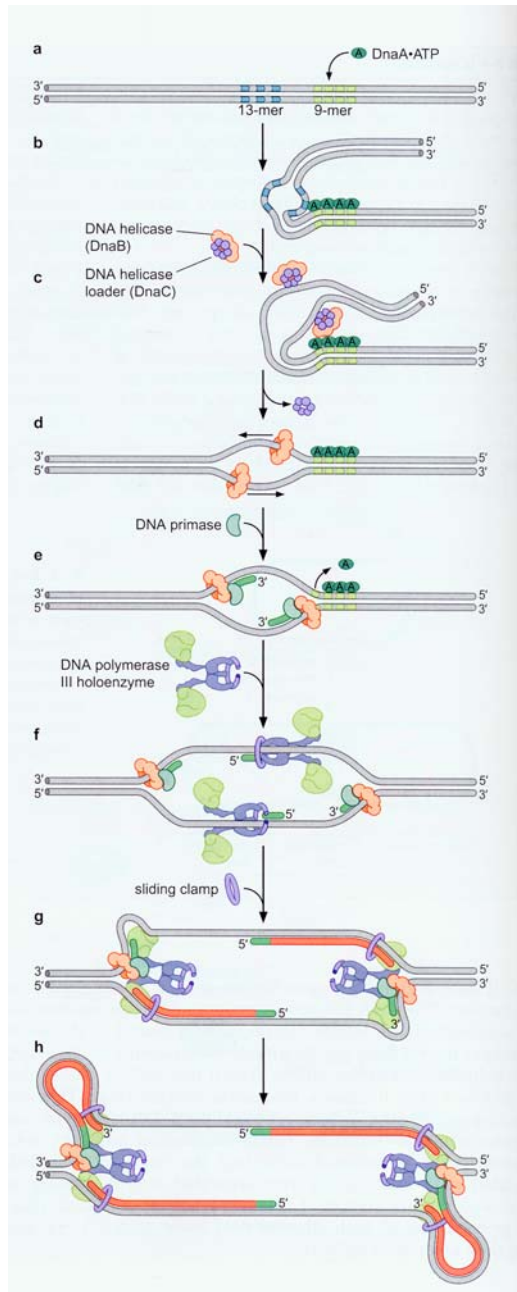
Replikationsinitiation muß eng gekoppelt werden mit dem Prozess der Zellteilung- um sicherzustellen, dass die Chromosomenzahl pro Zelle konstant bleibt

In *E. coli* sind hierfür die **Dam** Methylase und **SeqA** und ihr Zusammenspiel mit dem Initiatorprotein **DnaA-ATP** verantwortlich

Functions of the initiator proteins during the initiation of DNA replication



A model for *E. coli* initiation of DNA replication



DnaA-ATP bindet 9-mer Motiv im Origin, dies führt zu einer Konformationsänderung und zum Aufschmelzen der DNA im Bereich des 13mer Motivs

DnaA-ATP besitzt Einzelstrang-DNA-Bindeaktivität

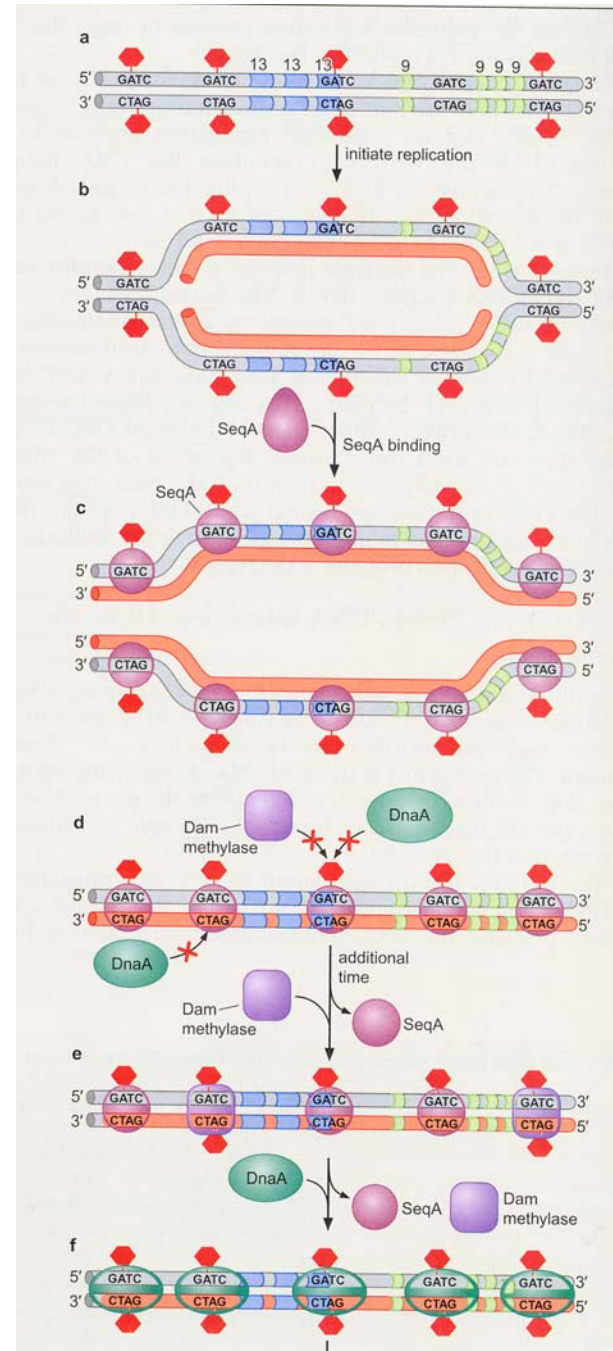
DnaA-ATP rekrutiert DnaB (Helicase) und DnaC (Helicase-Loader)

DnaA-ATP wird während der Initiation zu DnaA-ADP konvertiert und der ADP-ATP Austauschprozess ist langsam

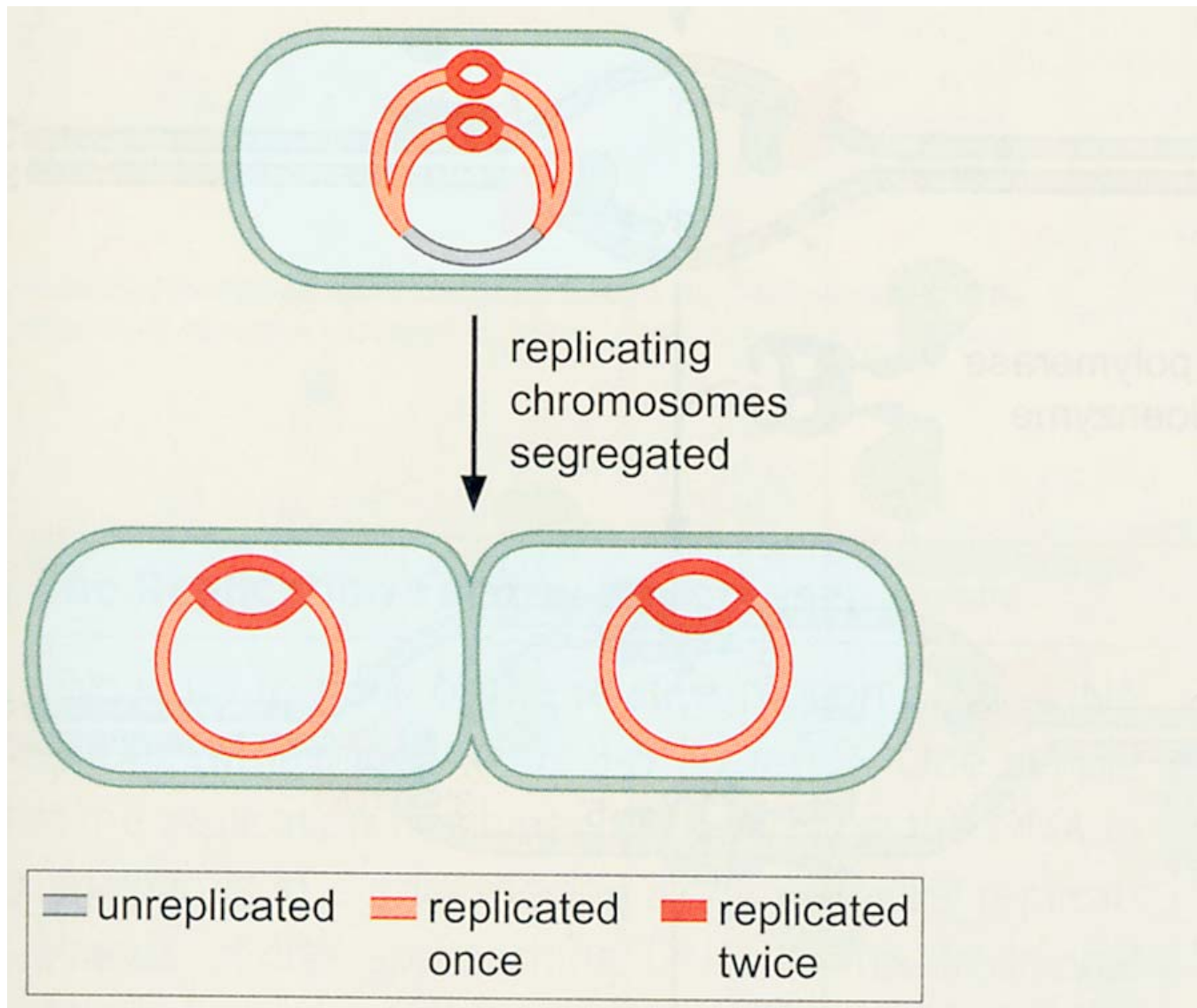
Initiation wird über die verfügbare ATP Menge reguliert!

