

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Ekaterina Panova

Biogeneze a funkce jaderných železo-sírných proteinů

Biogenesis and function of nuclear iron-sulfur proteins

Bakalářská práce

Školitel:
Mgr. Martin Benda, Ph.D.

Praha, 2023

Abstrakt

Železo-sírné klastry jsou důležitými anorganickými kofaktory mnoha buněčných reakcí, včetně těch, které probíhají v jádře. Jaderné železo-sírné proteiny hrají důležitou roli při replikaci DNA, opravách genomu a udržování jeho stability. Biosyntéza těchto železo-sírných klastrů začíná v mitochondriích pomocí ISC dráhy (*iron-sulfur cluster assembly*) pokračuje v cytosolu v CIA dráze (*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) a končí zabudováním klastrů do cílových apoproteinů, kterými jsou například polymerázy, primázy, helikázy, endonukleázy nebo glykosylázy. Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o dráhách biosyntézy železo-sírných klastrů, o funkcích jaderných železo-sírných proteinů a o úloze železo-sírných klastrů v těchto proteinech, včetně fenotypů a klinických projevů způsobených jejich absencí.

Klíčová slova: železo-sírné klastry, metaloproteiny, jádro, replikace DNA, oprava DNA

Abstract

Iron-sulfur clusters are important inorganic cofactors of many cellular reactions, including those that occur in the nucleus. Nuclear iron-sulfur proteins play an important role in DNA replication, genome repair, and maintenance of genome stability. The biosynthesis of these iron-sulfur clusters is initiated in the mitochondria by the iron-sulfur cluster assembly pathway (ISC), continues in the cytosol by the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway (CIA), and ends with the incorporation of the clusters into target apoproteins such as polymerases, primases, helicases, endonucleases, or glycosylases. This bachelor thesis summarizes current knowledge about the pathways of iron-sulfur cluster biosynthesis, the functions of nuclear iron-sulfur proteins, and the role of the clusters in these proteins, including the phenotypes and clinical manifestations caused by the absence of iron-sulfur clusters.

Keywords: iron-sulfur clusters, metalloproteins, nucleus, DNA replication, DNA repair

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 31.7.2023

Ekaterina Panova

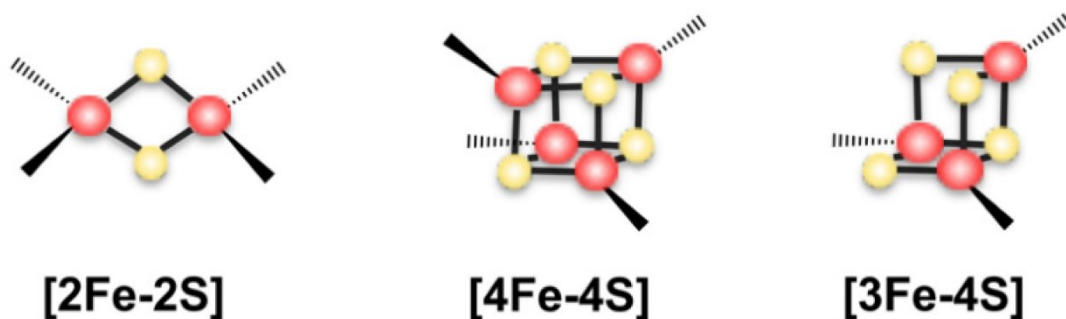
Děkuji svému školiteli Mgr. Martinu Bendovi, Ph.D. za odborné vedení práce, za pomoc a cenné rady. Poděkování patří také členům naší laboratoře. Zároveň bych chtěla poděkovat svému příteli Nikitě Garbovskému za podporu při psaní bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod	6
2. Biogeneze	8
2.1. ISC dráha a transport do cytosolu	8
2.2. CIA dráha	11
2.3. Biogeneze jaderných železo-sirných proteinů od mitochondrie odvozenými organelami	13
3. Struktura a funkce jaderných železo-sirných proteinu	15
3.1. Fe-S proteiny při replikaci DNA	15
3.1.1. DNA polymerázy	15
3.1.1a. DNA polymeráza α - primáza komplex	15
3.1.1b. DNA polymeráza δ	16
3.1.1c. DNA polymeráza ϵ	19
3.1.2. DNA2	21
3.2. Fe-S proteiny při nukleotidové excizní opravě (NER)	24
3.2.1. XPD helikáza	24
3.3. Fe-S proteiny při báze excizní opravě (BER)	25
3.3.1. Glykosydáza MUTYH/Endonukleáza III (EndoIII)	26
3.4. Fe-S proteiny udržující délku telomer	27
3.4.1. Helikáza RTEL1	27
4. Závěr	29
5. Seznam zkratk	31
6. Seznam použité literatury	32

