



酿酒酵母 DNA 复制的精确时空控制

刘路 楼慧强*

中国农业大学生物学院 农业生物技术国家重点实验室 北京 100193

摘要: DNA 复制是最基本的生命活动之一。DNA 复制本身的错误及其过程控制的异常是细胞内基因组不稳定的主要来源,会导致细胞生长异常、衰老、癌变乃至死亡。为了保证基因组 DNA 能够精确且完整的复制, DNA 复制受到严格的调控。在 G1 期, DNA 复制解旋酶的核心组分 Mcm2-7 复合体被招募到复制起点,获得复制许可资格。进入 S 期后,在两个周期性蛋白激酶及多个支架蛋白的作用下,复制解旋酶的激活因子 Cdc45 和 GINS 复合体被招募至 Mcm2-7,形成解旋酶全酶 Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 复合体。随后,众多复制相关蛋白在精准的时空控制下被招募至 CMG 平台并组装成复制机器,起始 DNA 双向复制。当相向而行的两个复制叉相遇,复制机器会从 DNA 链上解离下来,从而完成 DNA 复制。关于 DNA 复制过程的研究在近十年来取得了跨越式的突破。本文以酿酒酵母为例,围绕所有真核生物中都高度保守的 DNA 复制控制开关——CMG 解旋酶,对真核生物 DNA 复制的最新进展进行综述。

关键词: 酿酒酵母, 复制起始, 复制延伸, 复制终止, DNA 解旋酶

Spatiotemporal control of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Lu LOU Hui-Qiang*

State Key Laboratory of Agro-Biotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: DNA replication is one of the fundamental processes of all lives. Errors produced by DNA replication and abnormalities in its regulation are major sources of genomic instability in cells, leading to abnormal cell growth, aging, tumorigenesis and even death. In order to ensure accurate and complete duplication of genomic DNA, DNA replication is strictly regulated in all eukaryotes. In the G1 phase, the core component of the DNA replicative helicase—Mcm2-7 is recruited to the origins. This is called replication licensing. After cells entering the S phase, the helicase co-activators Cdc45 and GINS are recruited to Mcm2-7, forming the helicase holoenzyme Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) complex. Subsequently, numerous replicating proteins are recruited to the CMG platform under precise spatiotemporal control and assembled into a replication machine to initiate bidirectional replication. When two converging replication forks encounter each other, CMGs are displaced to terminate the progression of these forks. The last decade

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31630005, 31770084, 31628011)

*Corresponding author: E-mail: lou@cau.edu.cn

Received: 21-11-2018; **Accepted:** 18-01-2019; **Published online:** 23-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31630005, 31770084, 31628011)

*通信作者: E-mail: lou@cau.edu.cn

收稿日期: 2018-11-21; 接受日期: 2019-01-18; 网络首发日期: 2019-01-23

has witnessed the leap-forward breakthroughs in this field, particularly in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. Here, we summarize the recent advances in eukaryotic DNA replication with a focus on the motor of replisome, DNA helicase CMG.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Replication initiation, Replication elongation, Replication termination, DNA replicative helicase

欣欣向荣的地球时时刻刻都在孕育和繁衍新的生命。从简单的单细胞生物到高等动植物,所有生物体后代的生长繁衍都需要通过细胞分裂增殖。无论是无丝分裂还是减数分裂都离不开 DNA 复制这一基本生物学过程。为了保证遗传信息在传递过程中的准确性, DNA 复制需要受到严格精确的时空调控。真核生物 DNA 复制可分为 3 个过程: 复制许可——解旋酶核心组分的装载; 复制激活——解旋酶全酶的成熟与激活, 以及完整复制机器的组装和启动复制; 复制终止——解旋酶的卸载。解旋酶核心组分 Mcm2-7 是一个由 Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6、Mcm7 组成的异源六聚体, 简称为 MCM (Mini-chromosome maintenance protein, MCM)。解旋酶全酶是包含 Cdc45、MCM、GINS 的 CMG 复合物。复制许可过程发生在细胞周期的 G1 期, 而后的两个过程则被严格地控制在 S 期。尽管有多达数百个蛋白参与真核生物 DNA 复制, 可以看到 DNA 解旋酶是庞大 DNA 复制机器的核心——发动机。除了 DNA 聚合酶本身不可避免的错误掺入外, DNA 复制调控的异常也会导致基因组的不稳定。在一个分裂周期中, 基因组中的任何一个位置如果发生两次以上的起始都会导致基因组的二次复制(Re-replication)。这些二次复制产物可能会形成不稳定的染色体结构进而导致 DNA 断裂等^[1]。除了 DNA 复制激活阶段受到极为复杂严苛的控制外, 由于真核生物基因组本身较为庞大、重复序列较多、并具有 G4、异染色质和蛋白阻断等复杂结构, 在 DNA 复制行进、终止过程中也会面临比原核生物更为严峻的挑战。此外, DNA 复制期(S 期)是细胞周期中最脆弱的时期, 对细胞内外来源的 DNA 损伤都尤为敏感。因此, 真核细胞建立了一套完整的机制对 DNA 复制实现全程精确控制^[2-3]。