SeqA bound to hemimethylated DNA
 inhibits re-initiation from
 recently replicated daughter origins

 methylierte GATC Sequenzen



Origins of replication re-initiate replication prior to cell division in rapidly growing *E. coli* cells

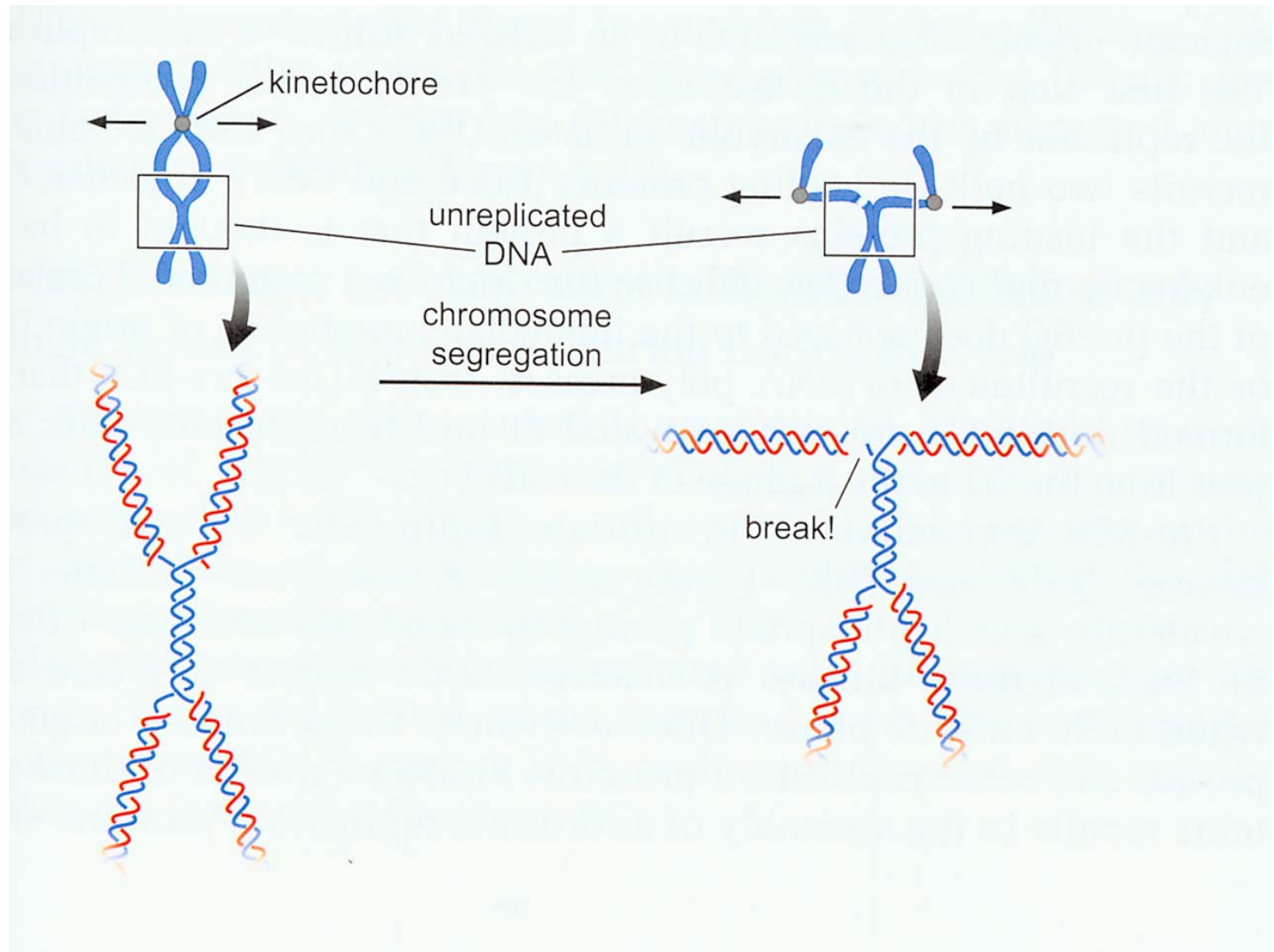


DNA Replikation bei Eukaryoten

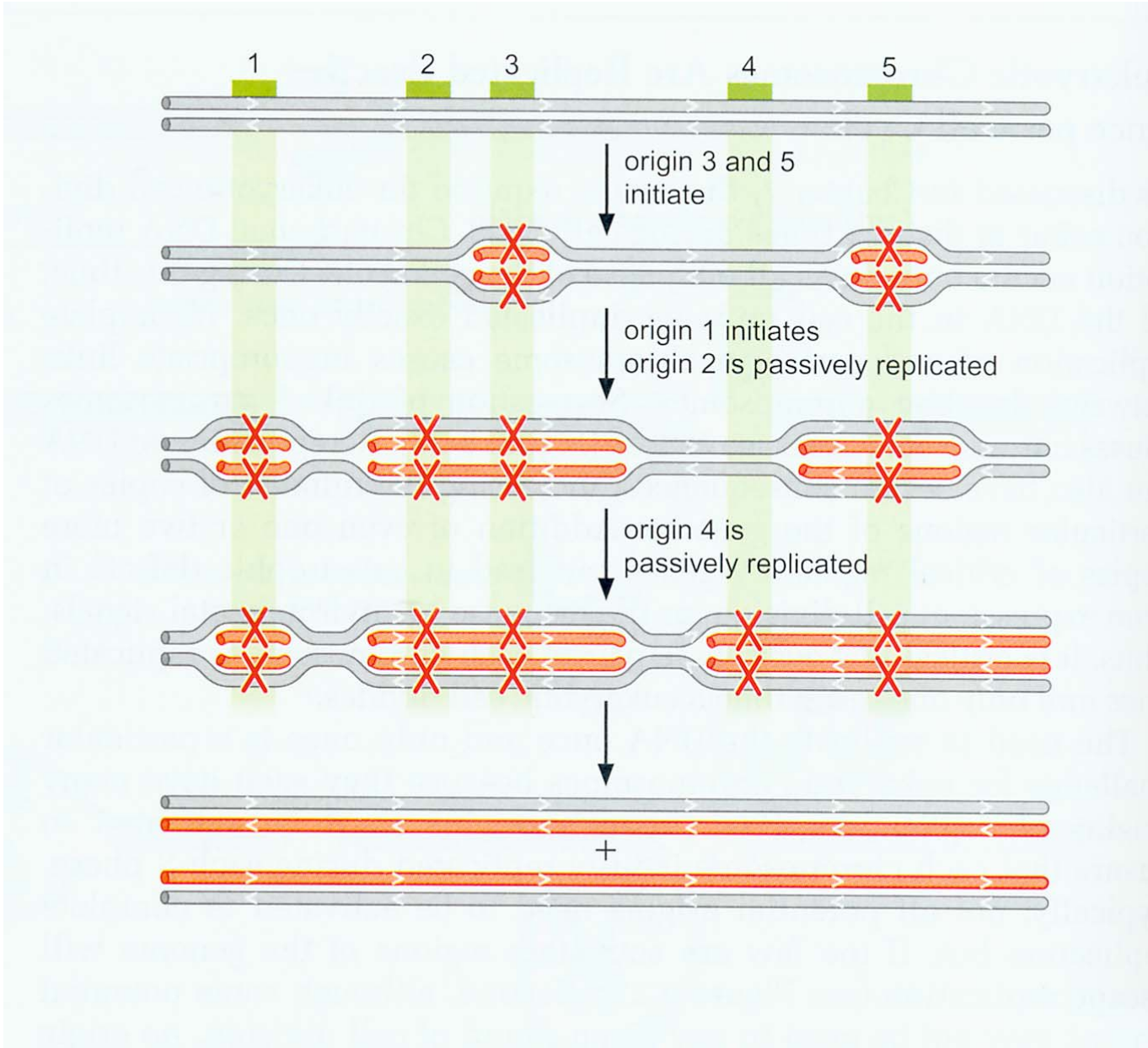
Während der S-Phase muß die gesamte DNA 1x repliziert werden, d.h. es darf keine Regionen geben, die unrepliziert bleiben (führt zu Chromosomenbrüchen während der Segregation) und es