1. Úvod

Železo-sírné klastry jsou anorganické kofaktory. Jejich nejčastější typy jsou [2Fe-2S] a [4Fe-4S], méně častý typ je [3Fe-4S]. Vytvářejí kosočtvercové, kubické a asymetrické struktury (Obr. 1). V proteinech jsou koordinovány cysteinovými zbytky a stabilizovány hydrofobními interakcemi (Beinert et al., 1997, Johnson, 1998). Železo-sírné proteiny jsou součástí elektron transportního řetězce, kde plní svou nejnámější funkci při přenosu elektronů (Beinert et al., 1997), ale také mají úlohu v dalších buněčných procesech jako například při replikaci DNA, opravách genomu a udržování jeho stability (viz kapitola 3). Kromě výše zmíněných klastrů existují i další vzácnější typy, například [8Fe-7S] v aktivním centru nitrogenázy dusík fixujících bakterií nebo dvojitý kubický [8Fe-9S] v nitrogenáze podobném proteinu či benzoyl-CoA reduktáze/dehydratáze. Tyto typy klastrů zajišťují multielektronové redoxní procesy, protože mohou existovat v mnoha oxidativních stavech a právě tyto schopnosti jsou nutné například pro redukci N_2 na NH_3 nebo redukci aromatických sloučenin, kde je třeba poskytnout až osm elektronů (Ohki et al., 2009, Jeoung a Dobbek, 2018).



Obrázek 1. Struktury nejčastějších typů železo-sírných klastrů. Vlevo je kosočtvercová struktura, uprostřed je kubická struktura a vpravo je asymetrická struktura (upraveno z Mendel et al., 2020).

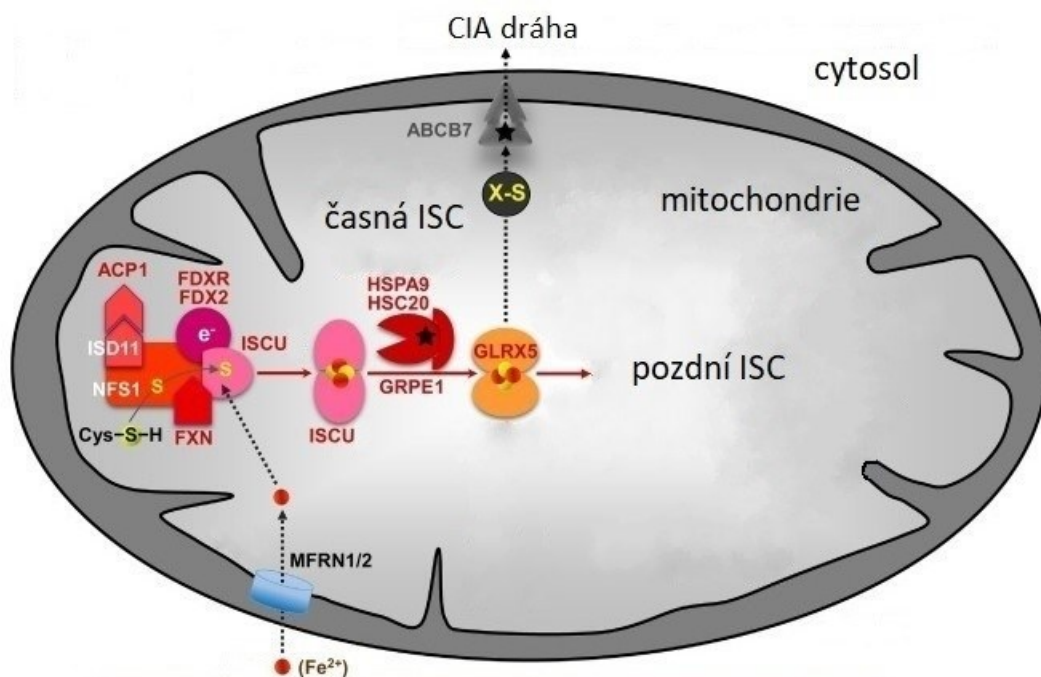
V eukaryotických buňkách tvorba železo-sírných klastrů začíná v mitochondriích pomocí ISC dráhy (*iron-sulfur cluster assembly*). V ISC dráze dochází ke vzniku železo-sírných klastrů pro mitochondriální proteiny a meziprojektu zvaného X-S nebo $(Fe-S)_{int}$. Tento meziprojekt je transportován do cytosolu a dále vstupuje do CIA dráhy (*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*), kde dochází ke tvorbě Fe-S klastrů pro cytosolické a jaderné železo-sírné proteiny (Uzarska et al., 2013, Pandey et al., 2019). Právě jaderným

