

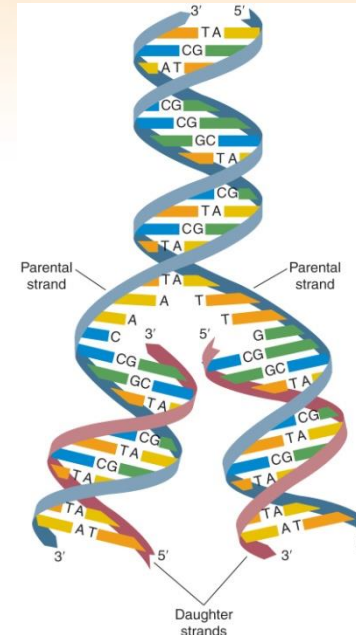
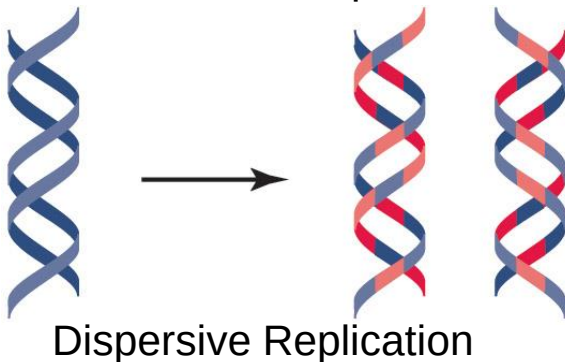
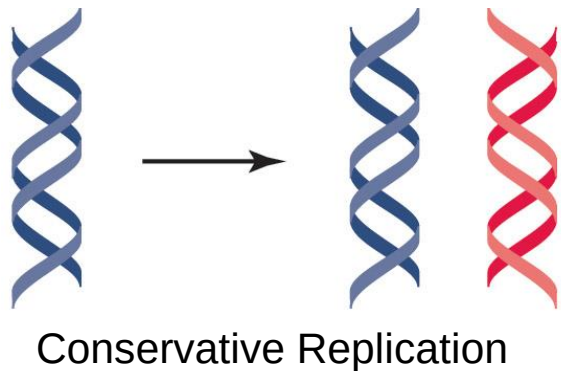
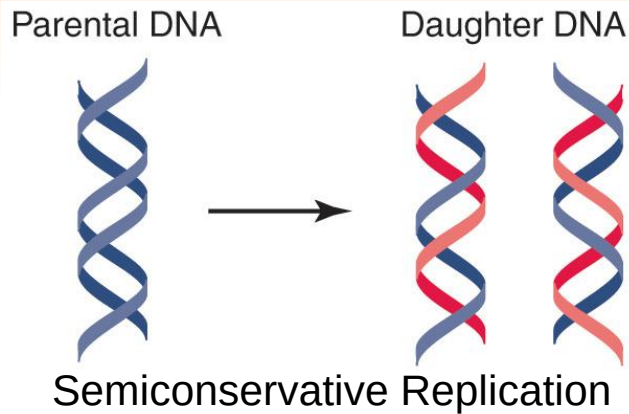


Chapter 9

DNA Replication

9.1 General features of DNA replication

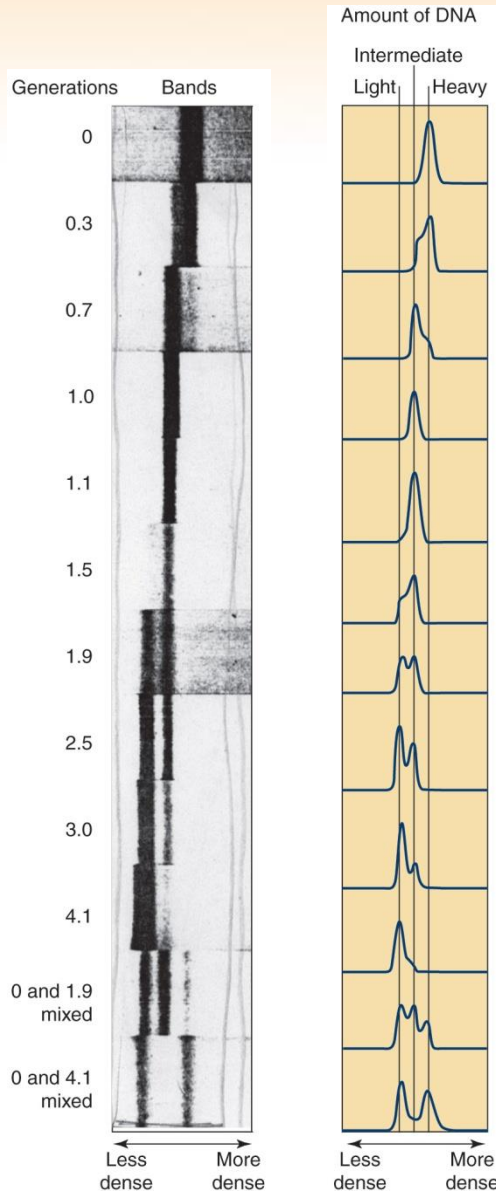
DNA replication은 반보존적이다.



위의 그림처럼 Watson과 Crick은 DNA 복제시 두 가닥이 분리되며 각 가닥이 새 가닥의 합성을 위한 주형으로 작용하는 **semiconservative**를 생각. 그러나 그 당시에는 DNA의 변성이나 가닥의 분리가 불가능 할 것으로 생각함. 다른 대안으로 **conservative replication**과 **Dispersive replication**을 생각하게 됨.

Semiconservative replication을 증명하는 실험

Meselson과 Stahl의 실험

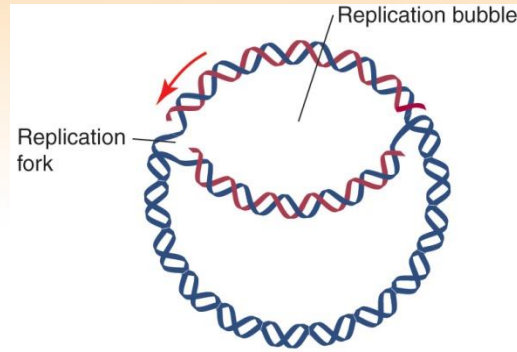
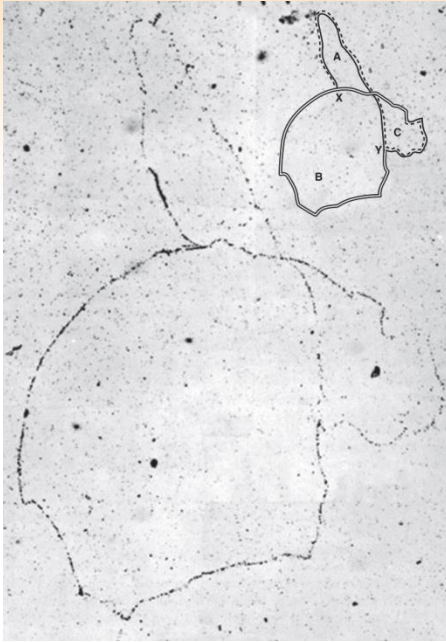


1. culture *E. coli* in [^{15}N]NH $_4$ Cl-containing (heavy) medium
2. transfer bacteria to growth [^{14}N]NH $_4$ Cl-containing (light) medium
3. remove samples at different times and extract DNA
4. subject DNA to cesium chloride density gradient centrifugation

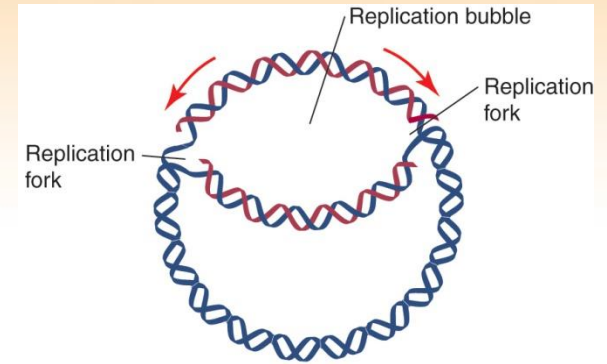
배양 초기에 추출된 *E. coli* DNA는 ^{15}N 을 갖고 있어 dense한 쪽에서 DNA가 검출되고 ^{14}N 을 갖고 있는 light medium으로 옮긴 후 세대가 거듭 할 수록 덜 dense한 곳에서 DNA가 검출된다.

^{15}N 배지에서 ^{14}N 배지로 세포를 이전 한 후 1세대가 되면 한 가닥은 ^{15}N strand이며 다른 한 가닥은 ^{14}N strand 이다.

DNA replication은 bidirectional



Unidirectional replication



Bidirectional replication

1963년 Cairns는 복제가 θ 구조인 것을 관찰함. 그러나 복제 방향이 양방향인지 단일 방향인지는 모름

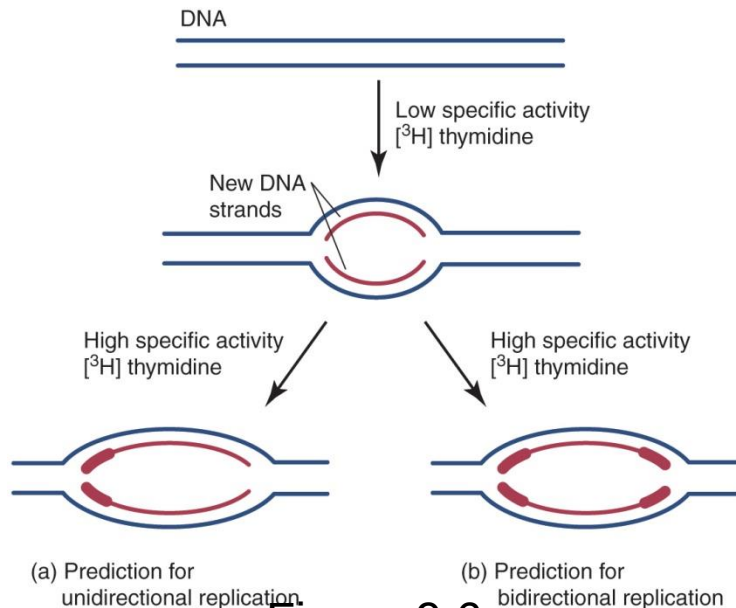


Figure 9.6

1973년 Gyurasits와 Wake는 복제 방향을 알아내기 위하여 $[^3\text{H}]$ thymidine이 있는 배지에서 키움. 초기에는 약한 농도에서 키우다가 나중에는 높은 농도에서 키움.

Bidirectional replication; 양쪽 끝이 진하게 나옴
Unidirectional replication; 한쪽 끝이 진하게 나옴

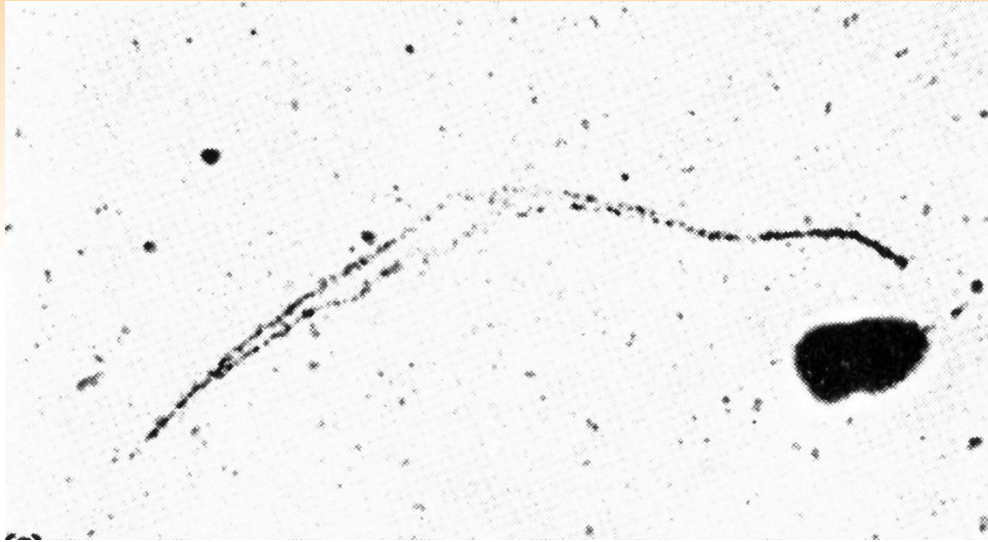


Figure 9.7

위의 사진처럼 양쪽 끝이 진하게 나와
Bidirectional replication임이 증명 됨

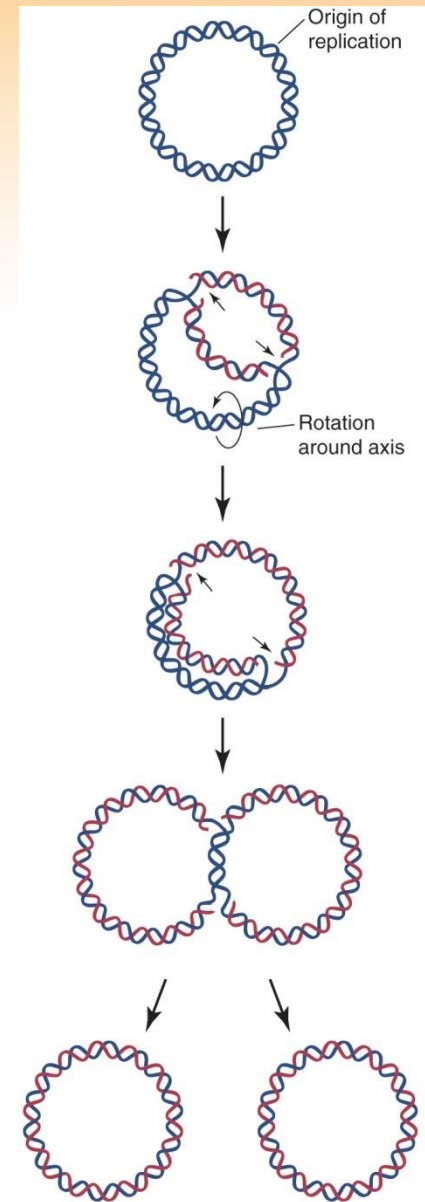


Figure 9.08: Bidirectional replication. (θ 구조)
5

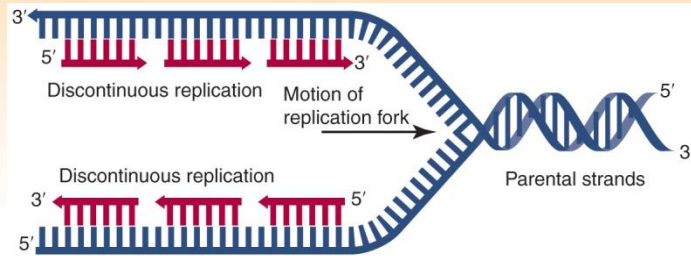
DNA replication is semidiscontinuous

DNA는 두 가닥으로 되었으며 각각의 가닥이 서로 반대 방향으로 뺀 **antiparallel**이다. 그러나 DNA polymerase는 5'에서 3'으로 새로운 DNA를 합성함.