darf keine Bereiche geben, die mehrmals repliziert wurden (führt zu Kopiezahlfehlern).

Bei der großen Zahl von Replikationsorigins - wie kann dies gewährleistet werden?

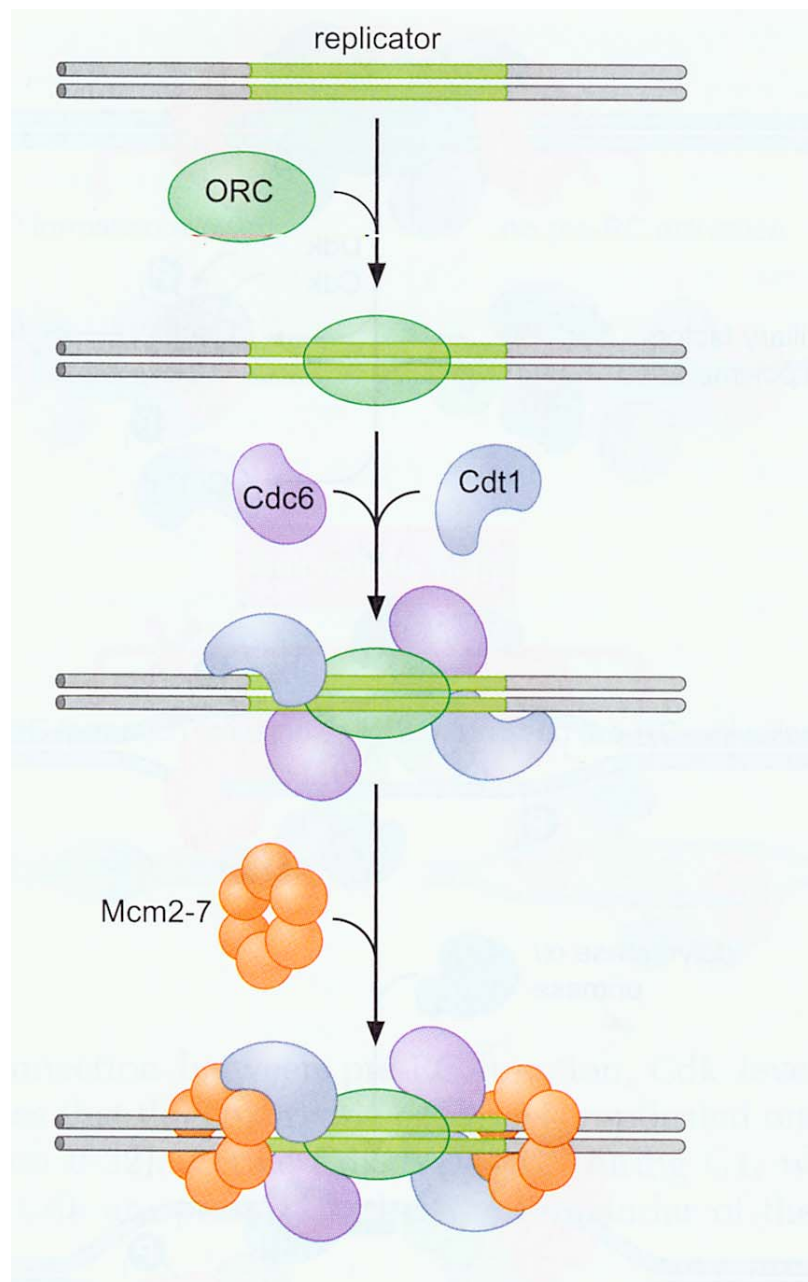
Chromosome breakage as a result of incomplete DNA replication



Replicators are inactivated by DNA replication



The steps in the formation of the pre-replicative complex (pre-RC)

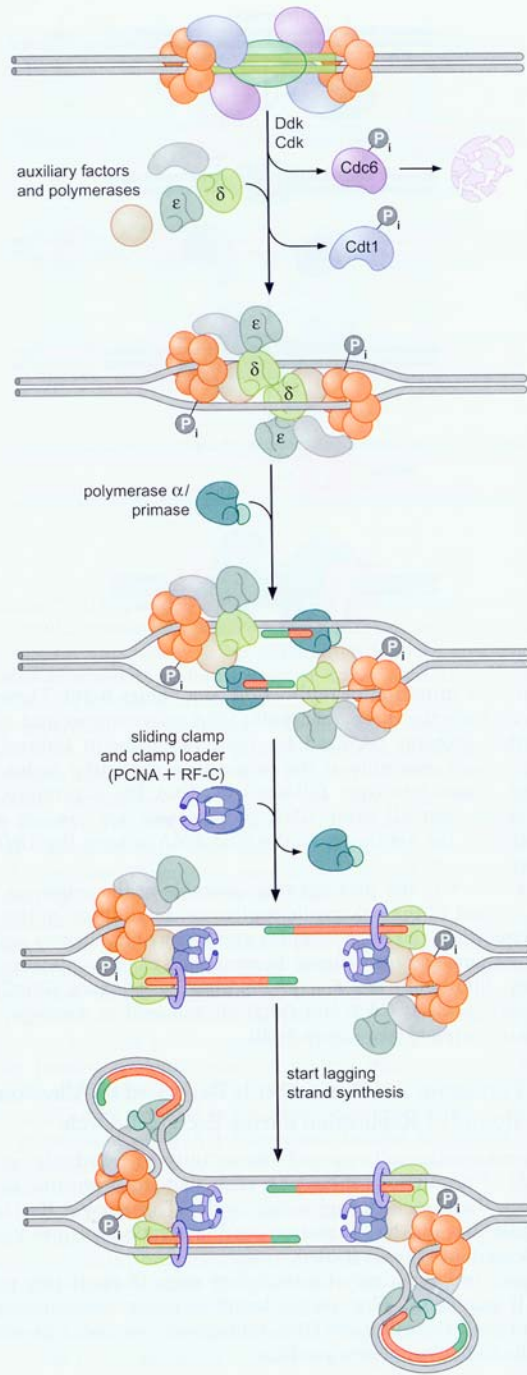


ORC Origin Recognition Complex (6 Proteine), ist während des gesamten Zellzyklus an Origin gebunden