1 酿酒酵母 DNA 复制许可

在 G1 期 MCM 复合物被招募并装载到复制起点(Origin)处, 形成复制前起始复合物(Pre-replicative complex, pre-RC), 标志着 DNA 复制许可过程完成。2009 年, DNA 复制许可过程在体外得以重建, 确认该过程的完成需要起点识别蛋白复合物(Origin recognition complex, ORC)、Cdc6、Cdt1、MCM 的参与。另外, 通过电镜观察体外重建的 pre-RC 的结构发现, 在 pre-RC 复合物中, 两分子 MCM 在 DNA 上的朝向是相反的, 它们以 N 端相对的方式形成 MCM 双六聚体 (MCM double hexamer, DH), 环绕在双链 DNA (Double strand DNA, dsDNA) 上^[4-6]。这一独特的自我抑制构象完美解释了真核生物 DNA 解旋酶为什么在 G1 期没有解旋活性, 并暗示了真核生物与原核生物在双向复制模式上也有明显的区别。

1.1 DNA 复制起始位点

DNA 复制起始于基因组上特定的位点, 称之为复制起点(Replication origin)。酿酒酵母的复制起点是一段能够使质粒进行自主复制的序列, 称为自主复制序列(Autonomous replication sequences, ARS)。ARS 的长度约 100–200 bp, 具有序列特异性。ARS 包含一段高度保守的序列, 被称为 ARS 共有序列(ARS consensus sequence, ACS), 该序列是一段 11 bp 富含 AT 的序列, 是 ORC 的主要结合位点。除了 ACS 外, ARS 还包括 B1、B2、B3 这 3 个区域。其中临近 ACS 的 B1 区域包含一段富含 AT 的序列, 对于 ORC 的结合也很重要。B2 区域是复制解旋酶 MCM 的结合位点。B3 区域可以被 DNA 结合蛋白 Abf1 结合, Abf1 在转录过程中可以改变染色质结构, 参与核小体组装^[1,7-8]。

1.2 pre-RC 的装载

酿酒酵母中, pre-RC 的组装发生在每一个 ARS 处, pre-RC 中两分子 MCM 的装载是分两步完成。目前, 关于第一分子 MCM 的装载研究比较清楚。在 MCM 装载过程中, 最早与复制起点结合的蛋白是 ORC 复合体。随后, 复制起始因子 Cdc6 与 ORC-DNA 复合体相结合。在酿酒酵母中, Cdt1 可以与 MCM 共纯化, 该复合体中的 Cdt1 与 Orc6 有相互作用, 另外 Mcm3 的 C 端与 ORC-Cdc6 的也可以相互作用。依赖于这些相互作用, Cdt1-MCM 以七聚体的形式被共同招募到 Cdc6-ORC-DNA 上, 形成 ORC-Cdc6-Cdt1-MCM (OCCM) 中间体。在体内 OCCM 是一个极其短暂的状态, OCCM 中 MCM 处于开环的状态^[9-11]。而后, Cdc6 以依赖于 ATP 的水解的方式离开 ORC 复合体^[12]。接着, MCM 水解 ATP 促使 Cdt1 也从 OCCM 复合体中离开。这个过程伴随着 MCM 环的关闭^[13], 促使 MCM 环绕在双链 DNA 上。至此, 第一拷贝的 MCM 装载完成^[7,14]。

目前, 关于第二拷贝的 MCM 招募机制尚存争议^[7]。关于第二拷贝 MCM 的招募机制存在两种可能。其中, 一种是 One-ORC 的招募机制。该机制认为每一分子的 MCM 都是单独被招募的; 每一分子的 MCM 招募都需要 Cdc6 和 Cdt1 的帮助以及 MCM 招募后 Cdc6 和 Cdt1 的解离。但是, 两分子的 MCM 招募仅需要一分子的 ORC, 在第一分子 MCM 被招募后, ORC 依然停留在复制起点的位置, 第二分子的 MCM 通过其 N 端与第一分子的 MCM 的 N 端相互作用而被招募。当第二分子的 MCM 被招募后, ORC 会迅速从复制起点消失。另一种是 Two-ORC 的招募机制。这种机制的提出是因为当对 Mcm3 的 C 端进行突变, 使其不能够与 ORC-Cdc6 结合时, 不仅第一分子 MCM 的招募受到抑制, 第二分子 MCM 的招募也受到了抑制。这与 One-ORC 招募机制中, 第二分子的招募依赖于 MCM 之间 N 端的相互作用不相符。暗示着 MCM 与 ORC-Cdc6 的相互作用对于第二分子 MCM 的招募也是必要的^[15]。另外, 通过体外 pre-RC 重建系统进行的研