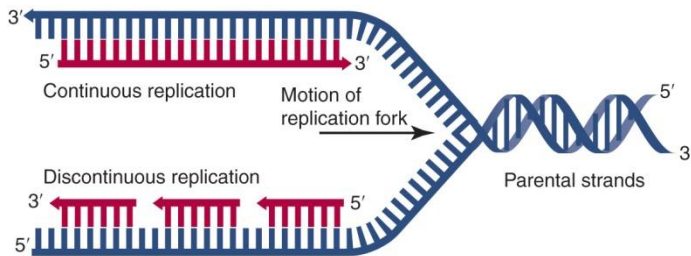
1968년 Okazaki는 3'→5' 사슬이 discontinuous할 것이라는 가설을 제안함

Discontinuous model은 모든 새로 형성된 DNA는 조그만 분절로 존재하나 semidiscontinuous는 하나는 긴 분절이고 다른 가닥은 조그만 분절로 존재.

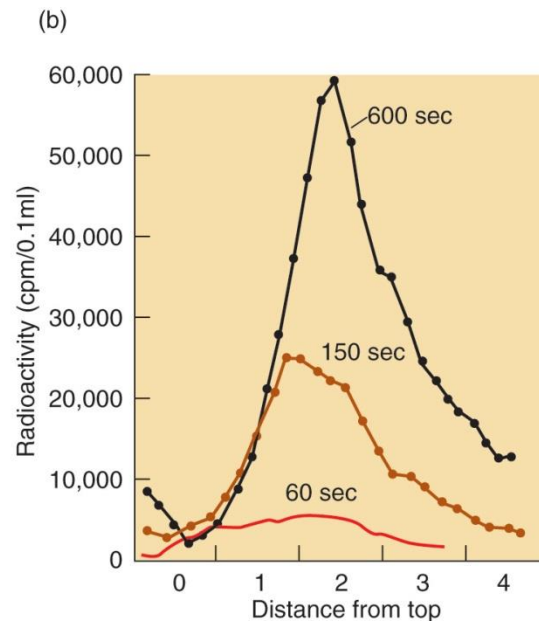
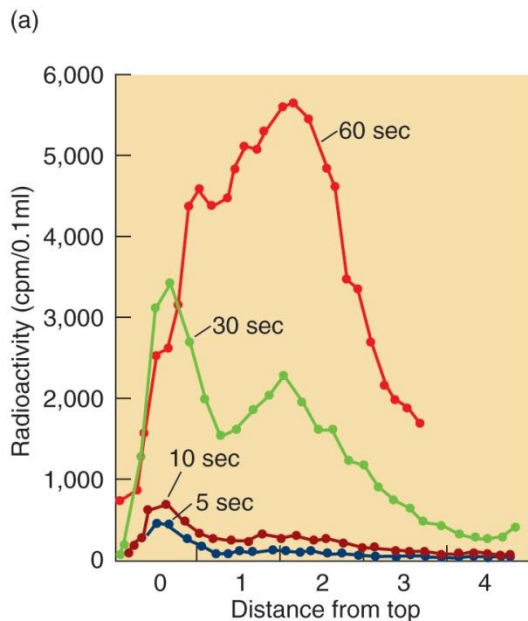
*E.coli*를 [³H]thymidine하에서 다양한 시간에 키우고 DNA를 추출 한 후 sucrose gradient centrifugation을 함.



Discontinuous model

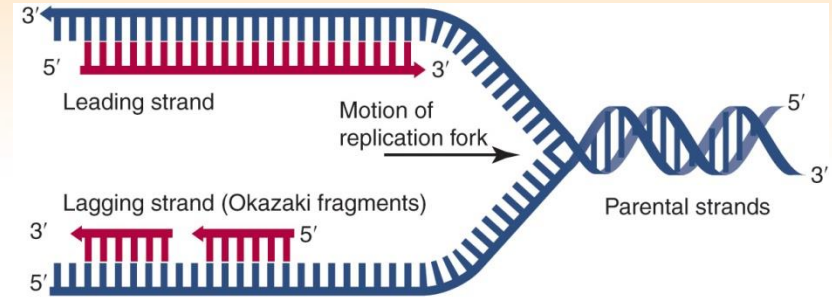
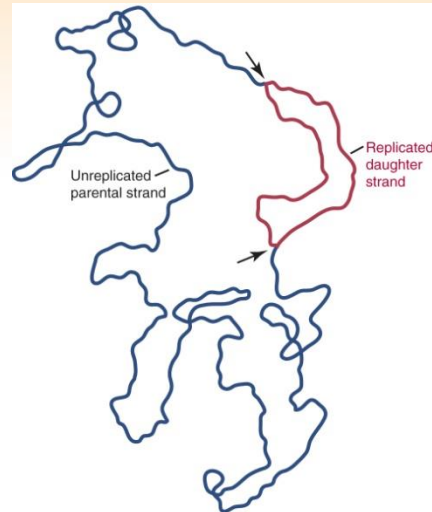
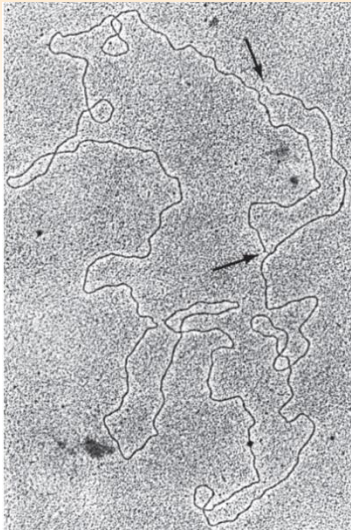


Semidiscontinuous model



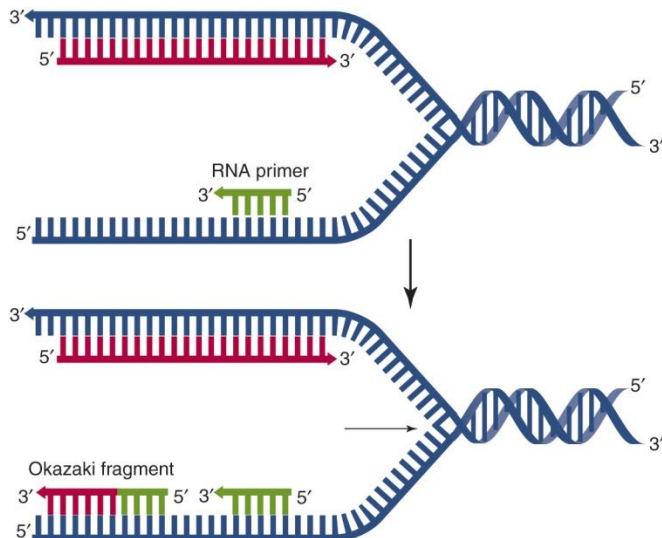
실험결과 5초 배양 후 원심분리 Tube의 윗부분에서 방사선 동위 원소가 감지됨. 이는 30초까지 증가. 약 1,000-2000bp로 간주. 두번째 fraction은 10초에서는 거의 감지않되지만 60초에서 뚜렷이 나타남. 이는 작은 분절이 큰 분절로 이어졌다고 간주

The leading and lagging strands of semidiscontinuous replication



Phage λ DNA의 복제를 전자 현미경으로 보면 짧은 단일 가닥 지역이 관찰되며 discontinuous 가닥의 합성 시작부위를 나타냄.

Leading strand (선도 가닥)와 lagging strand (지연가닥)가 있어 선도가닥은 continuous Replication을 하며 lagging strand는 discontinuous replication한다. 이때 생기는 분절을 Okazaki fragment라고 한다.



DNA 중합 효소는 새로운 DNA 가닥의 합성을 시작하는 것이 아니라 이미 존재하는 primer의 3' 끝에 단지 deoxyribonucleotide를 첨가만 하는 역할을 한다.

9.2 Bacterial DNA replication machinery

*E. coli*의 복제는 가장 기본적이고 연구가 많이됨
다음의 세 단계로 나눈다.

- **initiation**
 - **assembly of the replication apparatus at a unique site**
- **elongation**
 - **leading and lagging strand synthesis**
- **termination**
 - **begins when the two replication forks meet half way around the chromosome**

표 9.1처럼 DNA 복제에 필요한 유전자들은 돌연변이를 이용한 연구에서 밝혀짐.

Quick-stop mutants; 돌연변이체를 제한 온도로 옮겼을 때 바로 기능이 멈춘 경우.

Slow-stop mutants; 돌연변이체를 제한 온도로 옮겼을 때 그 회의 복제는 계속되고 새로운 복제가 안 되는 경우를 의미.

TABLE 9.1 Essential Genes for DNA Replication

Gene	Mutant Phenotype	Protein	Primary Function
dnaA	Slow stop	DnaA	oriC recognition
dnaB	Quick stop	DnaB	helicase
dnaC	Slow stop or quick stop	DnaC	Delivers DnaB helicase to oriC
dnaE	Quick stop	α subunit of DNA polymerase III holoenzyme	Polymerase activity
dnaG	Quick stop	primase	RNA primer synthesis
dnaN	Quick stop	Sliding clamp	Tethers core polymerase subassembly to DNA
dnaQ	Hypermutation	ϵ -subunit DNA polymerase III holoenzyme	3'→5' exonuclease activity
dnaX	Quick stop	γ and τ subunits DNA polymerase III holoenzyme	γ subunit—ATP binding site in clamp loader subassembly τ subunit—central organizer for DNA polymerase III holoenzyme
hoIA	Quick stop	δ subunit DNA polymerase III holoenzyme	Subunit in clamp loader subassembly—opens sliding clamp
hoIB	Essential	δ' subunit DNA polymerase III holoenzyme	Subunit in clamp loader subassembly—regulates activity
hoIC	Slow growth	χ subunit DNA polymerase III holoenzyme	Subunit in clamp loader subassembly—switching mechanism
hoID	Unknown	ψ subunit DNA polymerase III holoenzyme	Subunit in clamp loader subassembly—function is unknown
hoIE	None	θ subunit DNA polymerase III holoenzyme	Function is unknown
ssb	Quick stop	SSB	Binds to single-stranded DNA
gyrA	Quick stop	Subunit in DNA gyrase	ATP-driven negative supercoiling
gyrB	Quick stop	Subunit in DNA gyrase	ATP-driven negative supercoiling
polA	Defective DNA repair	DNA polymerase I	Gap filling and primer removal
ligA	Accumulates nascent fragments	DNA ligase	Seal DNA nicks

9.3 Initiation stage in bacteria

1960년대 Francois Jacob와 Sydney Brenner는 DNA 복제를 설명하기 위하여 replicon model 을 주장함.

Replicon; 플라스미드, 박테리아, 진핵세포 염색체처럼 독립적으로 복제하는 DNA 분자.

Initiator protein이 replicator (복제가 되는 DNA 분자내의 특정 서열)에 붙어서 복제가 시작

Replicator내에 복제가 시작되는 부위를 origin of replication (*ori*)라고 한다.

E. coli initiator protein (DnaA)은 4개의 domain으로 됨.

Domain I; oligomerization과 DnaB protein (helicase)를 불러드린다.

Domain II; DnaB가 일시적으로 결합 Domain III; ATP가 결합하고 ATPase activity를 갖음

Domain IV; DNA 결합 부위

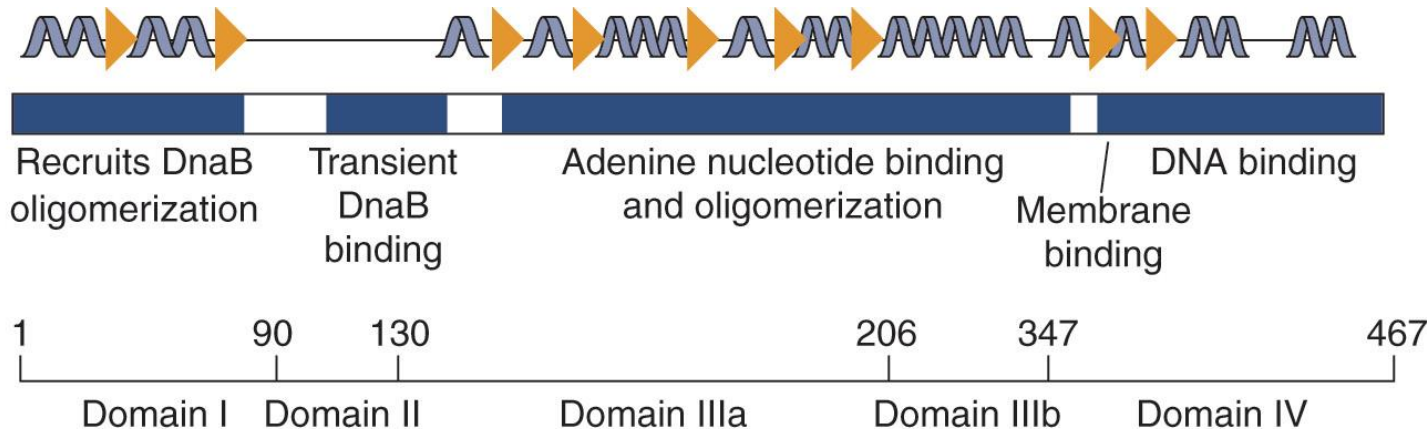
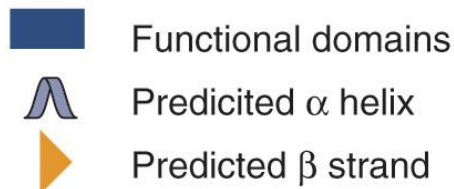
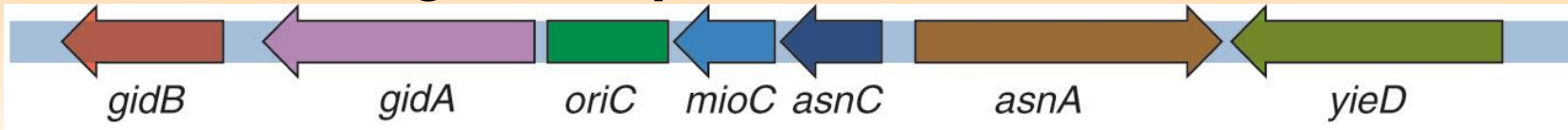