Fe-S proteinům je tato bakalářská práce věnovaná, jelikož nové poznatky ukazují na klíčovou úlohu Fe-S klastrů nejen v mitochondriích a cytosolu, ale i v jádře, a čím dál častěji jsou železo-sírné klastry objevovány i v proteinech, kde byla dříve předpokládána vazba zinku (Pritts a Michel, 2022). Cílem této práce je popsat dráhy biosyntézy jaderných železo-sírných klastrů (viz kapitola 2), a přinést přehled jaderných železo-sírných proteinů a funkcí, které železo-sírné klastry v těchto proteinech mají (viz kapitola 3). Vzhledem k tomu, že se u různých organismů homologní proteiny biosyntetických ISC a CIA drah nazývají jinak, bude pro přehlednost v této práci použita jednotná nomenklatura pro lidské proteiny.

2. Biogeneze

2.1. ISC dráha a transport do cytosolu

ISC dráha je u eukaryot lokalizována v mitochondriích. ISC dráha vznikla pravděpodobně v alfa-proteobakterii a díky endosymbióze se dostala do eukaryotické buňky (Yutin et al., 2008). V této dráze v časně fázi se Fe^{2+} spojí se sírou z cysteinu a vznikne $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ klastr, který může být transportován do cytosolické CIA dráhy nebo dále maturován v pozdní fázi na $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr (Braymer et al., 2021). ISC dráha je znázorněna na obrázku (Obr. 2).



Obrázek 2. Mitochondriální ISC dráha. Na obrázku je znázorněna šedá mitochondrie s proteiny ISC dráhy uvnitř. Fe^{2+} je transportován do mitochondrie pomocí transportéru MFRN1/2 (na obrázku modře) a putuje do ISCU scaffoldu. Pomocí ACP1-ISD11-NFS1 je z cysteinu uvolněná síra, která také putuje do scaffoldu, na kterém dochází k maturaci $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ klastru za využití elektronů z FDX2. Klastr pomocí HSPA9-HSC20 a GRPE1 je přenesen na GLRX5, ze kterého může vstoupit do pozdní ISC dráhy pro maturaci mitochondriálních $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastrů nebo ve formě intermediátu X-S transportérem ABCB7 vstoupit do CIA dráhy pro maturaci cytosolických a jaderných $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastrů (upraveno z Braymer et al., 2021).

Biogeneze železo-sírných proteinů není možná bez transportu železnatých kationtů do matrixu mitochondrií. Transport je uskutečněn pomocí mitoferrinů 1 a 2 (MFRN1/2),

které patří do rodiny SLC25 transportérů. Při přenosu jsou Fe^{2+} ionty koordinované histidinovými, cysteinovými a metioninovými zbytky (Christenson et al., 2017, Wiesenberger et al., 1991).

Cystein desulfuráza NFS1 je důležitou složkou pro biogenezi železo-sirných proteinů. Její funkcí je poskytování síry pro *de novo* syntézu Fe-S klastrů. Absence NFS1 má za následek nashromažďování volných iontů železa v mitochondriích (Kispal et al., 1999). NFS1 patří do podrodiny PLP-dependentních transamináz. V ISC dráze tvoří cystein desulfurázový komplex s ISD11 a ACP1 zvaný NIA (NFS1-ISD11-ACP1) (Cory et al., 2017). Pomocí enzymatické aktivity NFS1 ze substrátového cysteinu dochází k uvolňování síry, která se váže na Cys-smyčku a formuje persulfid. Během této reakce je cystein přeměněn na alanin (Zheng et al., 1993).

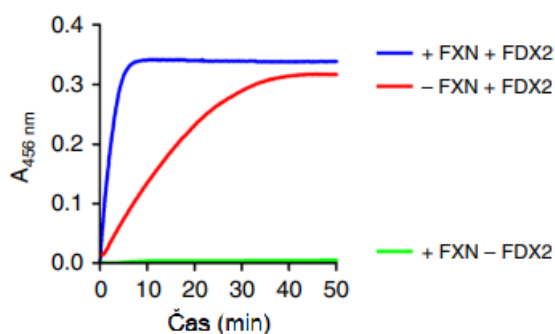
ISD11 je protein, který interaguje s cystein desulfurázou. Patří do rodiny LYR proteinů, která je charakterizována přítomností LYR/K segmentů v aminokyselinové sekvenci. ISD11 je asociován s vnitřní mitochondriální membránou. Jeho úlohou je tvorba stabilního komplexu s NFS1 a ACP1. Bez přítomnosti ISD11 je desulfuráza funkční, ale je destabilizována. To má za následek snížení množství proteinů obsahujících železo-sirný klastr a také snížení jejich aktivity. Například, 12hodinová downregulace ISD11 má za následek snížení aktivity železo-sirného proteinu Krebsova cyklu akonitázy na 40–60%. Kromě toho dochází ke vzniku NFS1 agregátů. Bylo zjištěno, že buňky se sníženou produkcí ISD11 mají tendenci ke zpomalení růstu až na jeho úplné zastavení (Adam et al., 2006, Biederbick et al., 2006).