Cdc6 und Cdt1 sind Helicase-loading Proteine, die Bindung an ORC erfolgt in G1

Der Mcm2-7 Komplex ist die Replikationsgabel-Helicase oder auch "Licensing Factor"

Dieser Komplex entsteht in G1, wird aber erst aktiv in der S-Phase



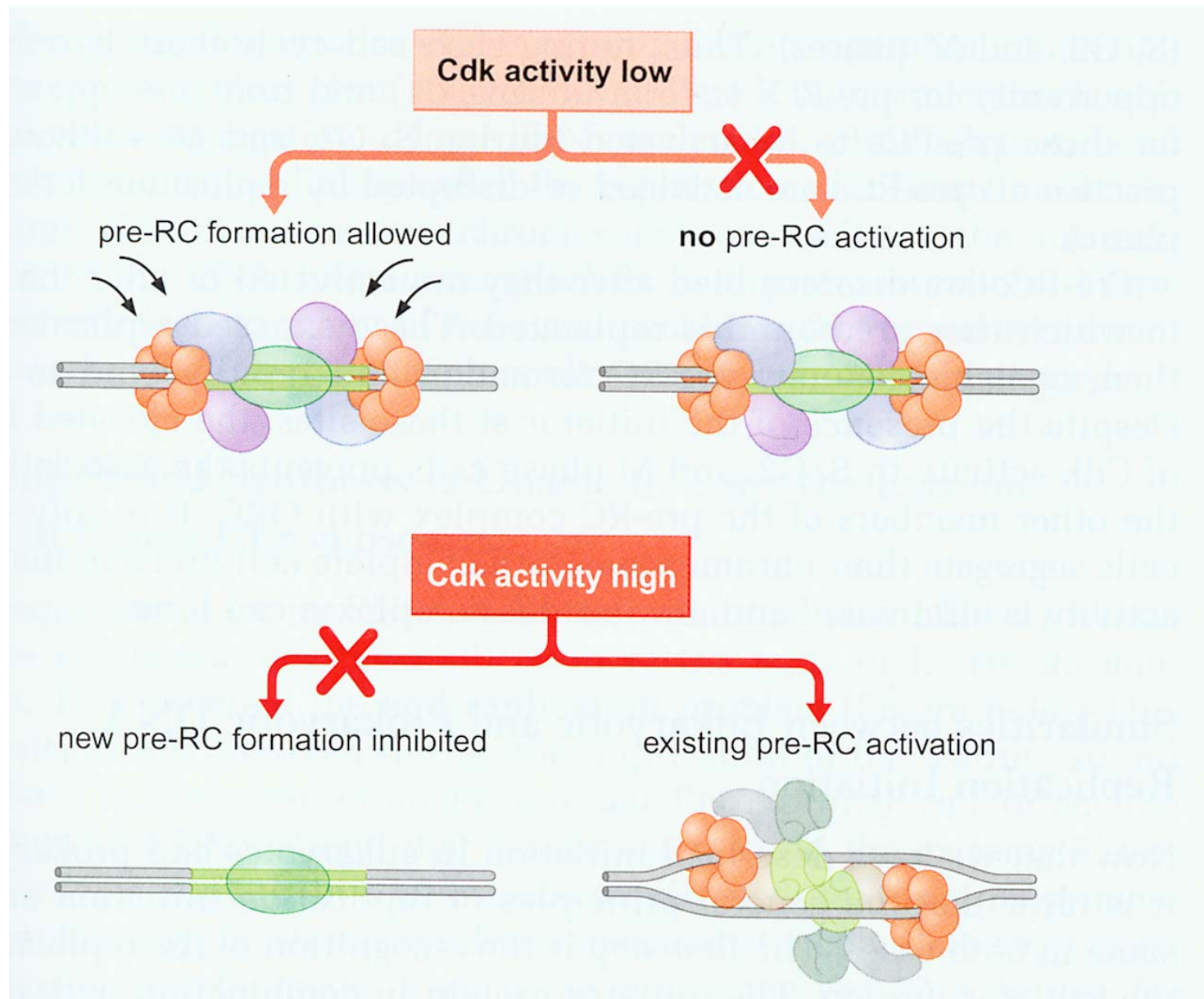
Aktivierung des Prä-Initiationskomplexes erfolgt durch zwei Proteinkinasen, Cdk und Ddk, die erst während der S-Phase aktiv werden. Cdc6-P wird entweder degradiert (Hefe) oder aus dem Nucleus exportiert (höhere Eukaryoten)

Pol ϵ und Pol δ werden rekrutiert

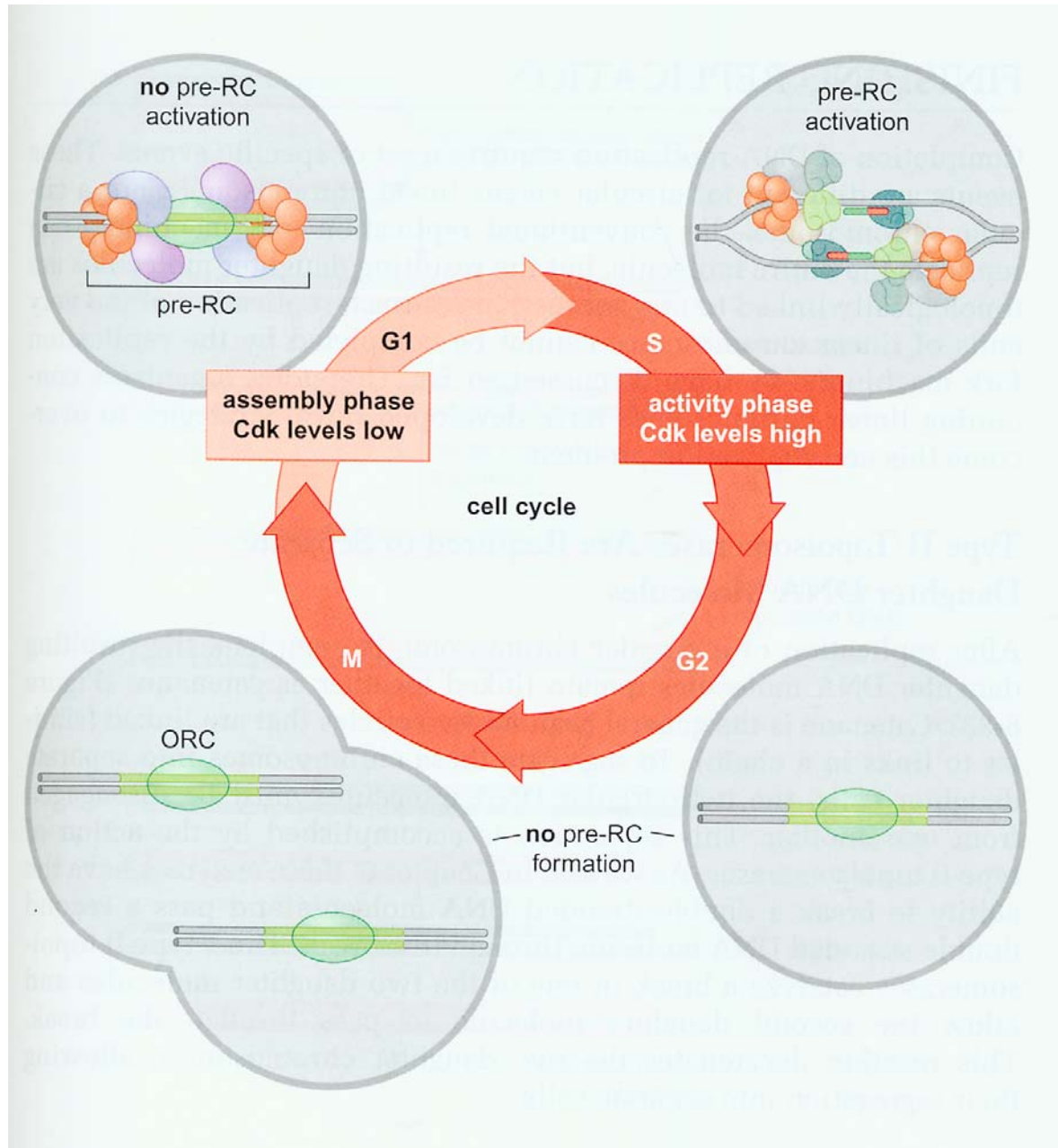
Pol α /Primase wird rekrutiert

In Abwesenheit von Cdc6 kann zwar ORC an den replizierten Origin binden, es kann jedoch keine neue Initiation erfolgen!