Figure 9.14

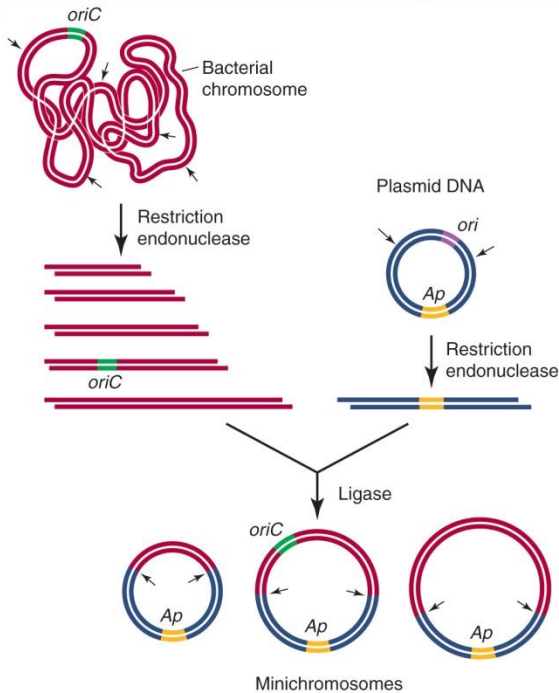


The *E. coli* origin of replication *oriC*

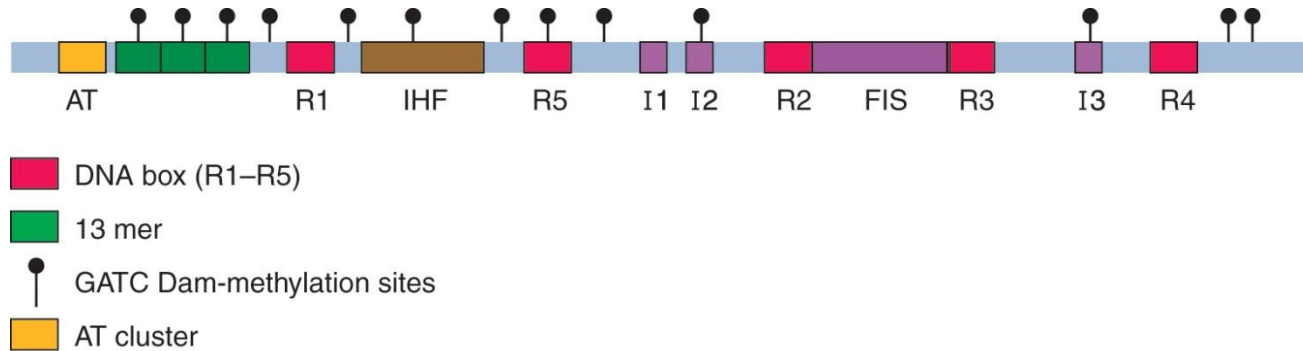
Figure 9.15



E. coli *oriC* 주변의 유전자들. 화살표방향은 전사 방향을 나타냄.

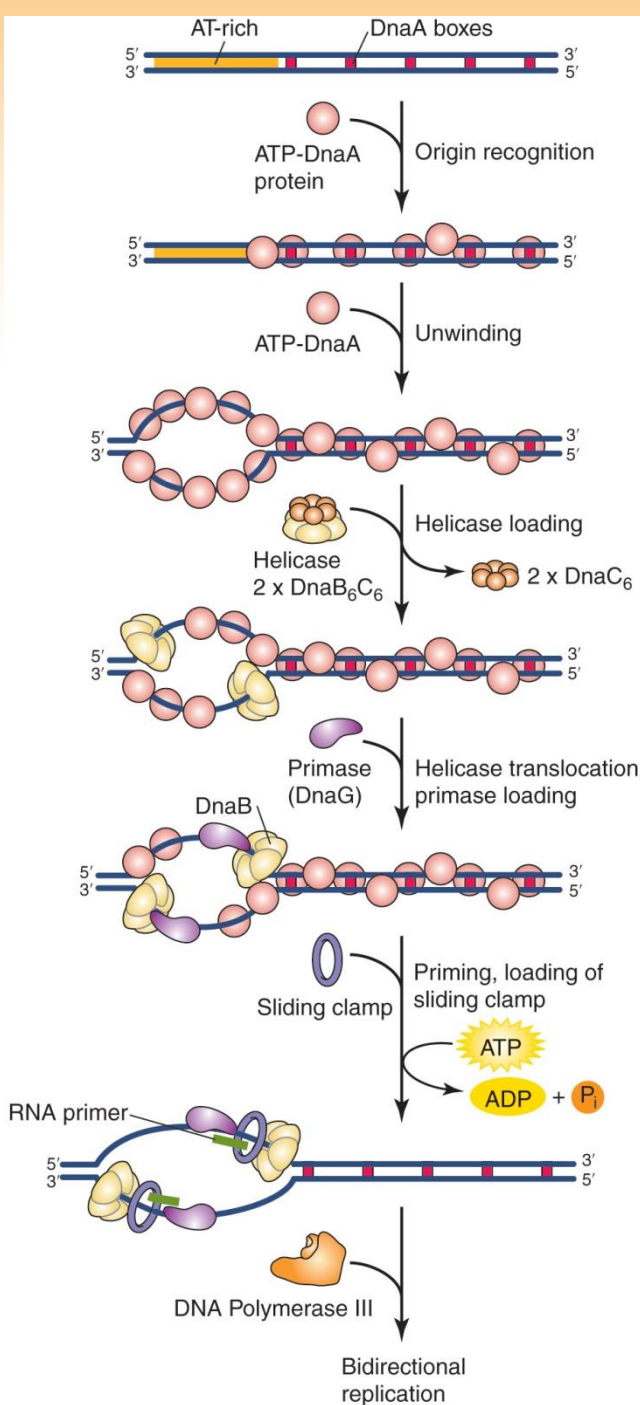


좌측 그림은 *oriC*를 분리하는 실험을 설명함. Plasmid DNA의 원래 *oriC*를 제거한 후 재조합 방법을 이용하여 염색체의 *oriC*와 항생제 저항성을 갖춘것만 선택함. 이러한 연구를 통하여 *oriC*에서 꼭 필요한 서열이 245bp정도 라는 것을 밝힘



oriC 내의 중요 element를 보면 (그림 상단우측)

DnaA box (R1-R5); 9bp (TTATNCACA)로 구성 되었으며 DnaA단백질-ATP가 강하게 결합. I boxes (I1-I3); DnaA단백질-ATP가 결합하며 R과 I에 DnaA 단백질이 결합하면 좌측에 있는 3개의13mer (AT rich, 초록색) 지역이 풀려 이곳에 20- 30 개의 DnaA 단백질이 더 결합한다. 이때 단백질내의 oligamerization 지역이 작용하여 커다란 aggregate를 만든다. 다음으로 SSB가 결합하여 풀어진 지역을 확장한다.



DNA 복제의 initiation 과정

초기의 origin 인식과 DNA unwinding은 앞에서 설명.

Figure 9.18

다음 단계는 DnaC와 DnaA-ATP의 도움으로 DnaB (helicase) hexamer가 풀어진 AT-rich 지역에 결합을 한다.

DnaB helicase는 5' → 3' 쪽으로 이동하면서 65nucleotide 정도를 풀어놓는다.

다음으로 두 개의 DnaG (primase)가 결합하여 RNA primer를 합성함.

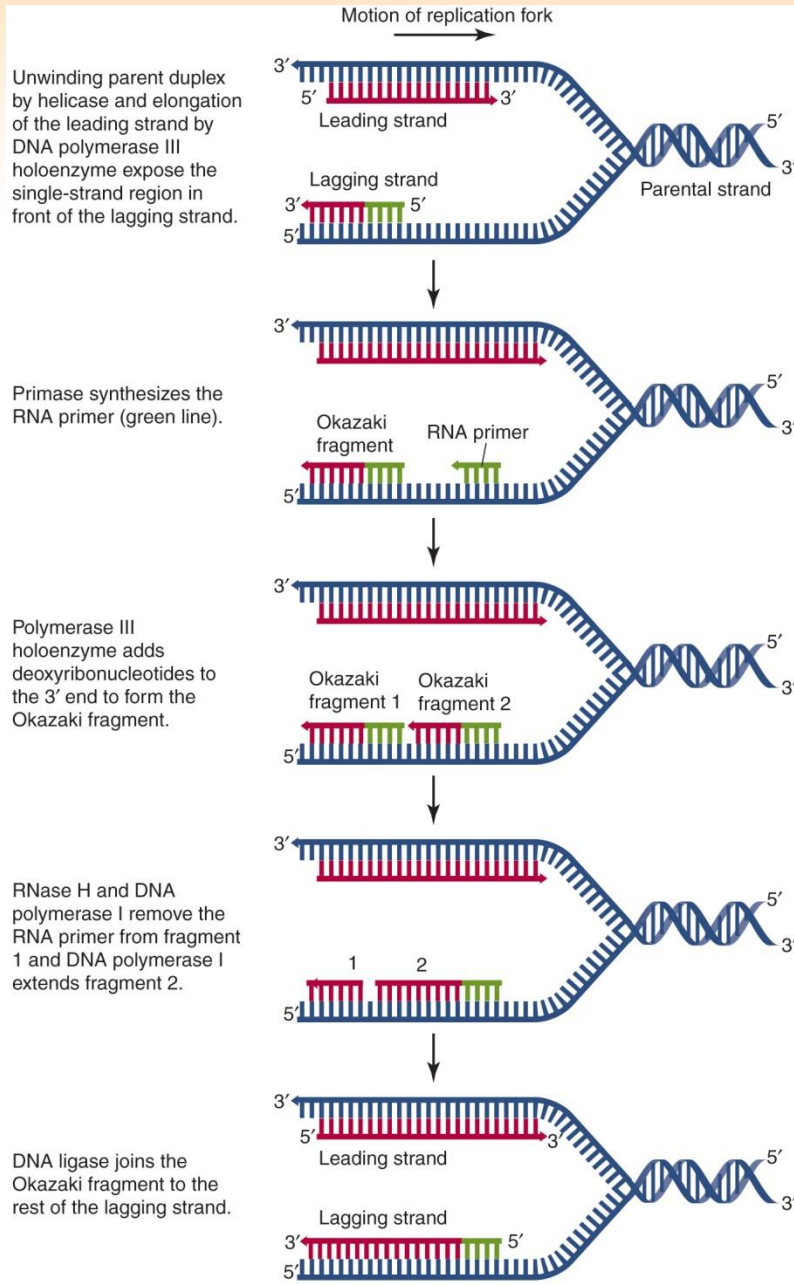
Initiation의 마지막 단계로는 DnaA-ADP를 DnaA box에서 제거하고 sliding clamp와 DNA 중합효소 III의 첨가임.

Initiation의 조절;

1) DnaA 단백질은 ATPase 활성을 갖고 helicase가 결합하면 활성을 나타냄. 그 산물이 DnaA-ADP는 ADP가 ATP로 전환 되지 않는 한 다시 작용을 못함.

2) *oriC* 내에 methylation 부위가 있어 parental strand와 새로 합성된 strand를 구분하게함. Hemimethylated *oriC* 지역에 SeqA 단백질이 결합하여 새로운 복제가 일어나지 못하게함

9.4 The stages of elongation



DNA 복제는 여러 다른 단백질이 협동해서 작용하는 복잡한 일이며 아주 빠른 속도로 새로운 DNA 사슬을 합성한다.

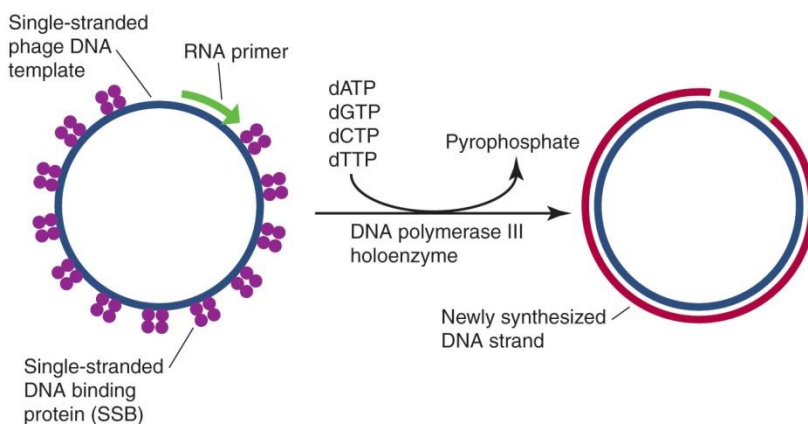
DNA polymerization III는 holoenzyme이며 DNA를 5'→3'으로 합성한다. 그러나 혼자 작용하는 것이 아니라 몇 개의 효소와 협동적으로 작용한다.

- **DNA Polymerase III**
 - bacterial replication machinery
- **DnaB**
 - helicase
 - uses energy from ATP hydrolysis to unwind dsDNA
 - moves 5'→3' along the lagging template strand
 - activates primase
- **DNA gyrase and topoisomerase I**
 - act cooperatively to relieve the torsional strain created by unwinding the double helix
- **Single-stranded binding protein**
 - coats the lagging strand template as helix is unwound by helicase

- **Primase (DnaG)**
 - catalyzes the formation of RNA primers for Okazaki fragment formation during lagging strand synthesis
- **Ribonuclease H (RNase H)**
 - removes the RNA primers at the 5' end of Okazaki fragments
- **DNA polymerase I**
 - extends the 3' end of the Okazaki fragment to the 5' end of the next fragment after primer removal
- **DNA ligase**
 - joins adjacent Okazaki fragments

DNA polymerase III

DNA polymerase I을 최초로 발견하였으며 초기에는 polymerase I이 유일한 중합효소라고 생각함. 그러나 *polA* (DNA polymerase I) 유전자가 돌연변이가 일어나도 DNA 합성이 계속되는 것을 보고 II와 III를 발견함. DNA 중합효소 III 유전자는 필수 유전자임.

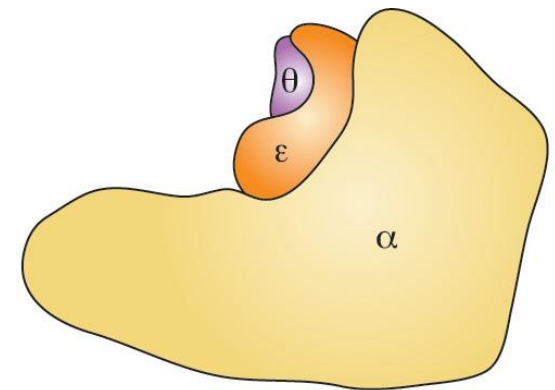


Processivity; DNA 합성 기간에 해당 중합효소가 얼마나 강하게 그리고 오래 DNA 주형에 결합되어있는가를 나타내는 값. DNA 중합효소 III은 holoenzyme으로 모든 subunit가 결합된 상태에서 강한 processivity value를 나타냄.