究结果显示, MCM 有效的装载需要两个 ORC 结合位点^[16], 且不管是体内还是体外, 这些 ORC 结合位点的朝向对于 MCM 的装载很重要。说明 pre-RC 的有效招募需要两个 ORC。这两种模型是否适用于不同的复制起始位点, 还需要进一步的探索。

2 酿酒酵母 DNA 复制起始

2.1 pre-IC 的组装

细胞进入 S 期, pre-RC 复合体中的 MCM 会被激活, 形成两个具有解旋酶活性的 CMG 复合体, 起始 DNA 双向复制。此时, pre-RC 的装载过程会被抑制。在解旋酶激活过程中, 有两个周期性蛋白激酶发挥了重要作用。首先是 DDK (Dbf4-dependent kinase) 激酶在 G1 期的末期 S 期的早期对 MCM DH 进行磷酸化, 进而促进了 Sld3 和 Cdc45 的招募, 形成 Cdc45-MCM-Sld3 (CMS) 复合体。在该过程中本课题组对于 Sld3 的招募过程进行了研究。首先, 通过体外 Pull-down 实验发现, Sld3 可以与 Mcm2 以及 Mcm6 的 N 端直接相互作用。进一步通过酵母双杂交实验找到了 Sld3 和 Mcm6 相互作用的位点。不管是通过对 Mcm6 的 N 端氨基酸进行缺失还是对 Sld3 的互作位点进行突变来破坏二者的相互作用, 都会导致细胞周期不能正常行进, 细胞死亡。这说明该相互作用对于 Sld3 的招募是必需的。在体内, 也能够检测到 Sld3 与 MCM 有相互作用, 且该相互作用依赖于 DDK 对 MCM 的磷酸化。当 DDK 缺失导致 MCM 不能够被磷酸化时, MCM 与 Sld3 的相互作用消失, 同样会导致细胞周期无法行进, 细胞死亡。以上结果说明, 当 DDK 磷酸化 MCM 后, Sld3 通过其特定的碱性氨基酸残基与被磷酸化的 MCM 的 N 端相互作用, 进而被招募到 MCM 上^[17]。该结论同时也被 Diffley 实验室的体外重建体系所证实^[18]。紧随其后, S-CDK (S-cyclin-dependent kinase) 激酶通过磷酸化 Sld2, 促进 Sld2、Dpb11、DNA 聚合酶 Pol ϵ 和 GINS (Go-Ichi-Ni-San, 由 Sld5、Psf1、Psf2 和 Psf3 组成) 形成装载前复合物

(Pre-loading complex, pre-LC)^[19]。同时, S-CDK 还磷酸化了 Sld3, 磷酸化的 Sld3 可以与 Dpb11 相互作用, 进而将 pre-LC 招募到复制起点, 最终形成起始前复合体(Pre-initiation complex, pre-IC)^[20]。虽然对于 pre-IC 的组装过程有比较深入的了解, 但是其具体步骤仍然不清楚。如, pre-IC 的具体组分和构象是怎样的? Cdc45 为什么与 Sld3 以相互依赖的方式被招募到 MCM DH 上? CMS 的构象是怎样的? 这些问题的答案需要继续探索研究。

2.2 解旋酶 CMG 的激活

不管是体内还是体外实验都显示, pre-IC 的组装不能起始 DNA 复制。只有在复制起始因子 Mcm10 的作用下, 解旋酶 CMG 才能够被激活, 起始 DNA 复制。在众多复制起始因子中, Mcm10 的功能是最不清楚的。2012 年的三篇相关研究报道均证实体内, Mcm10 的缺失将会导致 DNA 复制起始失败^[21-23]。在体外重组的 DNA 复制体系中, 当不加入 Mcm10 蛋白时, DNA 复制无法起始^[24]。Mcm10 在 DNA 复制起始过程中是怎样发挥功能的呢? 本课题组针对这一问题进行了研究。与前人结果相同, 当 Mcm10 缺失时, 细胞周期不能正常进行, 细胞死亡。由于 Mcm10 的缺失不影响 pre-IC 的形成, 实验检测了 MCM DH 的分离情况, 发现 Mcm10 缺失会抑制 MCM DH 的分离。在探究 Mcm10 与 MCM DH 分离过程的关系时发现, 在体内 Mcm10 与 MCM 有相互作用。通过分离细胞的染色质组分和非染色质组分发现, Mcm10 与 MCM 的相互作用仅发生在染色质组分中。进一步对不同时期的细胞进行检测发现 Mcm10 与 MCM 的相互作用还受细胞周期的调控。在 G1 期, 会有少量的 Mcm10 结合到 MCM 上, 随着细胞进入 S 期会有更多的 Mcm10 被招募到 MCM 上。该结论后续被 Diffley 实验室在体外重建体系中验证^[25]。接着通过体外 Pull-down 实验发现, Mcm10 与 Mcm2、Mcm4、Mcm6 的 N 端均有直接的相互作用。Mcm10 单独的 C 末端 107 个氨基酸就能够与 Mcm2 直接相互作用。而在体内当 Mcm10 C 端缺失时, Mcm10 与