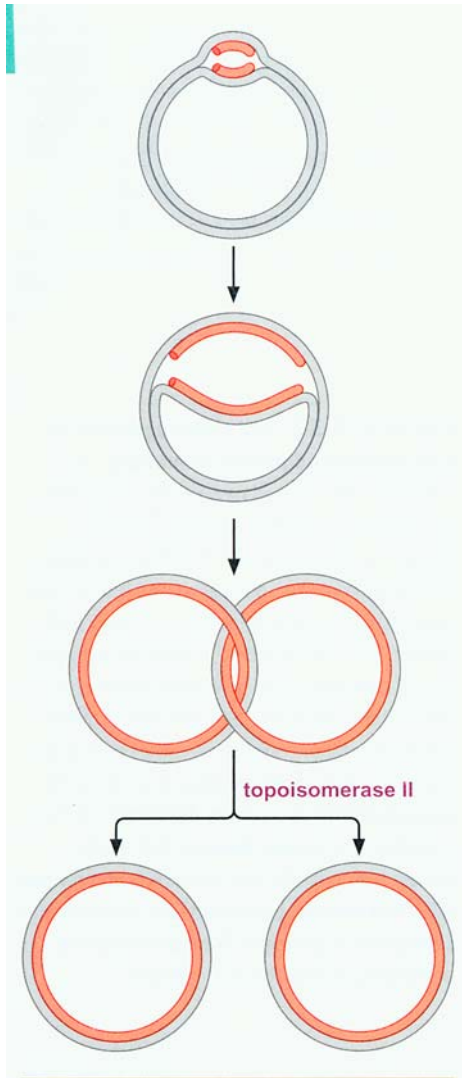
Effect of Cdk activity on pre-RC formation and activation



Cell cycle regulation of Cdk activity and pre-RC formation



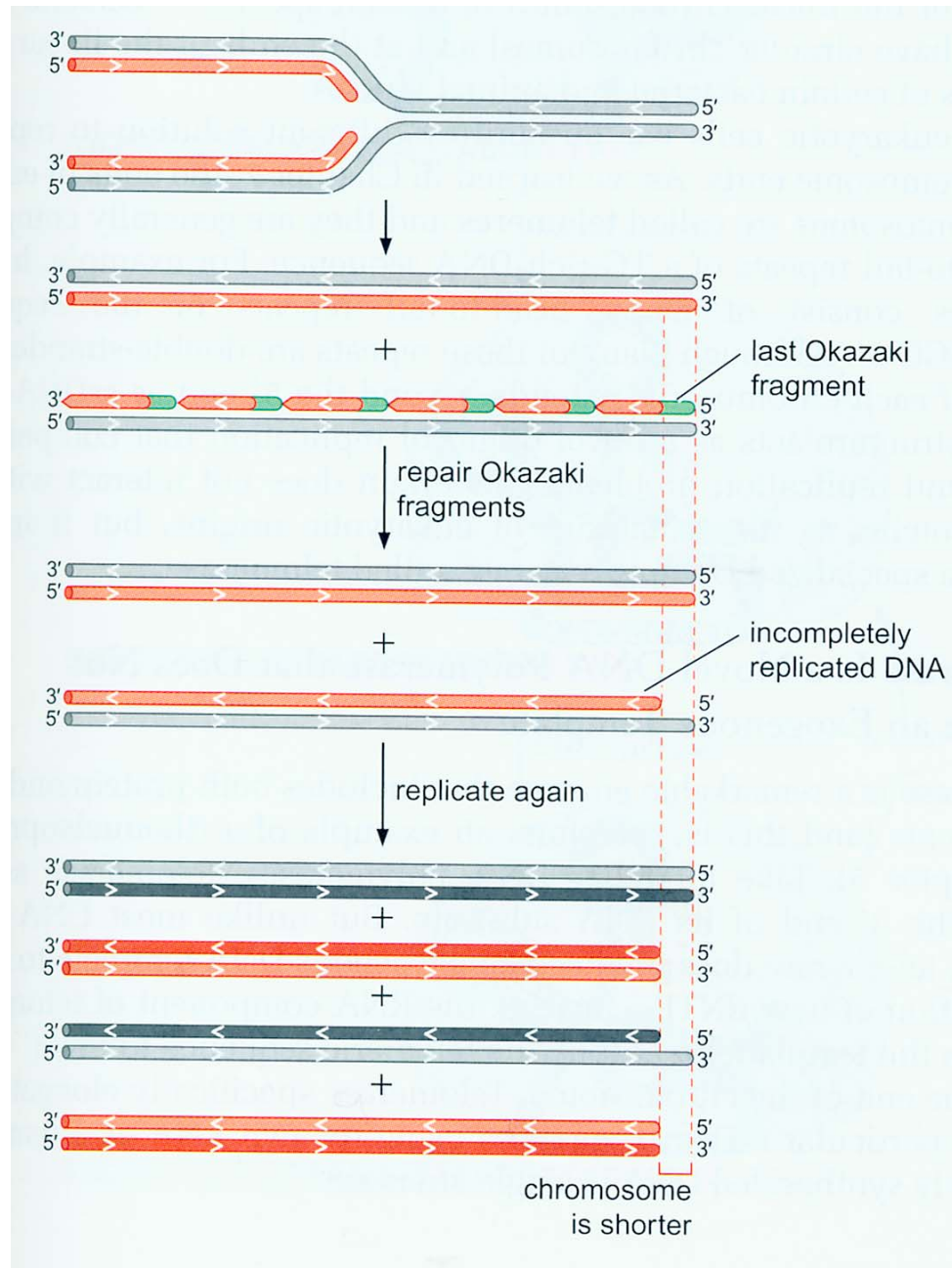
Termination of DNA Replication in *E. coli*



In *E. coli* treffen die beiden Replikationsgabeln aufeinander und laufen aneinander vorbei bevor es zur Termination an asymmetrisch wirksamen Replikationsterminatoren (ter-Sequenzen) kommt. Ter Sequenzen binden Tus Protein, das weitere Replikation unterbindet.

Nach Abschluß der Replikation liegen die zwei Chromosomen als sogenannte Catenane vor, die durch Topoisomerase II oder sequenz-spezifische Rekombination decateniert werden.