TABLE 9.2 DNA Polymerase III Holoenzyme

Component [Stoichiometry]	Gene	Molecular Mass in kDa	Comments
Core polymerase subassembly		166.0	Monomeric polymerase/ exonuclease
α [2]	dnaE	129.9	DNA polymerase
ϵ [2]	dnaQ	27.5	3'–5' exonuclease
θ [2]	hoIE	8.6	Stimulates ϵ exonuclease
Clamp loader subassembly		297.1	ATP-dependent clamp loader
γ/τ [1/2]	dnaX	47.5/71.1	τ and γ bind and hydrolyze ATP. τ binds the core polymerase and DnaB
δ [1]	hoIA	38.7	Wrench and binds β clamp
δ' [1]	hoIB	36.9	Regulates δ subunit
χ [1]	hoIC	16.6	Binds SSB
ψ [1]	hoID	15.2	Connects χ to clamp loader
Sliding clamp subassembly [2 dimers]	dnaN	40.6	Homodimeric processivity

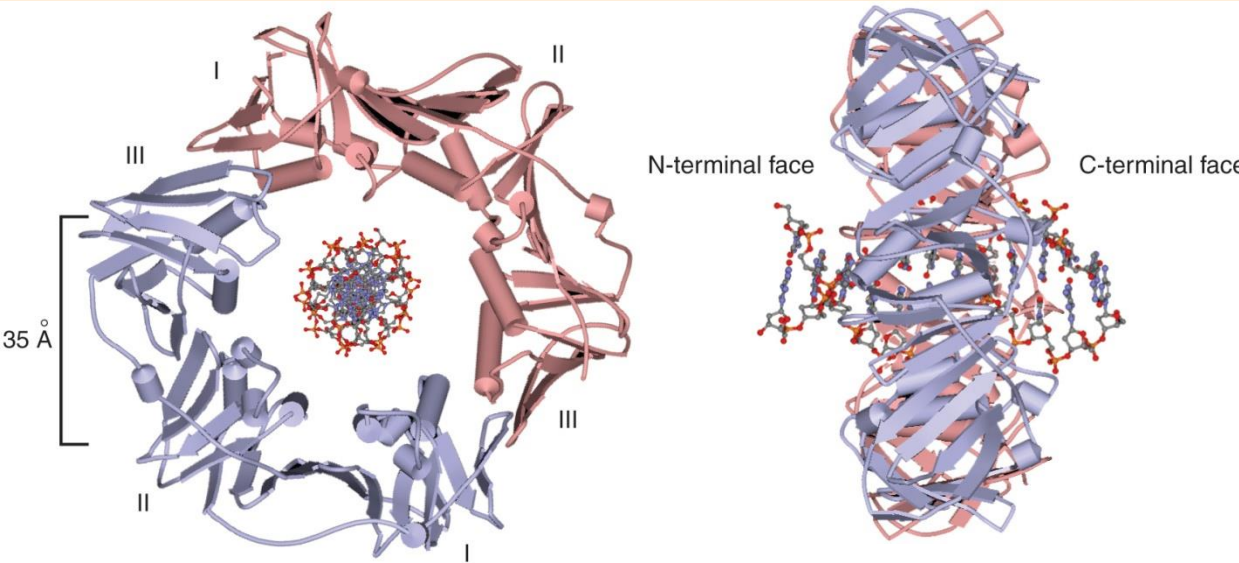
Data from Johnson, A., and O'Donnell, M., Ann. Rev. Biochem. 74 (2005):283–315.



- α subunit
 - catalyzes 5'→3' chain growth and is essential for DNA synthesis
- ϵ subunit
 - has 3'→5' exonuclease activity for proofreading
 - cells with defective ϵ subunit have high mutation rates
- θ subunit
 - may stimulate ϵ subunit but is not essential

The sliding clamp (β -dimer)

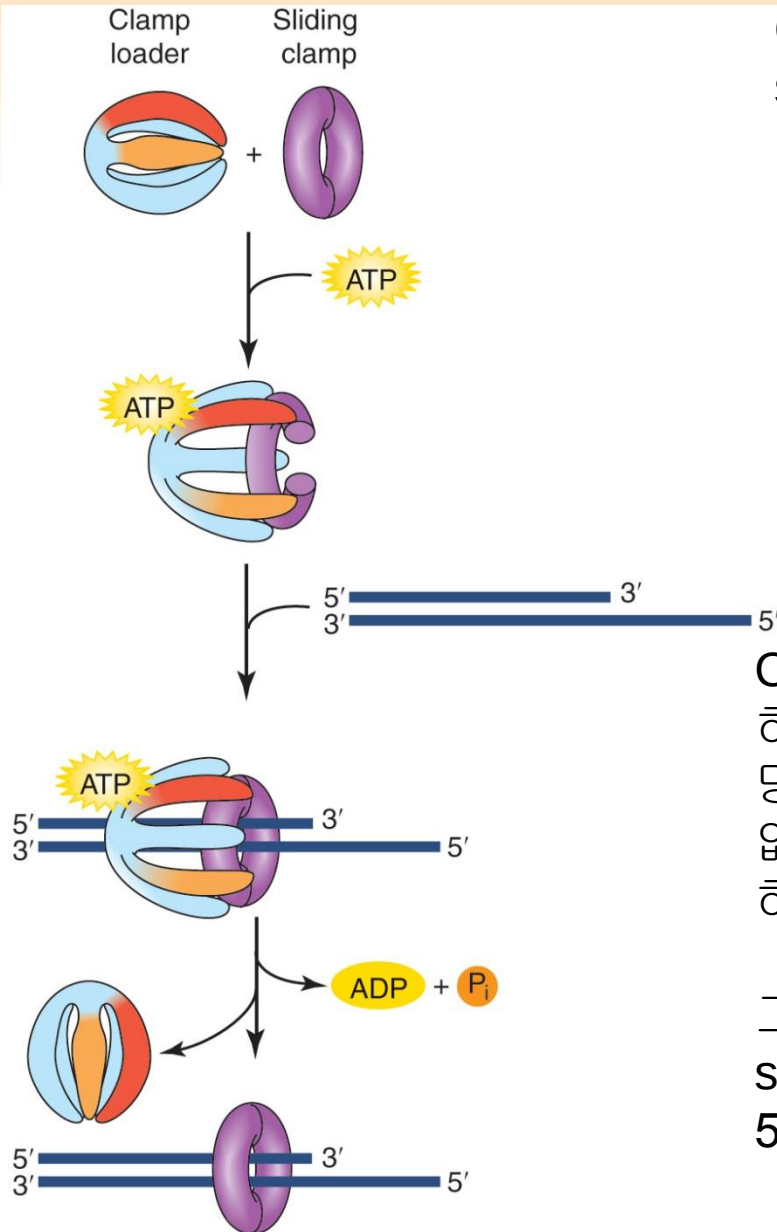
Figure 9.22



Sliding clamp는 β -dimer 혹은 β -clamp로 알려져 있으며 *dnaN* 유전자에 의하여 암호화 되는 두 개의 동일한 polypeptide로 구성. 이들이 head to head로 연결되며 각각 3개의 domain으로 구성됨.

- homodimer with semicircular subunits
- forms a ring with an inner diameter big enough to fit DNA double helix
직경이 3.5nm이며 DNA가 들어가기에 충분하다
- sufficient space between ring and DNA for one or two water layers
 - allows for sliding of clamp (ice skate를 타는 원리)
- carboxyl ends of subunits associate with remainder of holoenzyme
holoenzyme의 processivity를 증가 시킴

Clamp loader subassembly



Clamp loader는 5'-overhang을 갖는 주형 DNA에 sliding clamp를 load 하기 위하여 ATP를 이용한다. 중합효소 III의 일부분으로 존재하며 또한 free form으로 존재 하기도 한다.

Free form은 $\gamma_3\delta\delta'\chi\psi$ 이고 holoenzyme에 존재 할시 $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ 로 존재한다. γ 와 τ 는 동일한 *dnaX* 유전자에서 만들어지나 τ 는 전체 길이를 암호화한 것이고 γ 는 c-terminal의 1/3이 없다. C-terminal은 core polymerase와 DnaB helicase와 결합하는 중요한 부위이다.

Clamp loader를 연구하기 위하여 실험실에서 합성하여 $\gamma_3\delta\delta'$ 을 만들었으며 이를 mini clamp loader라고 명명함. 나머지 ψ, χ subunit는 clamp load에 관계가 없으며 ψ subunit는 clamp loader의 안정화에 기여하고 χ subunit는 SSB에서 primase를 분리한다.

그림; ATP가 clamp loader에 결합하면 loader가 sliding clamp에 강하게 결합한다. 이들 복합체는 5'-overhang DNA에 강한 친화력을 갖는다.

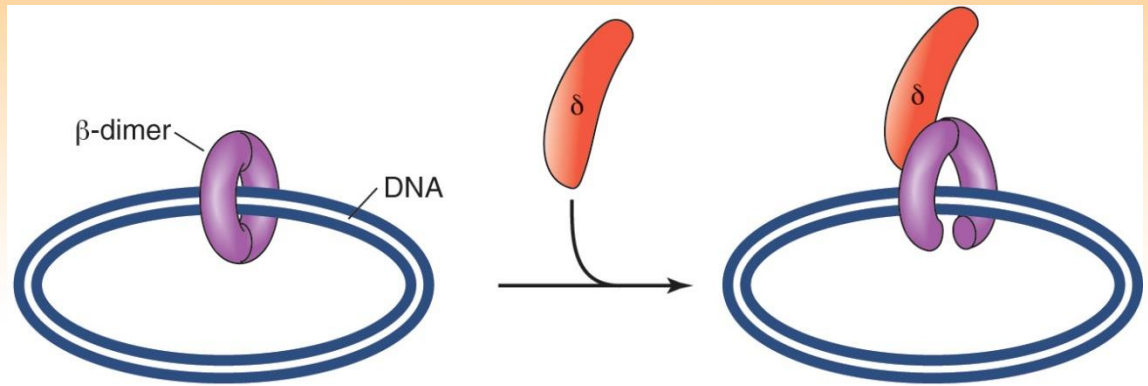
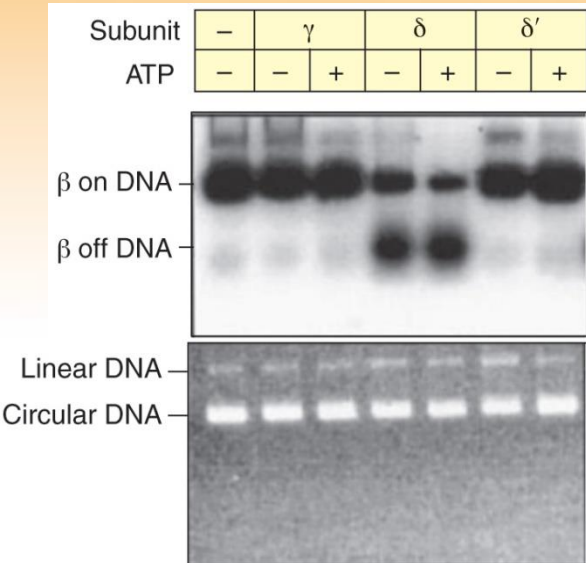
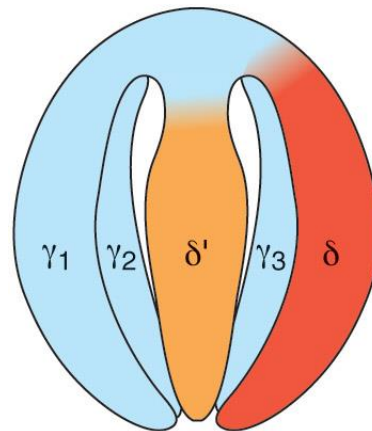
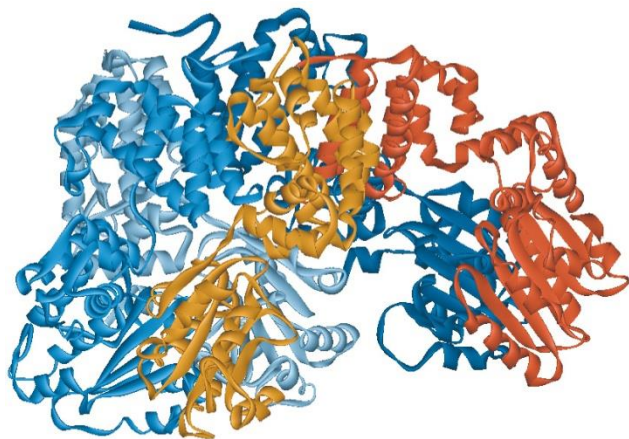


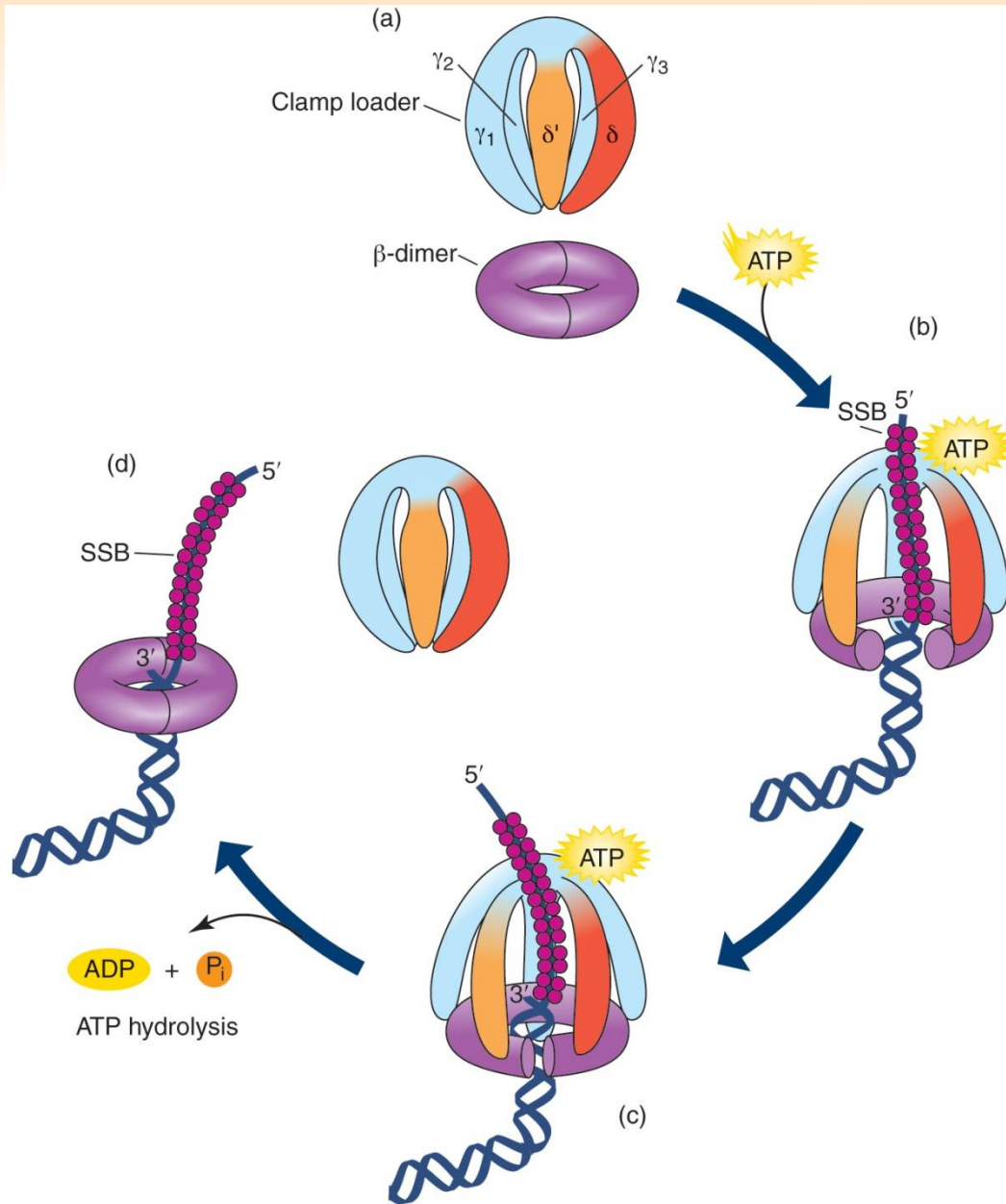
Figure 9.25

Miniclamp에서 각각의 역할을 조사 하고자 각 subunit를 분리하여 ATP의 존재와 비존재 하에서 실험을 행함. 그 결과 방사선 동위원소로 label된 sliding clamp를 이중 가닥 DNA에 load 한 후 각각의 subunit와 배양을 함. 그 결과 δ unit가 ATP가 존재하거나 안하거나 DNA로부터 sliding clamp를 방출함. δ unit은 β dimer의 연결된 면을 여는 wrench로 작용



Mini clamp loader의 구조

Clamp loading



γ subunit는 ATP에 결합하여 ATP를 hydrolyze하는 motor로 작용.