MCM 的相互作用消失。此时, 细胞周期行进减慢, 细胞表现出生长缺陷, 且 MCM DH 的分离变慢。而通过 GFP、GBP 将 Mcm10ΔC 与 MCM 人为的融合在一起时, 细胞周期行进减慢及细胞生长缺陷均被回补。这充分说明, Mcm10 功能的发挥依赖其 C 端与 MCM 的相互作用^[26]。到 2018 年, Diffley 实验室通过体外实验发现, 在 CMG 组装过程中 dsDNA 会发生最初始的一环解旋(Untwist), 此时 MCM 与 ATP 结合。而随后 dsDNA 的解旋则需要 Mcm10 和 ATP 的水解^[27]。尽管目前关于 MCM10 在 CMG 解旋酶的激活过程有一定的了解, 但其具体过程仍然不清楚。如 Mcm10 在 G1 期就与 MCM DH 结合, 作用是什么, 此时 MCM DH 为什么没有解离? 到 S 期时, Mcm10 到 MCM DH 上的招募为什么会增多, 作用是什么? MCM DH 在什么条件下解离, 此时 MCM DH 上除 Mcm10 外是否还有其它复制起始因子, 这些复制起始因子处于什么状态? MCM 是如何从环绕 dsDNA 变为环绕 ssDNA 的? 这些问题的解决有助于进一步了解 DNA 复制起始的机制, 需要后续的研究和探索。

2.3 DNA 复制时序

尽管在 G1 期, 每个 ARS 处都会有 pre-RC 的组装。但是在 S 期, 仅部分复制起点会被起始复制, 且不同的复制起点复制起始的时间不同。有些复制起点在 S 期早期就起始复制, 称为早期复制起点; 有些复制起点则在 S 期的中后期才能起始复制, 称为晚期复制起点。这一现象叫做 DNA 复制时序(Replication timing)。参与 DNA 复制起始因子的分子数在体内的含量不一, 有些因子的分子数低于复制起点的个数, 如 Sld2、Sld3、Cdc45 等, 被称为限量因子。在复制起始过程中, Sld3 和 Cdc45 的招募依赖于 DDK 对 MCM 的磷酸化。有研究表明, DDK 会优先结合于早期复制起点, 起始 DNA 复制。DDK 是如何优先结合于早期复制起点的? 针对这一问题, 本实验室也做出了研究。实验发现, 不管在体内还是体外, DDK 的调节亚基 Dbf4 均与转录因子 Fkh1、Fkh2 有直接相互作用。当 *FKH1* 和 *FKH2*

被敲除, DDK 在早期复制起点的招募会受到影响, 且 DNA 复制时序紊乱。这表明 Fkh1、Fkh2 参与 DNA 复制时序的调控。进一步, 通过酵母双杂交实验找到了介导 Dbf4 与 Fkh1 相互作用的区段是 Dbf4 的 C 端。当通过缺失 Dbf4 的 C 端来破坏该相互作用时, DNA 复制时序紊乱。而当 Dbf4 Δ C 与 Fkh1 的 DNA 结合结构域 Forhead 融合表达时, DNA 复制时序恢复。由此说明, 在 DNA 复制起始过程中, Fkh1/Fkh2 通过促进 DDK 在早期复制原点的招募使得早期复制原点处的 pre-RC 复合体被激活形成 CMG 复合体, 进而在 S 期早期起始复制^[28] (图 1)。这项工作首次证明转录因子以完全不依赖其转录功能的方式直接参与 DNA 复制的调节。我们的工作还表明, 在诸多此前报道的限量因子中, Dbf4 招募本身就足以决定复制时序, 其它限量因子的招募是其继发事件。更有意思的是, 全基因组复制时序图谱表明, Dbf4 在着丝粒附近的早期复制起点不由 Fkh 转录因子决定, 而是由此前报道的 Ctf19 复合体介导^[29]。这些工作较为完整地解释了不同染色体环境中, 酵母基因组 DNA 复制时空调控机理。