The end replication problem

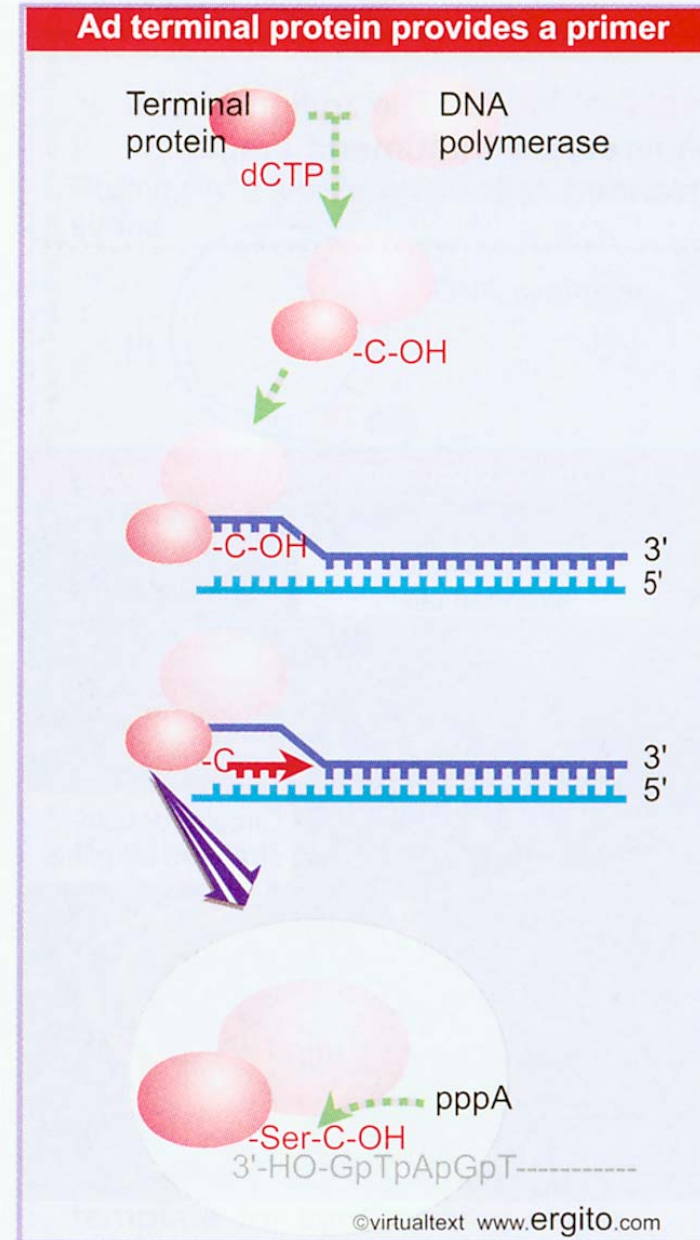


Bei Adenoviren und beim Phagen $\Phi 29$ dient ein terminales Protein als Primer

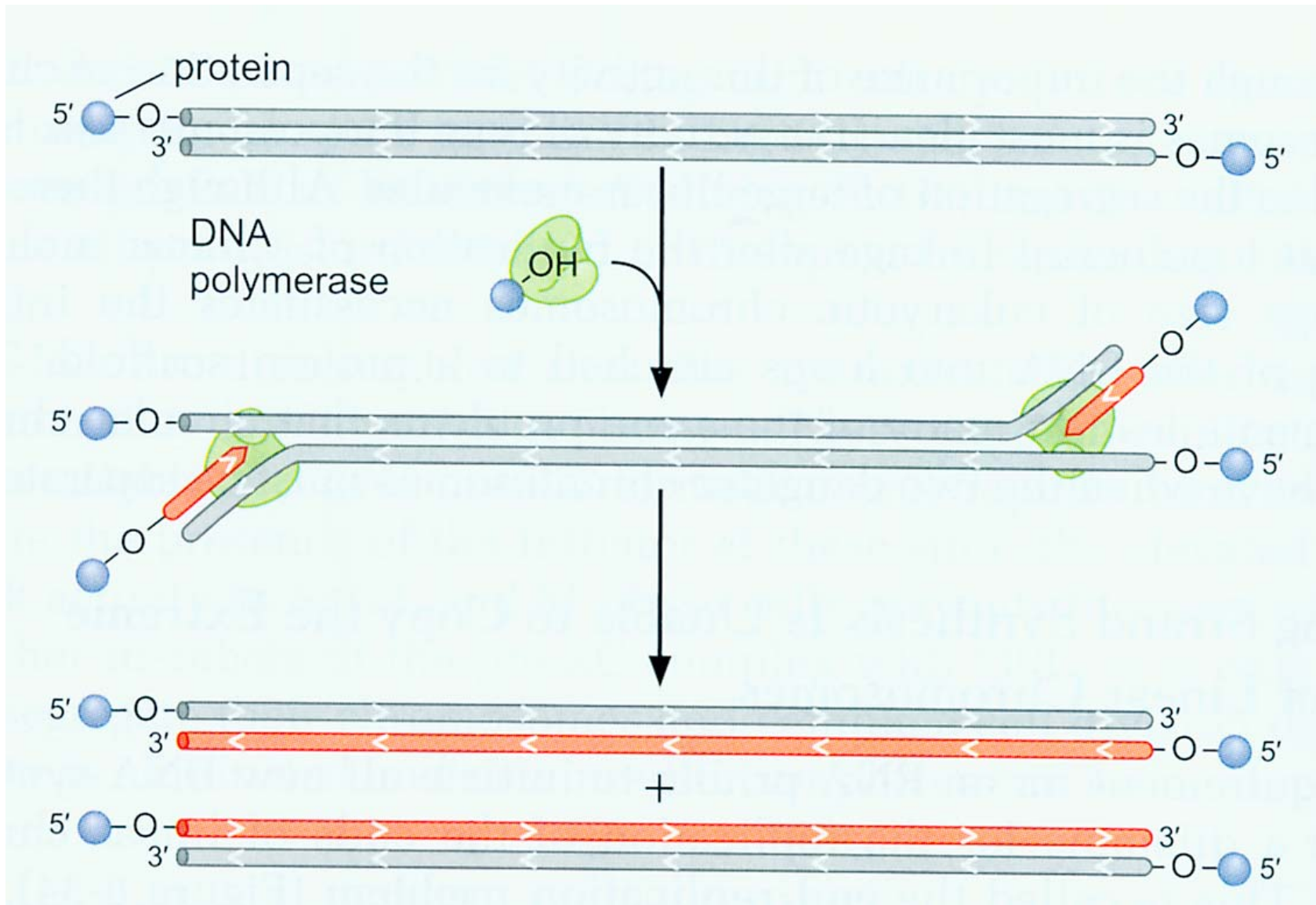
Bei diesen Viren/Phagen ist ein Serinrest des terminalen Proteins über eine Phosphodiesterbindung an die 5'-Enden der doppelsträngigen DNA gebunden

Das terminale Protein bindet dCTP covalent über einen Serinrest, das 3'OH des dCTP dient als Primer