δ' subunit은 δ subunit의 반응을 조절함

(a) ATP가 없을 때 δ' 은 δ subunit과 가까이 위치하여 작용을 막음

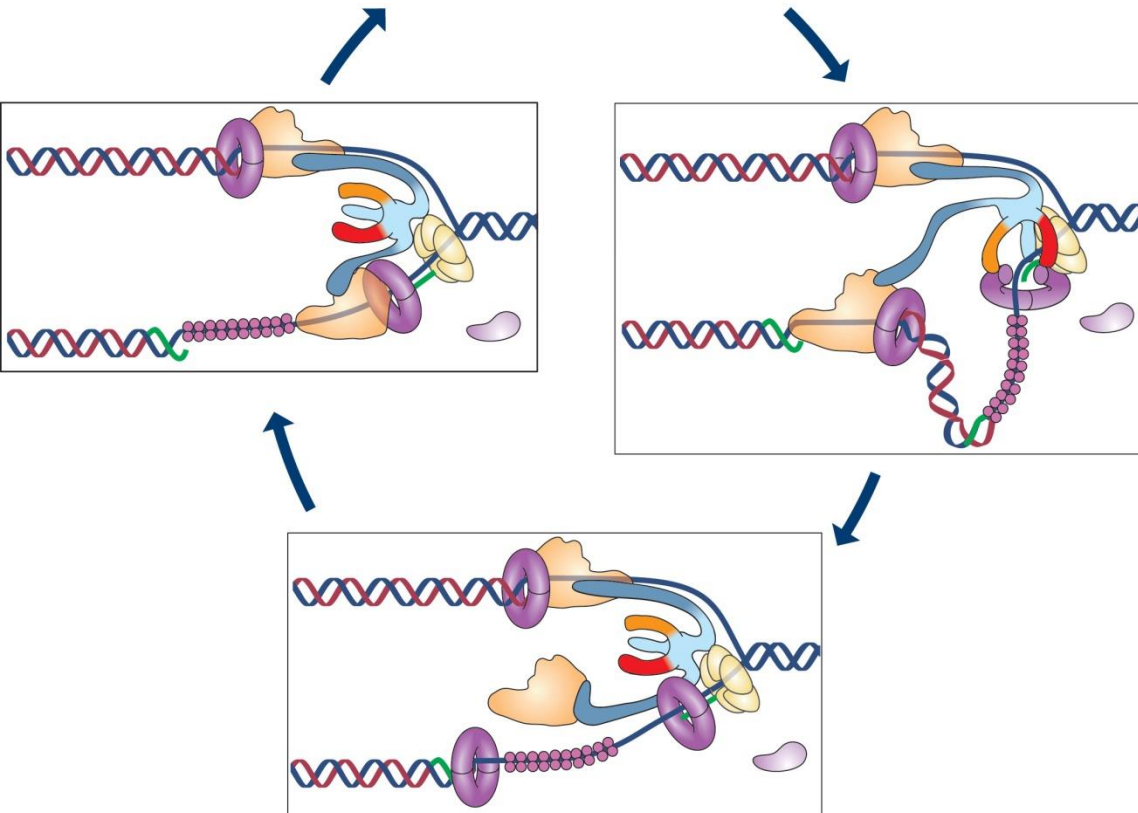
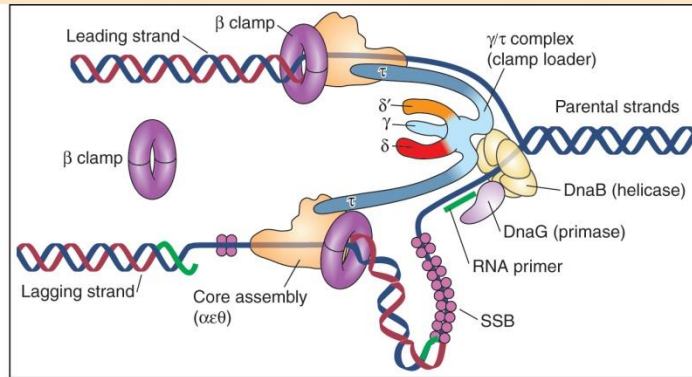
(b) ATP가 존재하면 γ subunit에 결합하여 형태적인 변화를 야기시켜 δ 가 β dimer (sliding clamp)에 결합하게 하고 이들은 5'-overhang을 갖는 DNA에 결합한다.

(c) DNA가 central cavity로 통과 한 것이 확인되면 ATP가 hydrolyze된다.

(d) δ unit는 δ' unit 근처로 이동하며 β dimer가 달린다. clamp loader가 떨어져 나오면 sliding clamp만이 DNA를 싸고 있으며 중합효소 III의 다른 core 부위와 반응을 한다.

Figure 9.26

Trombone model of replication



1980년 Bruce Albert가 trombone model을 주장함.

주형 DNA의 지연가닥은 각각의 okazaki fragment가 생길 때 고리를 만들며 이에 의해 지연 가닥과 선도가닥이 반대 방향으로 DNA를 합성을 해도 두 개의 core polymerase가 동시에 작용을 한다.

Primase (DnaG)가 약 10-12base의 RNA primer를 만듬. Primase와 DnaB helicase는 서로 관계를 맺음. 이때 clamp loader의 τ subunit에 의해 helicase의 활성이 증가함 χ subunit은 SSB와 primase를 분리하여 primase를 방출함. clamp loader가 앞에 배운 기작으로 β clamp를 load함. 다음으로 clamp loader가 떨어져 나오면 β clamp가 자유로이 core enzyme과 결합을 함.

Figure 9.27

9.5 Termination stage in Bacteria

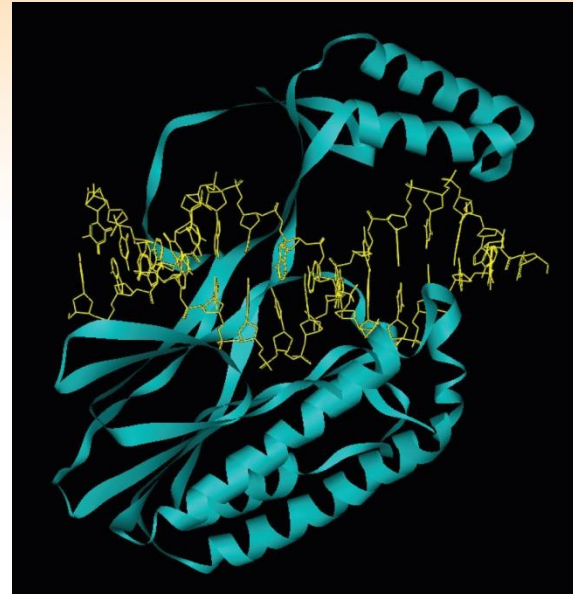
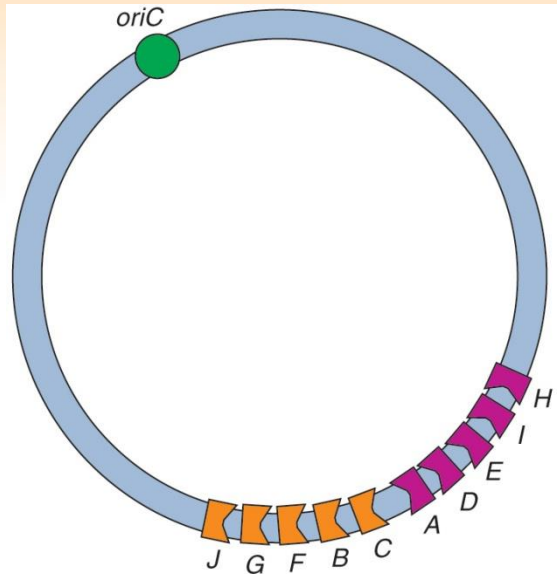
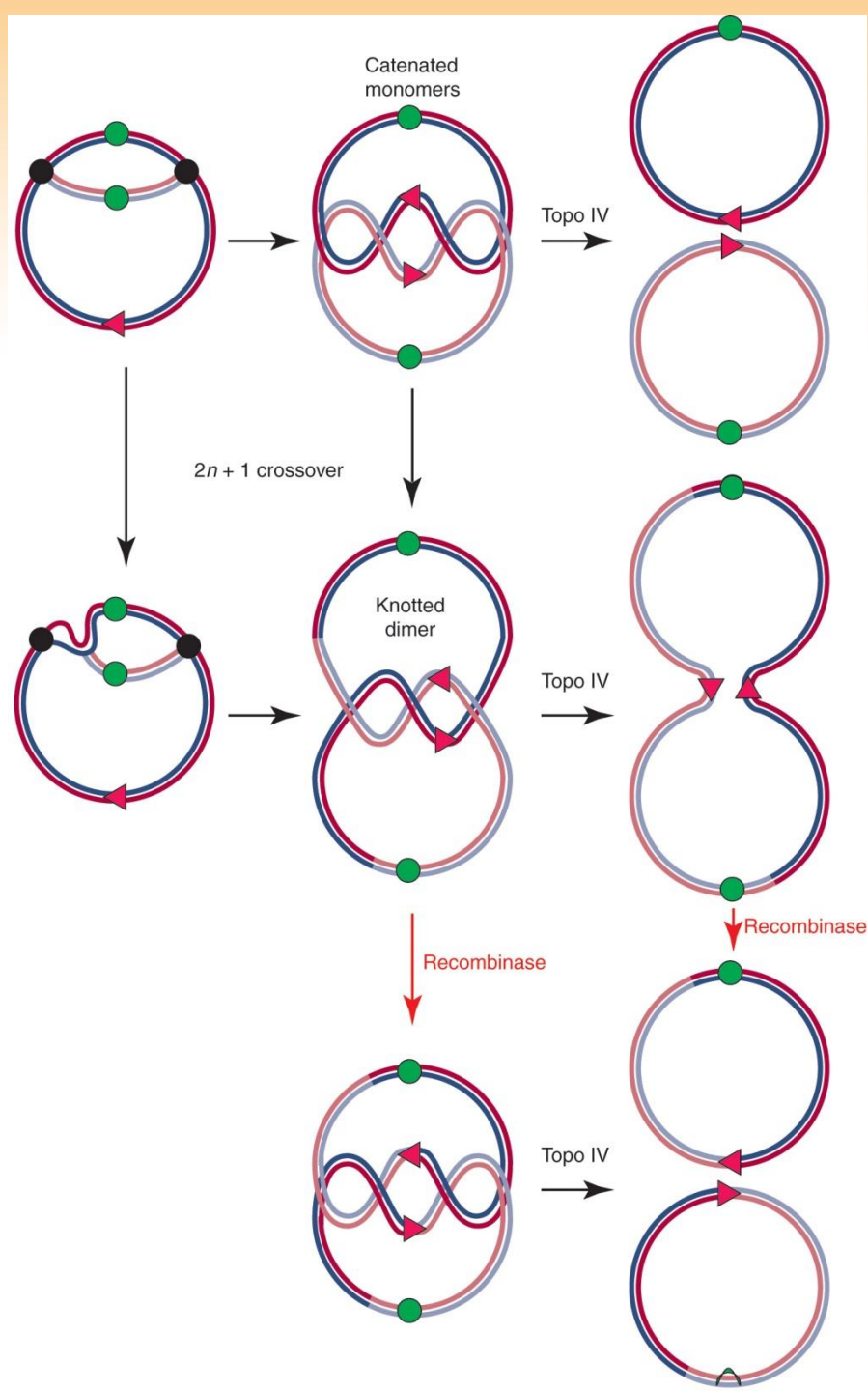


Figure 9.28, 29

두 개의 replication fork는 궁극적으로 염색체의 반대 쪽에 있는 termination region에서 만나 복제가 끝나고 결국 염색체가 분리된다. termination sites (*Ter* sites)가 중요하며 11bp의 conserved된 서열이며 양 방향으로 존재한다. 한 방향으로 존재할 때 동일 방향의 복제과정은 통과하나 반대 방향의 복제는 멈추게 된다. *E. coli*는 10개의 *Ter* site가 있으며 두 집단으로 모여있다. 그림 9. 28처럼 *TerC*, *TerB*, *TerF*, *TerG*, *TerJ*는 시계방향으로 움직이는 복제를 멈추게 하고 *TerA*, *TerD*, *TerE*, *TerI*, *TerH*는 반대 방향을 멈추게 함.

그림 9.29; Terminus utilization substance (Tus)이라는 단백질이 *Ter* 부위에 결합. Tus 단백질은 *Ter* 부위에 monomer로 부착하나 매우 강하게 결합하며 이들 복합체는 DNA 사슬을 푸는 DnaB helicase의 작용을 막음으로써 replication fork의 진행을 막음



Topoisomerase IV와 recombinase가 새로 형성된 낭 염색체를 분리 시킨다.

Topoisomerase IV는 catenated (interlocking rings) 된 것은 분리 시키지만 복제 기간에 홀수의 재조합이 일어나 공유결합으로 연결된 dimer를 만든 것은 분리 시키지 못한다. 이처럼 염색체가 분리가 안되면 낭 세포로 분리되어서 이동을 하지 못한다. 이 경우에는 recombinase가 termination 지역의 *dif*라는 특정 부위를 잘라서 dimer를 두 개의 염색체로 분리한다.