2.4 酿酒酵母 DNA 复制延伸

复制解旋酶被激活后, DNA 双链被打开, 为 DNA 复制提供了模板链。行使 DNA 复制功能的是一个巨大的复合体, 称为复制行进复合体(Replisome progress complex, RPC)。该复合体中包含负责打开 dsDNA 的复制解旋酶全酶 CMG、负责引物合成的

DNA 聚合酶/引发酶 Pol α (由 Pol1、Pol12、Pri1、Pri2 四个亚基组成)和负责前导链合成的 DNA 聚合酶 Pol ϵ (由 Pol2、Dpb2、Dpb3、Dpb4 四个亚基组成)。除 DNA 复制相关的酶以外, PRC 内还包含连接蛋白 Ctf4, I 型拓扑异构酶 Top1, 组蛋白分子伴侣 FACT (由 Pob3、Spt16 两个亚基组成), 异源三聚体 Tof1、Csm3、Mrc1^[30-33]。与之相符的是, CHIP 实验结果显示这些蛋白都会随着复制叉移动。另外, E3 泛素连接酶 SCF^{Dia2} 也会随着 PRC 复合体移动^[34]。负责后随链合成的是 DNA 聚合酶 Pol δ 。迄今为止, 没有检测到 DNA 聚合酶 Pol δ 与 CMG 的相互作用^[30-31]。现已知 Pol δ 与 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)有相互作用。在酿酒酵母中, PCNA 是由 3 个 Pol30 亚基形成的环状分子。PCNA 的装载子 RFC 复合体(Replication factor C)能够与 DNA 聚合酶/引发酶 Pol α 合成的 RNA-DNA 引物相结合, 进而装载到 DNA 上^[35]。PCNA 通过 RFC 复合体被装载到双链 DNA 上, 并将 Pol δ 固定在模板链上, 行使其后随链合成的功能^[7]。

当 dsDNA 被打开形成 ssDNA 后, 单链结合蛋白 RPC (由 Rfa1、Rfa2、Rfa3 三个亚基组成)会被招募到 ssDNA 上, 起保护模板链的作用。随后, DNA 聚合酶/引发酶 Pol α 中的引发酶亚基 Pri1 和 Pri2 以 ssDNA 为模板合成一段约 8-10 nt 的 RNA 引物, 接着聚合酶亚基 Pol1、Pol12 会在 RNA 引物后继续合成一段 10-15 nt 的 DNA 序列^[36], 最终形成一段

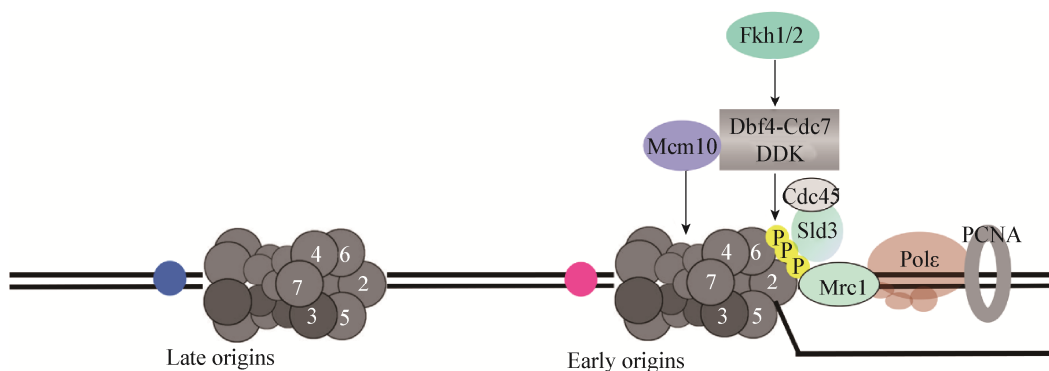


图 1 Mcm10 及 FKH 家族转录因子在 CMG 解旋酶组装和激活中的作用

Figure 1 The roles of Mcm10 and FKH-family transcription factors in the assembly and activation of CMG holohelicase