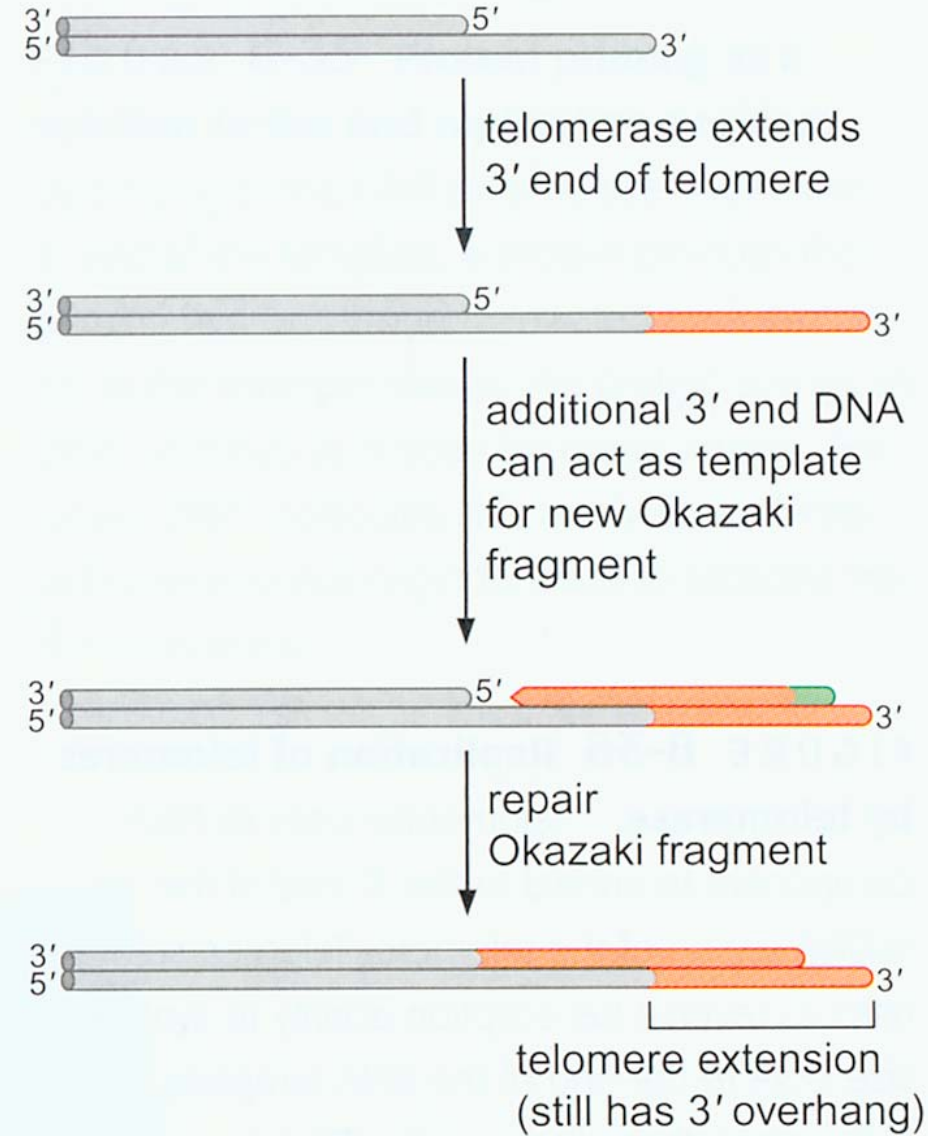
Das terminale Protein bindet DNA Polymerase

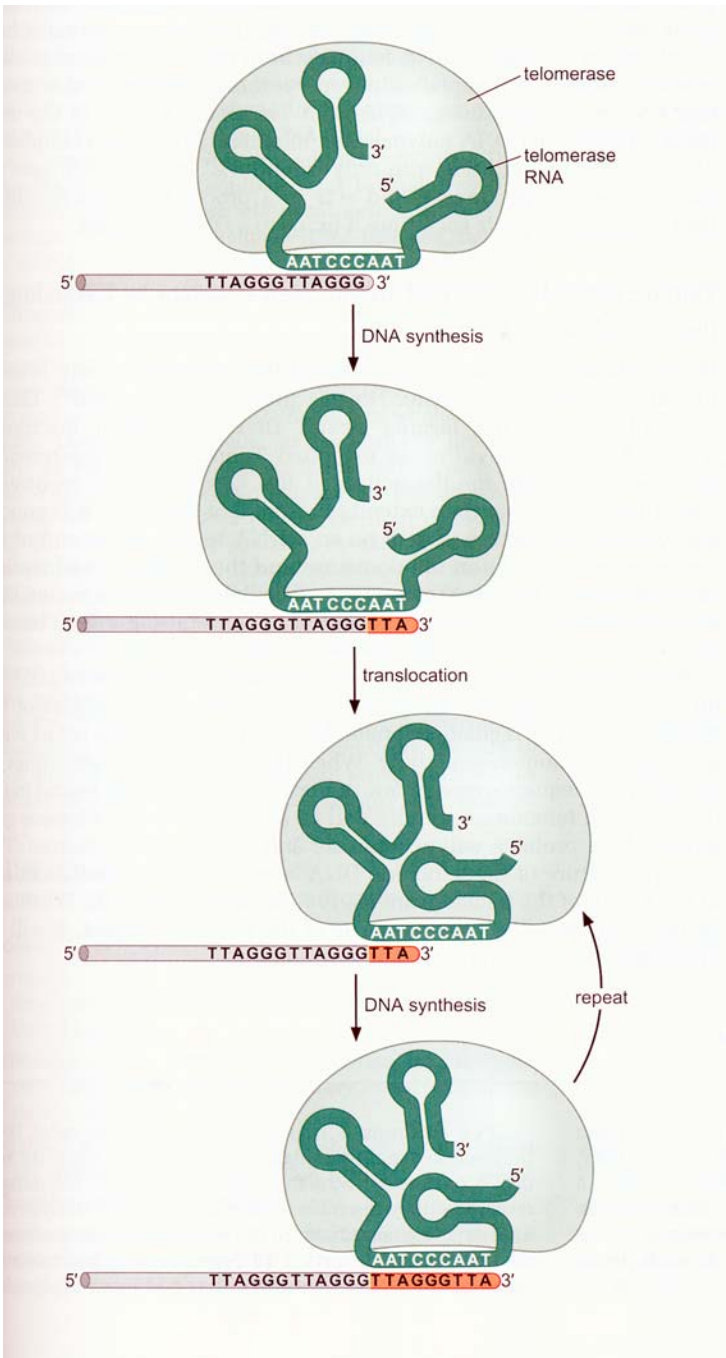


Protein priming as a solution to the end replication problem

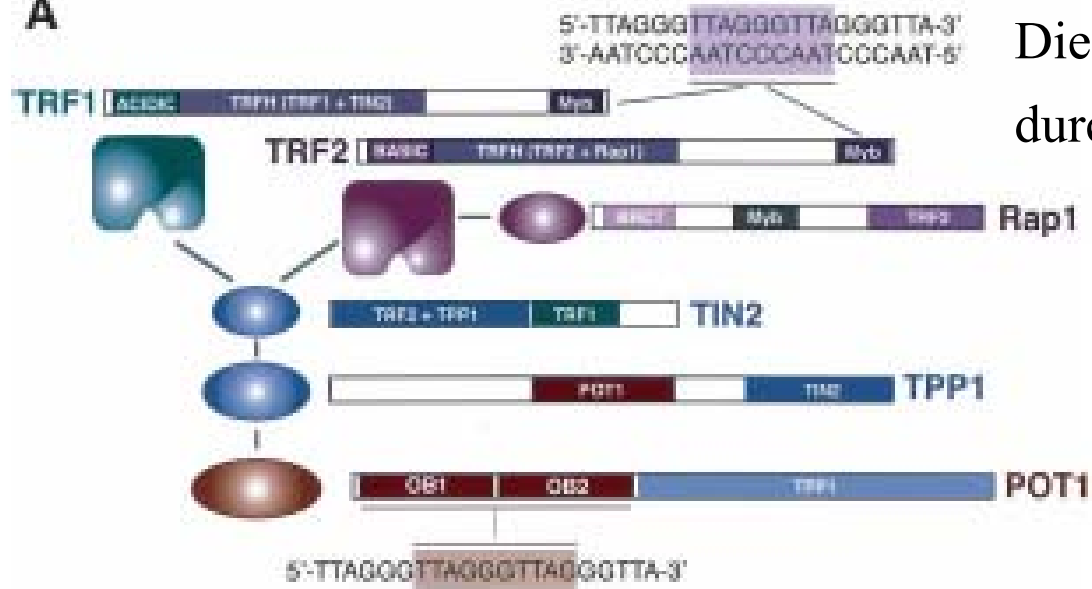


Extension of the 3' end of the telomere by telomerase solves the end replication problem