Figure 9.30

9.6 Eukaryotic DNA replication machinery

진핵 세포의 복제 기작은 원핵 세포의 복제 기작과 매우 유사하나 다른 점도 있다. 이곳에서는 첫째 *saccharomyces cerevisiae*의 복제 기작을 배우고 두 번째로는 simian virus 40 (SV 40)의 기작을 배우며 또한 약간 다른 진핵세포의 복제 체계를 배울것이다.

9.7 Initiation stage in eukaryotes

그림 8.34에서 보듯이 early region에서 발현하는 T antigen이 DNA 복제에 필요한 viral protein이며 early와 late 유전자 지역 사이에 있는 *ori*에 작용을 한다.

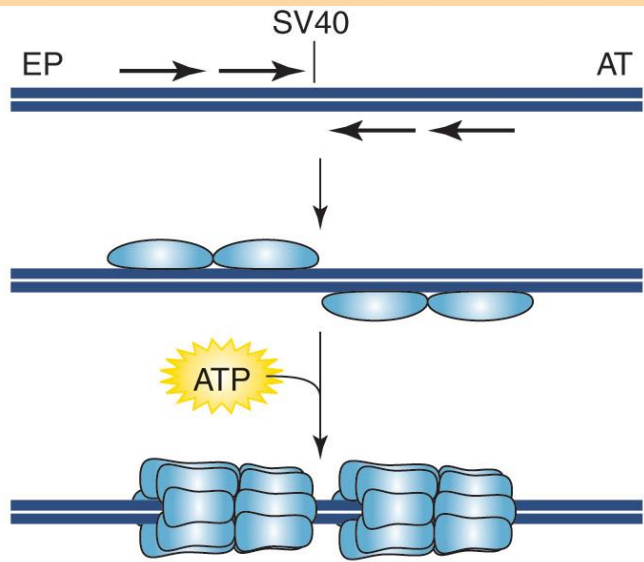
T antigen은 708 아미노산이며 아래 그림처럼 4개의 구역으로 나뉜다.

Figure 9.31

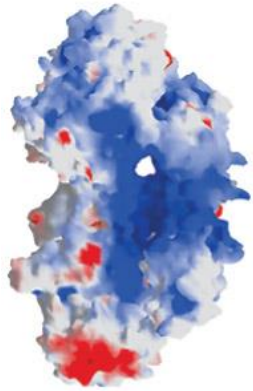


- origin binding domain (obd, 131-259 residue)은 *ori*를 인식하고 T antigen을 origin of replication으로 모으는 역할을 한다.
- helicase domain (265-626)은 DNA를 푸는 일을 함.
- DnaJ (1-82)domain participates in remodeling protein complexes

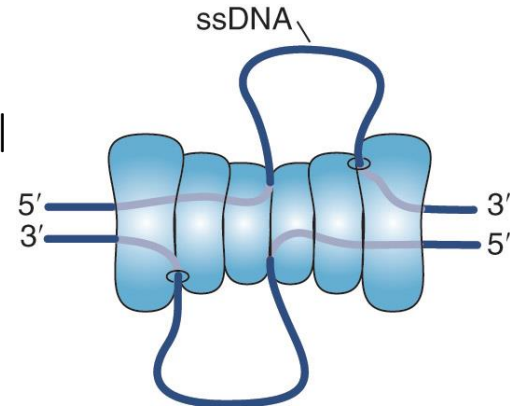
그림 9. 32에서 보듯이 monomer로 존재하나 작용 시는 hexamer로 모여서 작동한다.



SV 40의 replication origin은 약 300bp이나 그 중 64bp가 core sequence로 DNA 복제에 필수적인 부위이다. core sequence는 다시 3개의 지역으로 나뉜다. early palindrome (EP), T antigen 결합 부위를 포함하는 27-bp 지역, 17-bp의 AT-rich 지역이 존재함. 두 쌍의 T antigen이 core sequence내의 4개의 반복된 서열에 결합을 한다. ATP가 존재 할 때 각 쌍의 T antigen 분자는 이중 hexamer가 결합하는 전구체로 작용을 한다.



T antigen hexamer는 중앙에 커다란 방 (<68Åwide)과 벽에 구멍이 있어 가닥 분리가 일어 날 수 있다. 우측 그림은 가닥 분리가 일어나는 looping model임



초기의 replication bubble를 완성하기 위하여 replication protein A (RPA)와 SSB 복합체가 새로 만들어진 single strand 지역에 결합을 한다. RPA는 single strand가 다시 결합하거나 사슬 내에 이차 구조를 만드는 것을 막으며 T antigen과 interaction을 한다.

RPA와 T antigen은 DNA polymerase α -primase (Pol α)를 불러드린다.

Pol α 는 각 subunit에서 primase와 DNA 중합효소의 역할을 한다. Primase가 RNA oligomer를 8-10개를 합성하면 다음으로 DNA 중합효소 subunit가 DNA를 합성한다.

Eukaryotic chromosomes have multiple origins of replication

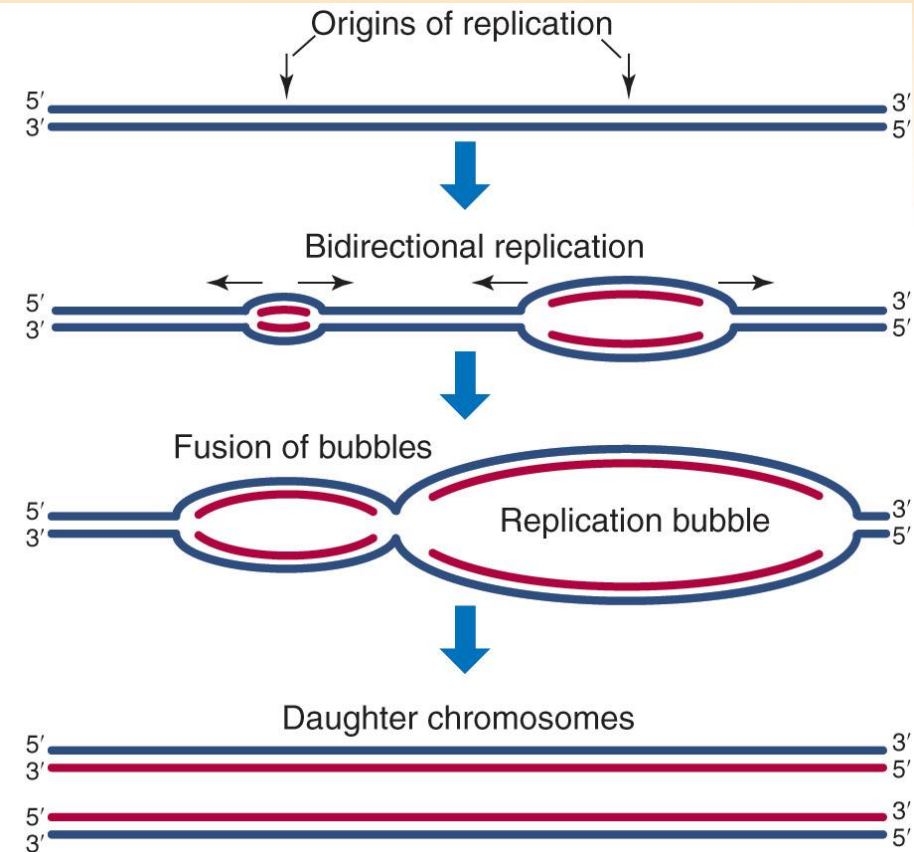
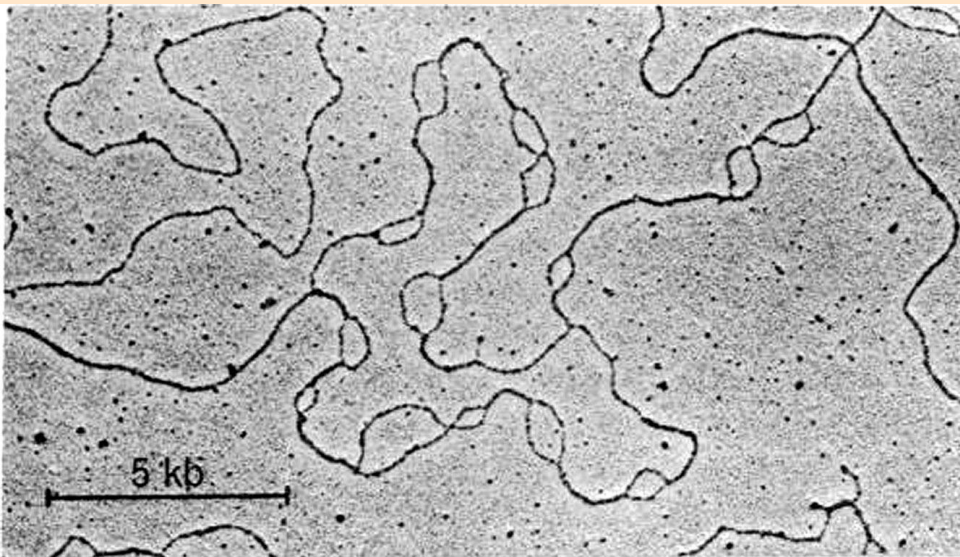
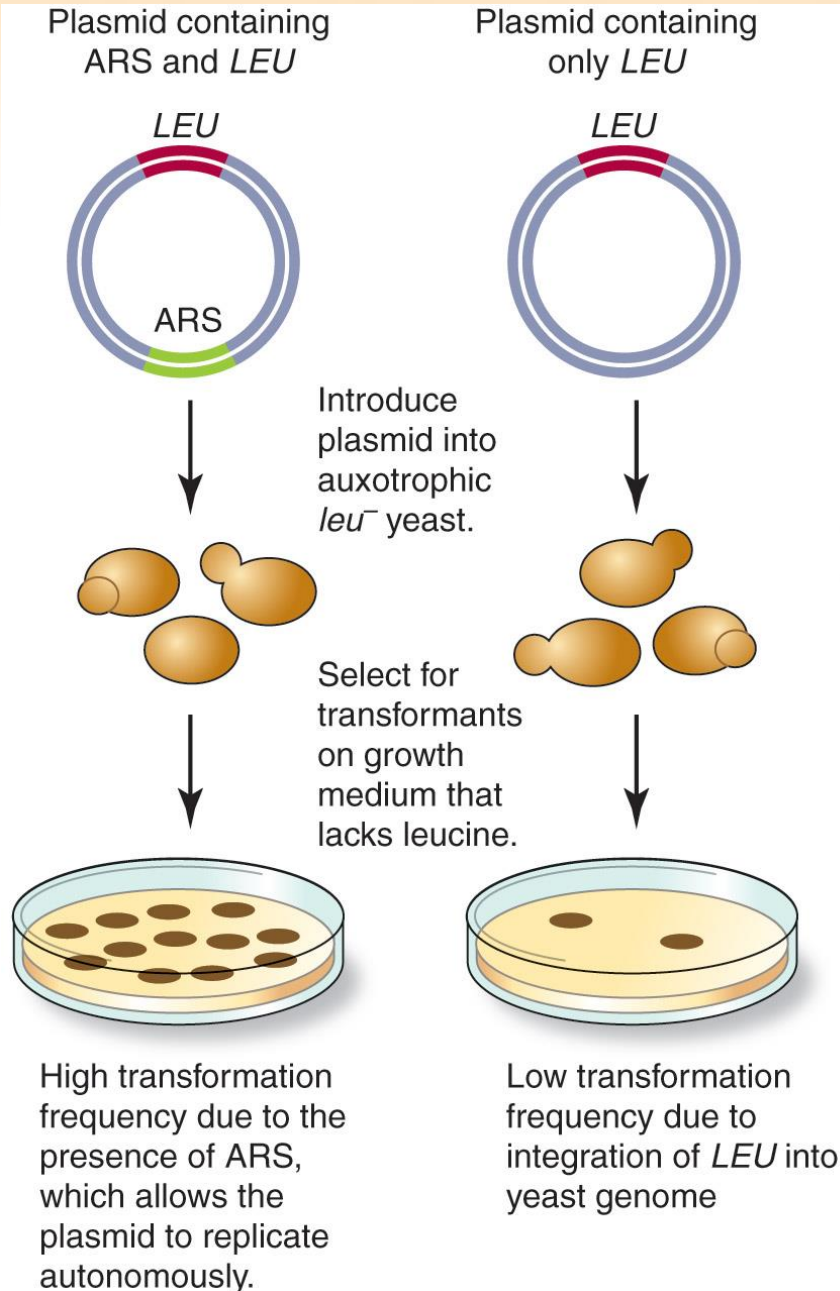


Figure 9.35

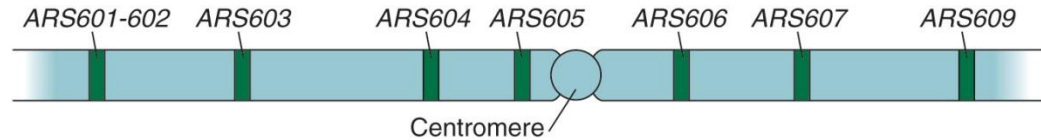
Long linear eukaryotic DNA 분자는 여러 부위에서 DNA 복제를 시작한다. 전자현미경 사진을 증거로 할 수 있다. 이들 간의 간격은 약 10 – 300kb정도 이며 양쪽으로 복제를 하면서 나중에는 이웃의 bubble과 만나게 된다. (그림 9.35)

Yeast ARSs

Figure 9.37



1980년 Ronald Davis는 효모의 autonomously replicating sequence elements (ARS element)를 발견함.
그림 9. 37에서 ARS element를 갖는 plasmid는 복제가 독립적으로 이루어지나 ARS가 없고 *LEU* 유전자만을 갖는 경우는 효모의 염색체 내로 *LEU* 유전자가 integration 되어만 살아남음



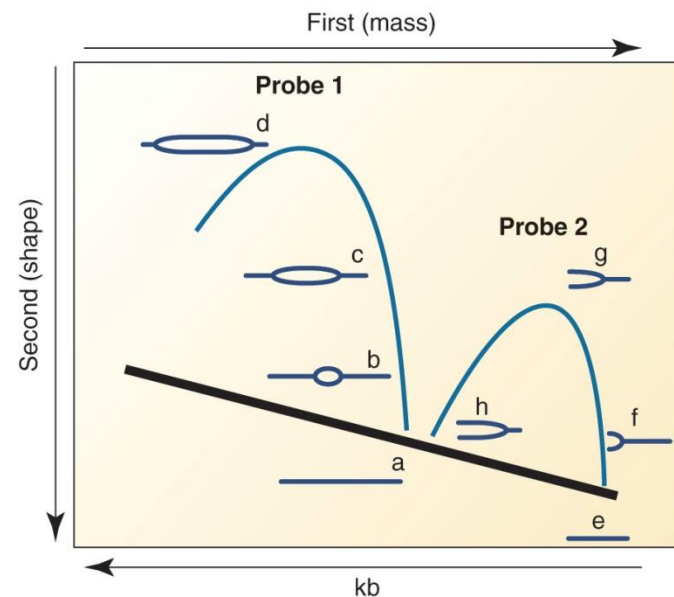
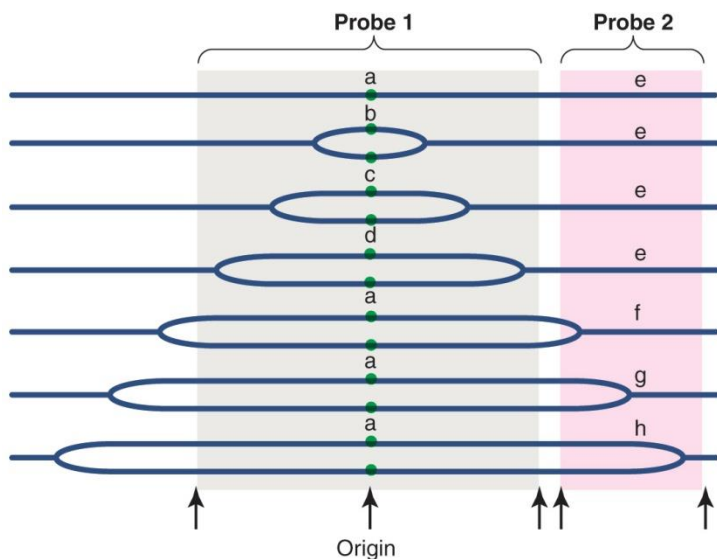
효모는 약 400개의 ARS를 갖고 있음. 반면에 고등 동물은 수천 개를 갖음.
위 그림은 효모 염색체 VI의 ARS를 나타냄
효모에 ARS가 여러 개 있는 이유는 박테리아보다 복제 진행 속도가 느리고 염색체가 크기 때문이다.