RNA 和 DNA 混杂的引物。由于 DNA 聚合酶/引发酶 Pol α 仅能合成一小段 DNA^[37], 后续的 DNA 合成分别由前导链聚合酶 Pol ϵ 和后随链聚合酶 Pol δ 负责。其中前导链 DNA 沿着 5'→3' 的方向持续合成。后随链 DNA 则进行不连续合成, 这些不连续合成的片段被称为冈崎片段。当由 Pol δ 合成的 DNA 链与后一段的 RNA 引物相遇时, Pol δ 会继续合成一段 DNA 替换由 Pol α 合成的引物。游离在外的 RNA 引物可以被核酸内切酶 Rad27/Fen1 或者核酸酶 Dna2 切除。而后 DNA 连接酶 Cdc9 将冈崎片段连接, 形成一条完整的 DNA 链, 从而完成 DNA 复制^[1,7,38]。

3 酿酒酵母 DNA 复制终止

目前, 人们对于 DNA 复制终止的机制知之甚少。复制终止的不同步大大加深了人们对复制终止研究的难度。有课题组在全基因组范围内探究了 DNA 终止位点在染色体上的位置, 结果发现在染色体 DNA 上没有特定的复制终止位点。复制终止位点基本取决于两个复制起始位点之间的相对位置和复制起始的时间^[39-40]。当两个相向行进的复制叉相遇时, 复制终止。在此之前, 不管在 DNA 上遇到任何障碍, CMG 都不会从 DNA 上卸载下来^[1,7,41]。复制终止时, DNA 需要完成复制, 新合成的两条 DNA 链解除连环(Decatenation), 复制延伸复合体需要从 DNA 上卸载。2015 年, Walter 实验室构建了含有 LacO 的质粒, 通过 LacR 蛋白与 LacO 序列的特异性结合使得复制叉停滞在复制终止前 500 bp 处, 然后使用 IPTG 诱导, 使得 LacR 蛋白离开 LacO 序列, 启动 DNA 复制, 进而实现复制终止的同步化。实验发现, 两个复制叉相遇时会畅通无阻的越过彼此, DNA 的前导链会继续合成, 直至遇到前方的冈崎片段。在整个复制终止过程中, 检测不到 DNA 复制速度的减慢^[42]。DNA 遇到对方合成的冈崎片段后, 解旋酶 CMG 可以带着前导链聚合酶 Pol ϵ 跨越 ssDNA-dsDNA 接口处, 环绕在 dsDNA 上。新合成的 DNA 被 DNA 连接酶连接形成两条完整的

DNA 链。在 S 期的晚期, Mcm7 会被与复制叉相连接的 E3 连接酶 SCF^{Dia2} 泛素化。在 DNA 复制完成后, 泛素化的 Mcm7 将会被移除酶 Cdc48/P97 从 CMG 复合体上摘除, 从而促进了 CMG 的卸载^[1,41]。

4 结论与展望

通过多年的努力, 人们对 DNA 复制过程有了大致的了解。DNA 复制体系也得以在体外重建。尽管如此, 人们依然不能够清楚地了解 DNA 复制的精确过程, 在 DNA 复制领域依然存在很多核心问题等待被探索。例如, 在 DNA 复制起始过程中, 支架蛋白 Sld2、Sld3、Dpb11 是何时离开复制起点? pre-IC 的具体组成和构象是怎样的? DNA 双链最早是怎样打开的? Mcm10 是如何促进 MCM DH 解离的? MCM DH 又是如何由环绕 dsDNA 变为环绕 ssDNA 的? 在复制终止时, Mcm7 是何时被泛素化的?

近年来, 越来越多的新技术被应用于 DNA 复制领域, 如单分子技术^[43-44]、超高分辨显微^[45]及冷冻电镜技术^[46]等。以冷冻电镜技术为例, 2015 年 Gao 实验室纯化了酿酒酵母内源的 MCM DH, 并通过冷冻电镜解析了其结构。结果显示两个 MCM 六聚体通过 MCM 亚基的 N 端相互作用而堆叠在一起, 且两个 MCM 六聚体之间存在一定的倾斜角度和旋转扭曲, 在两个 MCM 的连接处形成一个刚好容纳 dsDNA 的狭窄通道。这些结果暗示在复制起始过程中 DNA 最初始的打开需要 MCM DH 和 dsDNA 的构象变化^[4]。2017 年, Costa 实验室同时解析了 MCM DH-DNA 和被 DDK 磷酸化后的 MCM DH-DNA 的结构。通过对比二者结构发现, DDK 对 MCM 的磷酸化不影响 MCM 核心区域的结构, 但会改变 MCM 的 N 端结构以便招募 Cdc45 和 Sld3。进一步对比 MCM DH-DNA 和 CMG-DNA 的结构, 发现与 CMG-DNA 中的 DNA 相比, 在 MCM DH-DNA 中 DNA 呈现弯曲的构象, 这暗示着 MCM DH 向 CMG 转化过程中会促进 dsDNA 的打开^[47]。同一年, O'Donnell 实验室通过解析 CMG-DNA fork