Replication of telomeres by telomerase

A

Die Chromosomenenden werden durch einen Proteinkomplex geschützt

B

Der Shelterin-Komplex kontrolliert

- die Telomerstruktur
- die Bildung von t-Loops
- die Telomerase Aktivität

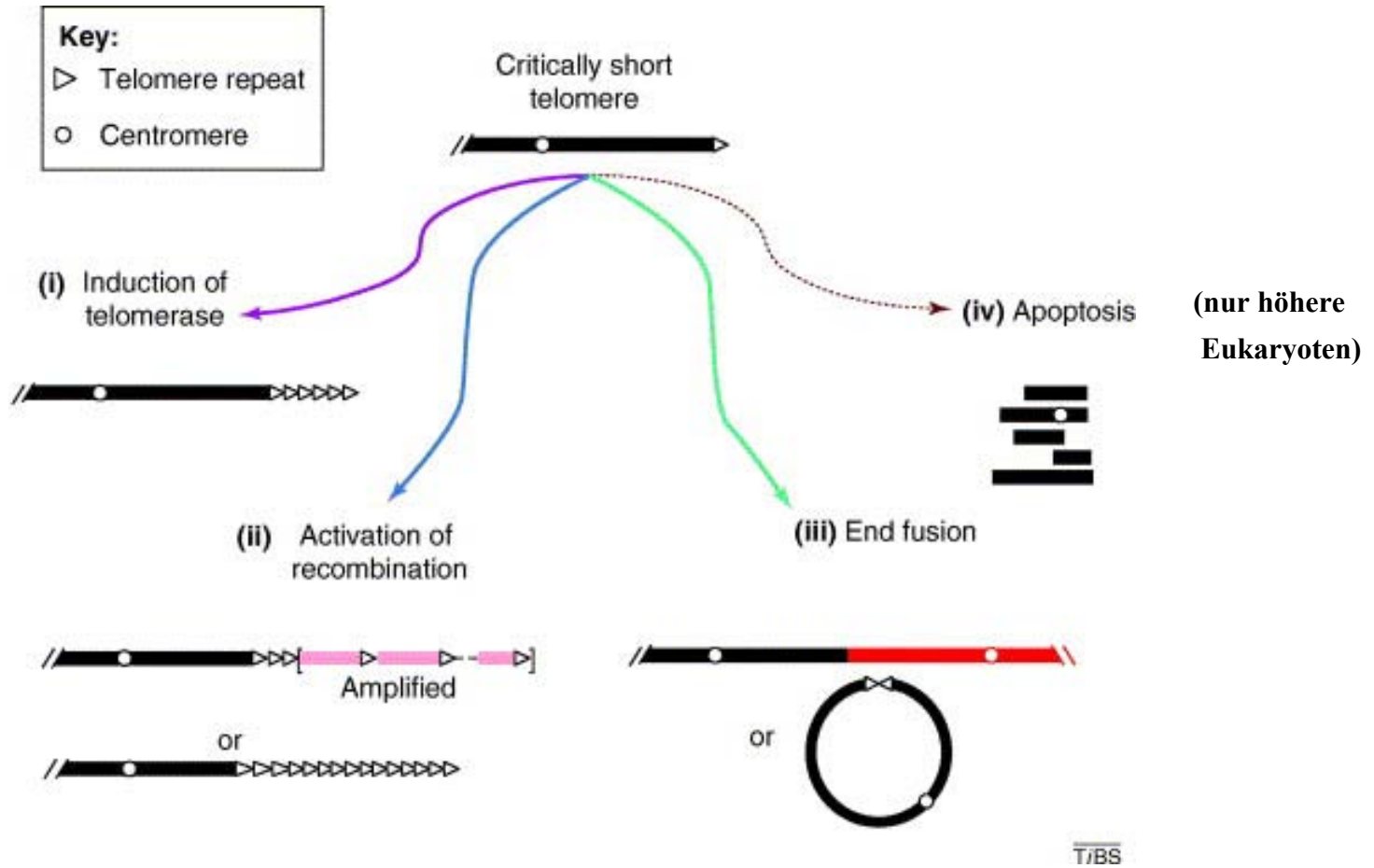
C

Shelterin

- verhindert, dass Chromosomenenden durch die DNA-Reparatursysteme erkannt wird
- verhindert NHEJ
- verhindert homologe Rekombination
- interagiert mit einer Reihe von Reparaturfaktoren, die an DNA Prozessierung beteiligt sind. Wie die Aktivität dieser Proteine kontrolliert wird, ist derzeit unklar

Was kann passieren, wenn Telomere zu kurz werden?

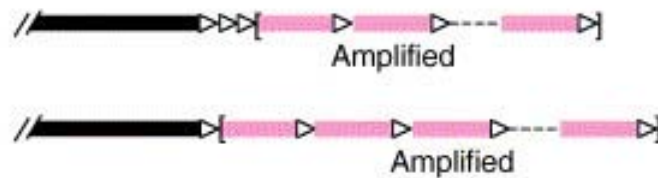
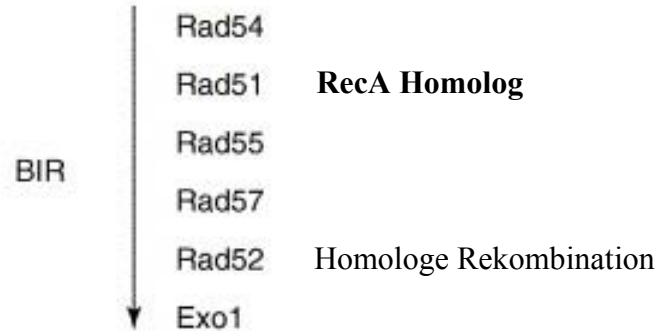
i) in Anwesenheit und ii) iii) und iv) in Abwesenheit von Telomerase



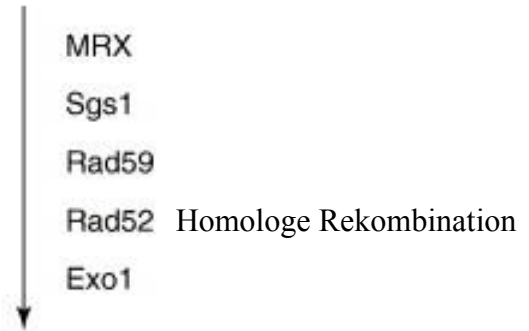
Subtelomerische Amplifikation

Telomer-Repeat Amplifikation

(a) Type I recombination



(b) Type II recombination



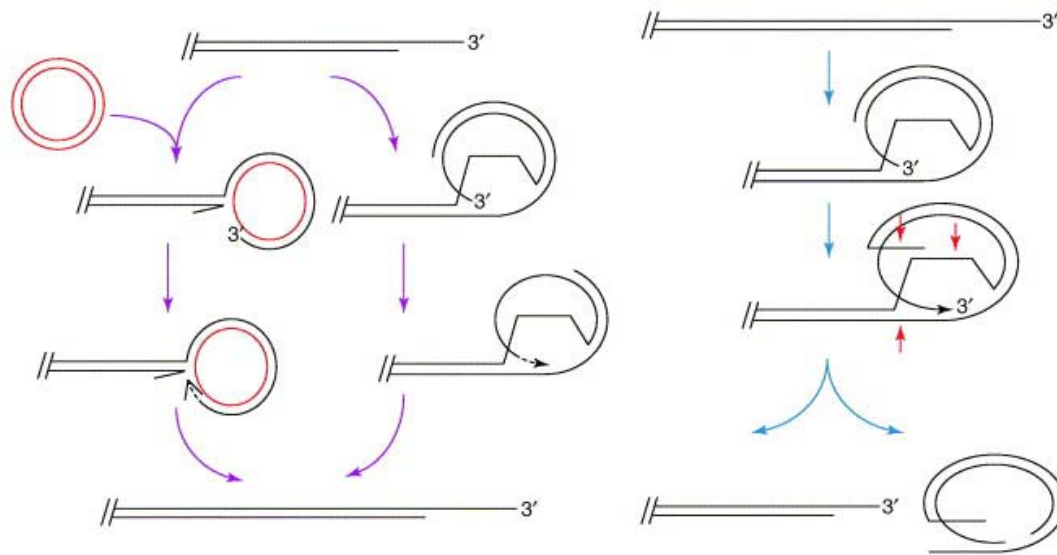
Modellvorstellungen

(a)

(i) Rolling circle replication

(ii) Rolling loop replication

(iii) Telomere rapid deletion



(b)