효모에서 *ARS1*과 *ARS307*이 많이 연구 되었다. (그림 9.39)

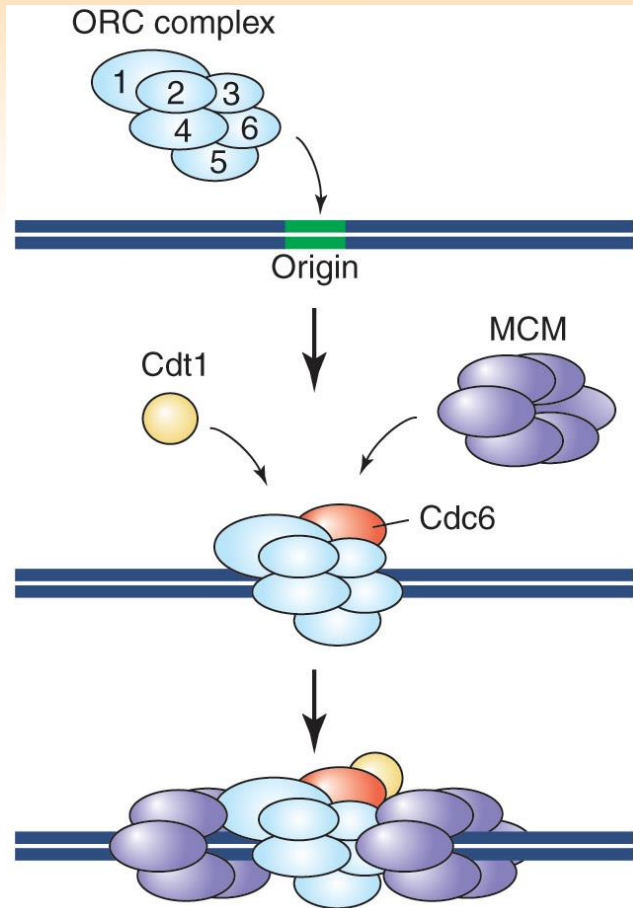
ARS element에는 11-bp element 5'-(A/T)TTTA(T/C)(A/G)TTT(A/G)-3'가 있으며 이를 A-element 혹은 ARS consensus sequence (ACS)라 하며 이 주위에 A/T rich 서열이 존재. A-element 뿐 아니라 주위의 서열도 ARS의 기능에 중요한 역할을 함. A- element 주위에 뚜렷한 기능이 있는 부위로 *ARS1*은 B1, B2, B3를 갖고 있고 *ARS 307*은 B1, B2를 갖고 있다. A-element와 B1에 효모의 initiator protein인 origin recognition complex (ORC)가 결합을 한다.

효모 중에서 *S. pombe*는 다른 서열을 갖고 몇 mammalian에서도 다른 서열을 갖고 있으며 아직 많은 연구가 되어야 한다.

Mapping origins using two-dimensional gels.



Initiation complex at the origin



복제 초기 단계에 ARS와 어떤 단백질들이 작용하는가를 조사함. Origin recognition complex (ORC)는 heterohexamer로 origin에 결합을 하고 Cdc6를 불러드린다. Cdc6는 Cdt1과 작용을 하며 MCM complex를 불러드린다.

- **ORC**
 - binds ARS elements
 - recruits other proteins to complex
- **Cdc6**
 - cell division cycle protein
 - helps recruit Cdt1
 - is degraded once initiation is complete
- **Cdt1**
 - recruits MCM to origin and to initiate S phase
- **MCM**
 - ATP-dependent helicase to unwind DNA

Figure 9.41

9.8 Elongation stage in Eukaryotes

진핵세포의 신장 과정은 매우 유사하며 이곳에서는 일반적인 것을 배울 예정임

TABLE 9.3

Proteins that Perform Analogous Functions at the Replication Forks

Function	<i>E. coli</i>	SV40/Human	Yeast
Helicase	DnaB	T antigen (SV40 specific)	MCM proteins
Primase	DnaG primase	Primase subunit of pol α -primase	Primase subunit of pol α -primase
Polymerase	α subunit of DNA pol III H.E.	pol δ	pol δ and pol ϵ both involved
Proofreading exonuclease	ϵ subunit of DNA pol III H.E.	Part of polymerase subunit of pol δ	Part of polymerase subunit of both pol δ and pol ϵ
Sliding clamp	β subunit	PCNA	PCNA
Clamp loader	$\gamma\tau$ complex	RFC	RFC
Single-strand DNA-binding protein	SSB	RPA	RPA

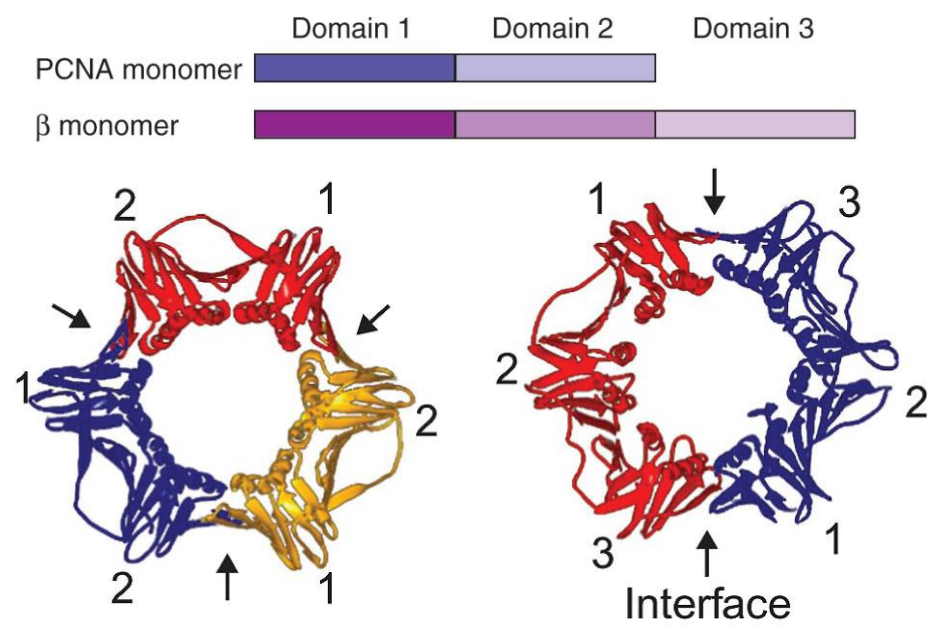
Abbreviations are: H.E., holoenzyme; Pol, polymerase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RF-C, replication factor C; RPA, replication protein A.

Adapted from Baker, T. A., and Bell, S. P., *Cell* 92 (1998): 295–305.

진핵세포의 복제에서 선도 가닥과 지연가닥은 서로 협동적으로 복제를 진행하나 이곳에서는 편의상 분리하여 공부를 한다.

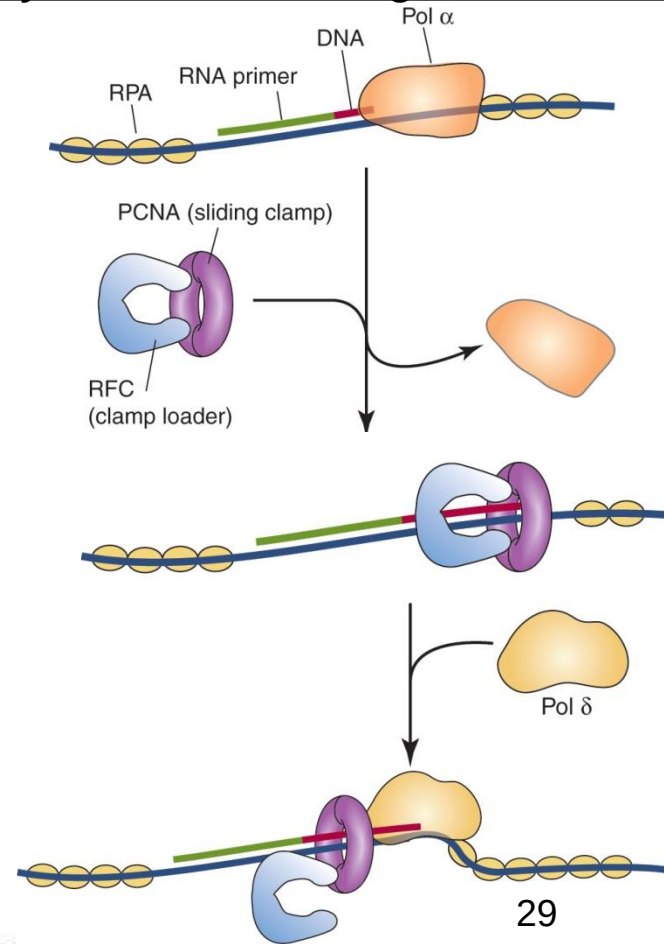
선도가닥 합성에 있어서 Pol α 가 initiator DNA를 합성하면 두 번째 중합효소인 DNA 중합 효소 δ (Pol δ)가 이어서 DNA를 합성한다. 포유류의 Pol δ 는 5'→3' polymerase activity와 3'→5' exonuclease activity를 갖고 있다. Pol δ 는 sliding clamp에 연결되어 DNA에 결합됨.

진핵세포의 sliding clamp는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)로 알려졌으며 박테리아와 유사한 4차 구조이나 3개의 단위체로 됨 (그림 좌측하단)



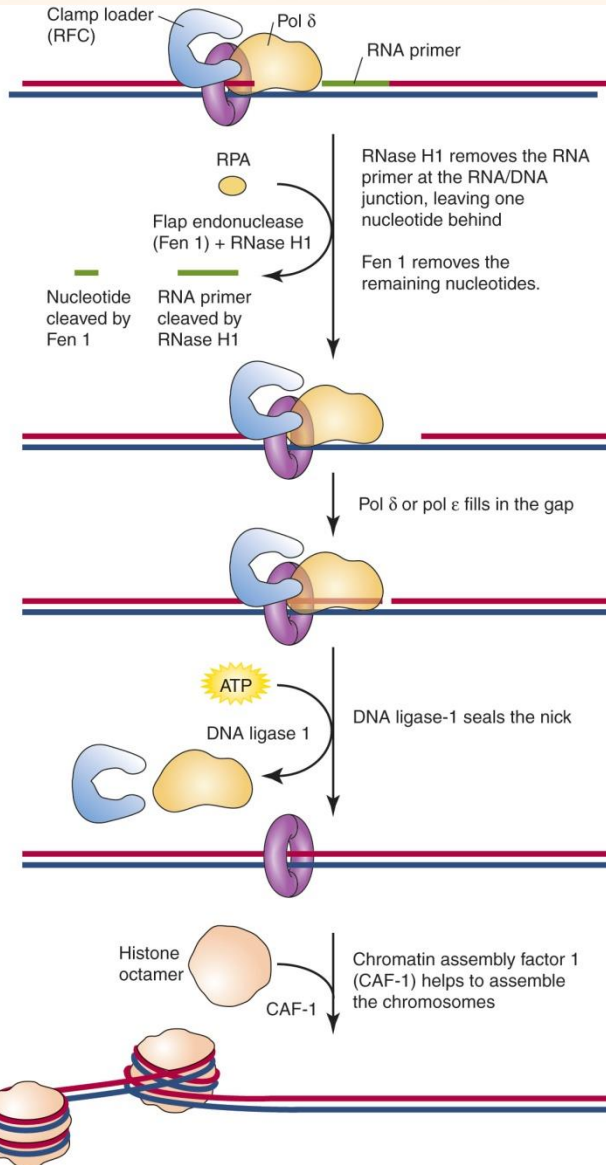
사람의 PCNA sliding clamp *E.coli*의 β sliding clamp

polymerase switching mechanism



Lagging strand의 복제

- 1) Okazaki fragment synthesis; replication bubble이 자라면 Pol α 가 지연 가닥 주형에 결합하여 initiator DNA를 합성. 이것이 Pol δ 와 교환되어 다음 DNA합성.
- 2) Okazaki fragment maturation; (그림 9.45)



Pol ϵ ; DNA replication에 관계하며 polymerase와 exonuclease의 역할을 모두 갖는다. 필수적이거나 때로 다른 효소가 대체하기도 한다.연구가 더 필요