的结构发现,在解旋过程中 MCM 的 N 端朝向复制叉前进的方向^[48]。达到这种状态有两种可能的方式,一个是两个 MCM 要穿过彼此,一个是在 MCM DH 向 CMG 转变过程中两个 MCM 发生翻转。解开这些疑问需要科学家们进行进一步探索。上述结果是很难通过单纯的生物化学或者遗传学方法得到的。由此可见,这些新技术的应用将会极大地加快人们对这些关键 DNA 复制问题的探索,带来对真核生物 DNA 复制更清晰更全面的理解,最终将推动人们对于 DNA 复制缺陷和基因组不稳定性相关疾病的认识、诊断和治疗。

REFERENCES

- [1] Kang S, Kang MS, Ryu E, et al. Eukaryotic DNA replication: Orchestrated action of multi-subunit protein complexes[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2018, 809: 58-69
- [2] Wu LH, Liu Y, Kong DC. Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes[J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(5): 482-487
吴丽虹, 刘阳, 孔道春. 真核细胞染色体 DNA 复制起始及复制叉稳定性维持的机制[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 48(10): 824-832
- [3] Zou YL, Li LL, Lou HQ. The critical roles of DNA polymerases in genome stability and related human diseases[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, 26(11): 1166-1171 (in Chinese)
邹友龙, 李丽莉, 楼慧强. DNA 聚合酶在维持基因组稳定性中的多重功能及其相关疾病[J]. *生命科学*, 2014, 26(11): 1166-1171
- [4] Li NN, Zhai YL, Zhang YX, et al. Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å[J]. *Nature*, 2015, 524(7564): 186-191
- [5] Evrin C, Clarke P, Zech J, et al. A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(48): 20240-20245
- [6] Remus D, Beuron F, Tolun G, et al. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing[J]. *Cell*, 2009, 139(4): 719-730
- [7] Bell SP, Labib K. Chromosome duplication in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2016, 203(3): 1027-1067
- [8] Leonard AC, Méchali M. DNA replication origins[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(10): a010116
- [9] Sun JC, Evrin C, Samel SA, et al. Cryo-EM structure of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 bound to DNA[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(8): 944-951
- [10] Yuan ZN, Riera A, Bai L, et al. Structural basis of Mcm2-7 replicative helicase loading by ORC-Cdc6 and Cdt1[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(3): 316-324
- [11] Ticau S, Friedman LJ, Ivica NA, et al. Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading[J]. *Cell*, 2015, 161(3): 513-525
- [12] Ticau S, Friedman LJ, Champasa K, et al. Mechanism and timing of Mcm2-7 ring closure during DNA replication origin licensing[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, 24(3): 309-315
- [13] Frigola J, He J, Kinkelin K, et al. Cdt1 stabilizes an open MCM ring for helicase loading[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15720
- [14] Zhai YL, Li NN, Jiang HL, et al. Unique roles of the non-identical MCM subunits in DNA replication licensing[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(2): 168-179
- [15] Frigola J, Remus D, Mehanna A, et al. ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing[J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 339-343
- [16] Coster G, Diffley JFX. Bidirectional eukaryotic DNA replication is established by quasi-symmetrical helicase loading[J]. *Science*, 2017, 357(6348): 314-318
- [17] Fang DQ, Cao QH, Lou HQ. Sld3-MCM interaction facilitated by Dbf4-dependent kinase defines an essential step in eukaryotic DNA replication initiation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 885
- [18] Deegan TD, Yeeles JT, Diffley JF. Phosphopeptide binding by Sld3 links Dbf4-dependent kinase to MCM replicative helicase activation[J]. *The EMBO Journal*, 2016, 35(9): 961-973
- [19] Muramatsu S, Hirai K, Tak YS, et al. CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pole, and GINS in budding yeast[J]. *Genes & Development*, 2010, 24(6): 602-612
- [20] Tanaka S, Araki H. Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5(12): a010371
- [21] Watase G, Takisawa H, Kanemaki MT. Mcm10 plays a role in functioning of the eukaryotic replicative DNA helicase, Cdc45-Mcm-GINS[J]. *Current Biology*, 2012, 22(4): 343-349
- [22] van Deursen F, Sengupta S, de Piccoli G, et al. Mcm10 associates with the loaded DNA helicase at replication origins and defines a novel step in its activation[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(9): 2195-2206
- [23] Kanke M, Kodama Y, Takahashi TS, et al. Mcm10 plays an essential role in origin DNA unwinding after loading of the CMG components[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(9): 2182-2194
- [24] Yeeles JTP, Deegan TD, Janska A, et al. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins[J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 431-435
- [25] Douglas ME, Diffley JFX. Recruitment of Mcm10 to sites of replication initiation requires direct binding to the minichromosome maintenance (MCM) complex[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 291(11): 5879-5888
- [26] Quan Y, Xia YS, Liu L, et al. Cell-cycle-regulated interaction between Mcm10 and double hexameric Mcm2-7 is required for helicase splitting and activation during S phase[J]. *Cell Reports*, 2015, 13(11): 2576-2586
- [27] Douglas ME, Ali FA, Costa A, et al. The mechanism of eukaryotic CMG helicase activation[J]. *Nature*, 2018, 555(7695): 265-268