그림 9.45; 지연가닥, 선도가닥의 복제를 요약

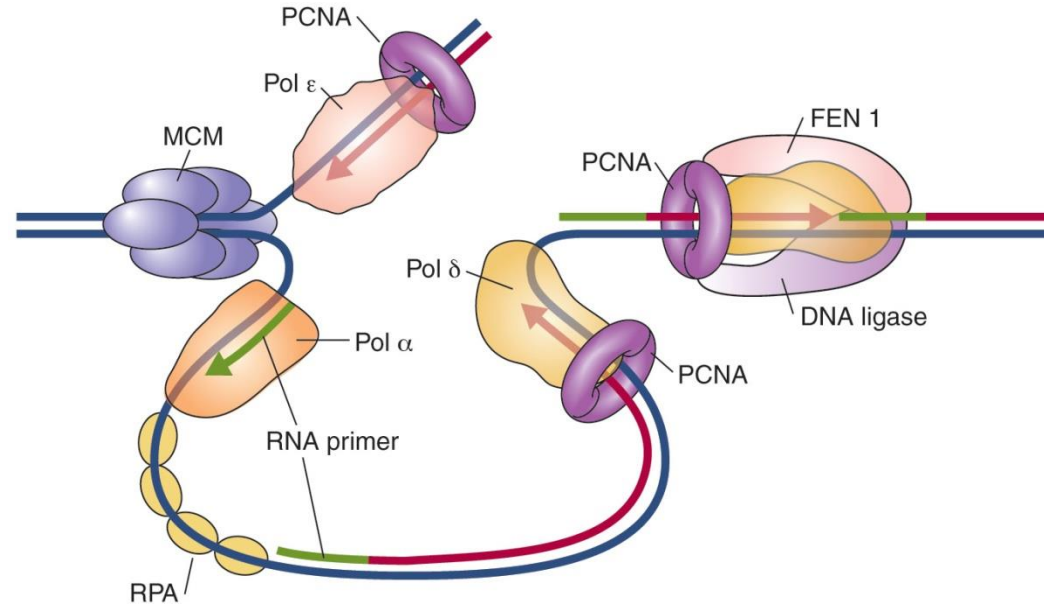
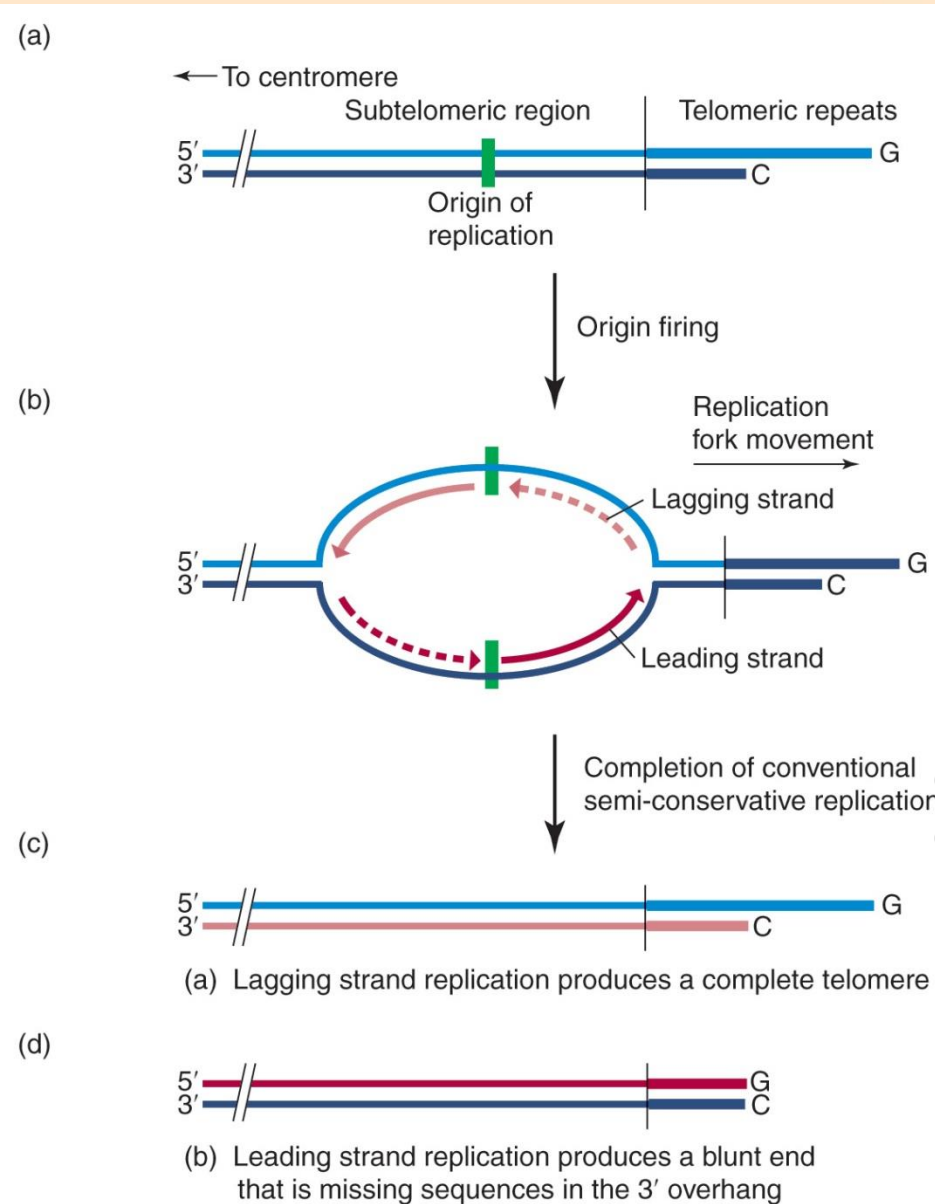


Figure 9.44

Figure 9.45
30

9.9 Telomeres and telomerase



linear duplex인 진핵세포의 염색체는 circular bacterial DNA 복제와 다른 문제점이 있다. 진핵세포의 염색체에는 telomere라고 하는 G가 많은 3'single overhang이 존재하기 때문

telomere의 구조가 밝혀지기 전에는 자연가닥 합성이 문제라고 생각. 즉 okazaki fragment의 끝 부분에 존재하는 RNA primer가 제거되면 C-rich 가닥이 짧아 질것으로 생각. 그러나 G-rich strand가 3' overhang이라서 문제가 안됨. 문제는 선도가닥의 G가 짧아지는 것이 문제임

C-rich strand는 자연가닥 합성에 의하여 조립.
G-rich strand는 선도가닥 합성에 의하여 조립.

telomere가 짧아지면 결국 염색체가 소실됨.
telomerase가 이러한 문제를 해결함.

Figure 9.46

Telomerase의 역할

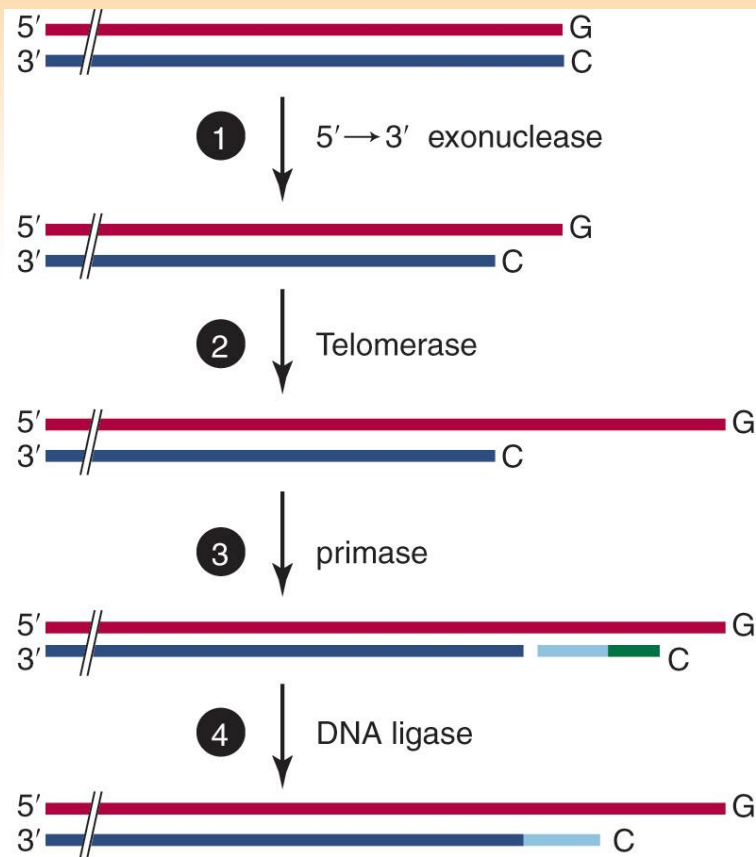
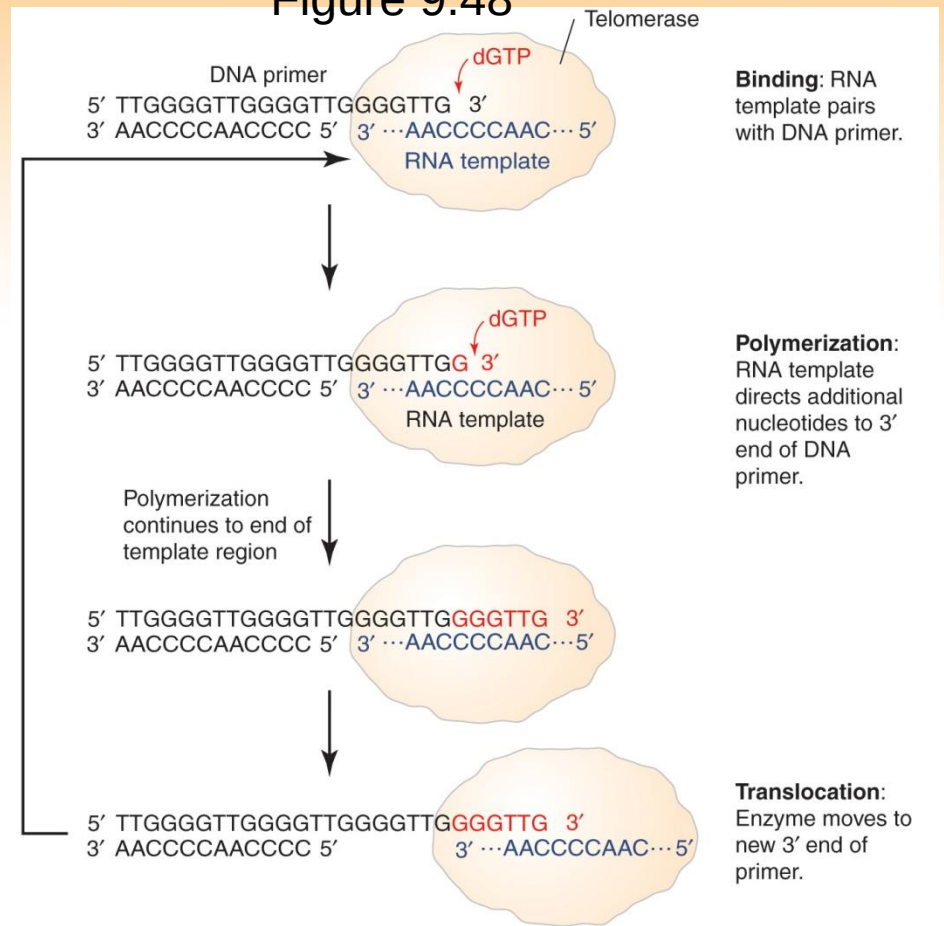


Figure 9.48



*Tetrahymena*의 telomerase에서 159개의 nucleotide RNA subunit를 분리하고 내부에 5'-CAACCCAA-3' 서열이 있음을 밝힘. 이 서열은 telomeric repeat인 d(TTGGGG)_n과 상보적임. 다른 생명체에서의 telomerase RNA의 서열은 각각 다를 지라도 해당 생명체의 telomeric DNA와는 상보적임. 이는 RNA가 telomeric DNA 합성의 주형으로 작용한다는 것을 의미함. 그림 9.48에 telomerase의 반응을 설명.

Telomerase는 암과 노화에 중요한 역할을 함. 일반적인 somatic cell은 몇번 분열을 하다가 senescence의 상태로 들어감. 그러나 germ-line cell이나 cancer는 계속적으로 분열32 이러한 현상은 telomerase와 밀접한 연관이 있다

9.10 DNA replication in the Archaea

처음에는 archaea의 복제가 원핵세포와 유사한 점이 있을 것이라고 생각하였지만 실제 연구 결과로는 진핵세포와 더 가까운 점이 많다. 그러나 일반적인 복제과정은 원핵, 진핵세포 에서와 동일하다. 즉 semiconservative, bidirectional, semidiscontinuous 함

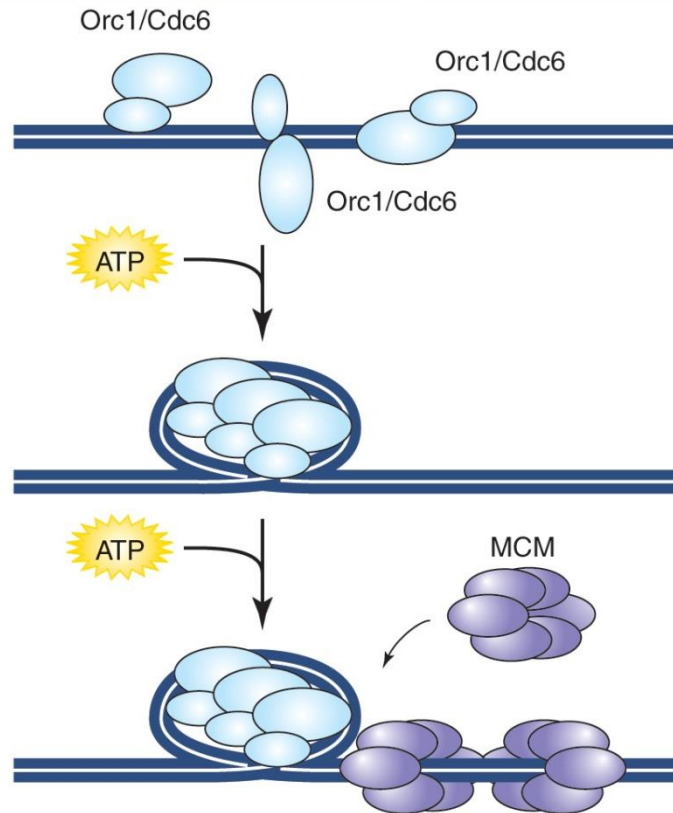


Figure 9.49

Initiation stage; Oric1/Cdc6 가 origin of replication에 결합하고 이들이 MCM을 불러드린다. MCM helicase는 이중가닥을 열고 풀어헤친다. 이곳에 RPA (single stranded DNA binding protein)가 결합하고 Primase가 RPA-DNA complex에 결합하여 짧은 RNA primer를 합성함. 다음으로 DNA 중합효소가 결합하여 DNA를 합성함.

Elongation stage; 박테리아나 진핵의 신장과정과 유사. 지연가닥과 선도 가닥이 협동적으로 복제를 한다. sliding clamp는 진핵세포의 PCNA와 유사하며 DNA 중합효소와 연결되어 processivity를 높인다. 두 가지 중합효소인 PolB와 PolD가 존재하며 어떤 종은 PolB가 없다. 진핵세포의 Fen-1과 Rnase H해당하는 효소가 okazaki fragment의 5' 끝의 RNA를 제거하고 DNA ligase가 fragment를 연결한다.