- [28] Fang DQ, Lengronne A, Shi D, et al. Dbf4 recruitment by forkhead transcription factors defines an upstream rate-limiting step in determining origin firing timing[J]. *Genes & Development*, 2018. DOI: 10.1101/gad.306571.117
- [29] Natsume T, Müller CA, Katou Y, et al. Kinetochores coordinate pericentromeric cohesion and early DNA replication by Cdc7-Dbf4 kinase recruitment[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(5): 661-674
- [30] Sengupta S, van Deursen F, de Piccoli G, et al. Dpb2 integrates the leading-strand DNA polymerase into the eukaryotic replisome[J]. *Current Biology*, 2013, 23(7): 543-552
- [31] de Piccoli G, Katou Y, Itoh T, et al. Replisome stability at defective DNA replication forks is independent of S phase checkpoint kinases[J]. *Molecular Cell*, 2012, 45(5): 696-704
- [32] Gambus A, van Deursen F, Polychronopoulos D, et al. A key role for Ctf4 in coupling the MCM2-7 helicase to DNA polymerase α within the eukaryotic replisome[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(19): 2992-3004
- [33] Randell JCW, Bowers JL, Rodríguez HK, et al. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase[J]. *Molecular Cell*, 2006, 21(1): 29-39
- [34] Morohashi H, Maculins T, Labib K. The amino-terminal TPR domain of Dia2 tethers SCF^{Dia2} to the replisome progression complex[J]. *Current Biology*, 2009, 19(22): 1943-1949
- [35] Yao NY, O'Donnell M. The RFC clamp loader: structure and function[A]//MacNeill S. *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function*[M]. Dordrecht: Springer, 2012, 62: 259-279
- [36] Pellegrini L. The Pol α -primase complex[A]//MacNeill S. *The Eukaryotic Replisome: a Guide to Protein Structure and Function*[M]. Dordrecht: Springer, 2012, 62: 157-169
- [37] Perera RL, Torella R, Klinge S, et al. Mechanism for priming DNA synthesis by yeast DNA polymerase α [J]. *eLife*, 2013, 2: e00482
- [38] Burgers PMJ, Kunkel TA. Eukaryotic DNA replication fork[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 417-438
- [39] Smith DJ, Whitehouse I. Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly[J]. *Nature*, 2012, 483(7390): 434-438
- [40] McGuffee SR, Smith DJ, Whitehouse I. Quantitative, genome-wide analysis of eukaryotic replication initiation and termination[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(1): 123-135
- [41] Dewar JM, Walter JC. Mechanisms of DNA replication termination[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(8): 507-516
- [42] Dewar JM, Budzowska M, Walter JC. The mechanism of DNA replication termination in vertebrates[J]. *Nature*, 2015, 525(7569): 345-350
- [43] Xue HJ, Xu X, Fu YV. New insights in pre-replication complex formation with single-molecule visualization[J]. *Science Bulletin*, 2015, 60(12): 1133-1135
- [44] Liu XJ, Lou HQ. Single molecular biology: coming of age in DNA replication[J]. *Hereditas*, 2017, 39(9): 771-774 (in Chinese) 刘晓晶, 楼慧强. DNA 复制研究步入单分子时代[J]. *遗传*, 2017, 39(9): 771-774
- [45] Xia P, Dou Z, Yao XB. Progress of super-resolution microscopy[J]. *Chemistry of Life*, 2015, 35(3): 430-437 (in Chinese) 夏鹏, 窦震, 姚雪彪. 超高分辨率显微技术研究进展[J]. *生命的化学*, 2015, 35(3): 430-437
- [46] Riera A, Barbon M, Noguchi Y, et al. From structure to mechanism — understanding initiation of DNA replication[J]. *Genes & Development*, 2017, 31(11): 1073-1088
- [47] Abid Ali F, Douglas ME, Locke J, et al. Cryo-EM structure of a licensed DNA replication origin[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2241
- [48] Georgescu R, Yuan ZN, Bai L, et al. Structure of eukaryotic CMG helicase at a replication fork and implications to replisome architecture and origin initiation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(5): E697-E706