ACP1 je protein přenášející acyly a stejně jako ISD11 přispívá ke stabilitě komplexu, který tvoří s NFS1. Studie ukazují, že snížení aktivity ACP1 vede k destabilizaci a agregaci celého NIA komplex. Knockdown ACP1 snižuje růst buněk, protože dochází ke ztrátě železo-sirných komplexů II a III dýchacího řetězce. Ta vzniká v důsledku toho, že při knockdownu ACP1 je NIA komplex destabilizován, což vede k poklesu cystein desulfurázové aktivity. Důležitou roli zde hraje 4'-fosfopantetin-konjugovaný acylový řetězec. Jeho delece vede ke snížení aktivity jak mitochondriálních, tak i cytosolických železo-sirných proteinů (van Vranken et al., 2016, Cory et al., 2017).

Komplex NIA poskytuje síru pro následné formování železo-sirných klastrů na ISCU, což je scaffold protein. Jeho struktura má 3 antiparalelní beta-listy, které jsou ze strany obklopené alfa-helixy. Bylo zjištěno, že ISCU je schopen koordinovat [2Fe-2S] (Adrover et al., 2015). Pro vznik [2Fe-2S] klastru je nutná dimerizace ISCU, protože na monomeru je přítomen jen jeden atom železa a jeden persulfid (Gervason et al., 2019).

Mutace ISCU, kde zbytek kyseliny asparagové ve vazebném místě pro [2Fe-2S] klastr byl vyměněn za alanin, měla za následek vznik klastru se změnou (kompaktnější) geometrií (vzdálenost mezi atomy železa v WT buňkách 2,79Å, u mutantních 2,89 Å) (Adrover et al., 2015). ISCU existuje ve dvou stavech: uspořádaném a neuspořádaném (Kim et al., 2009). Aktivní místo ISCU, které je lokalizováno na vnější části proteinu, váže Zn^{2+} pomocí C35, D37, C61 a H103. Při výměně Zn^{2+} za Fe^{2+} dochází ke stabilizaci uspořádaného stavu. Bylo prokázáno, že ISCU obsahující železnatý kationt je schopný vytvoření [2Fe-2S] klastrů, zatímco ISCU s Zn^{2+} toho nebyl schopný. Jednu z hlavních rolí hraje C104, který přijímá persulfid z NFS1. Dále dochází k jeho redukci pomocí ferredoxinu (viz níže) (Gervason et al., 2019).

Sestavení [2Fe-2S] na ISCU je závislé na frataxinu (FXN) a ferredoxinu (FDX2). Při absenci FDX2 železo-sírné klastry vůbec nevznikají (Gervason et al., 2019, Lange et al., 2000, Shelftel et al., 2010). FXN je důležitý pro rychlost sestavení [2Fe-2S], v jeho nepřítomnosti se rychlost vytvoření snižuje (Gervason et al., 2019, Aloria et al., 2004, Yoon et al., 2014) (Obr. 3). FXN přibližně šestkrát urychluje přenos persulfidu z NFS1 na ISCU, zatímco FDX2 redukuje persulfid na sulfid na ISCU obsahujícím Fe^{2+} (Gervason et al., 2019). Oxidovaný FDX2 je následně zpět redukován pomocí ferredoxin reduktázy (FDXR), zatímco FDXR je redukována pomocí NADPH (Braymer et al., 2021).



Obrázek 3. Rychlost sestavení [2Fe-2S] klastrů na ISCU je závislá na přítomnosti FXN a FDX2. UV-viditelná spektroskopická měření byly provedeny při 456 nm, což odpovídá spektru [2Fe-2S] klastrů. Modře je znázorněn proces sestavení za přítomnosti všech komponent FXN a FDX2, červeně je za přítomností jen FDX2, zeleně je za přítomností jen FXN (upraveno z Gervason et al., 2019).

Z komplexu ISCU se [2Fe-2S] klastry uvolňují pomocí chaperonu HSPA9 a kochaperonu HSC20 na monothiol glutaredoxin GLRX5. HSPA9 a HSC20 využívají energii z hydrolyzy ATP (Camaschella et al., 2007., Rodriguez-Manzaneque, 2002, Ye et al., 2010, Uzarska et al., 2013). HSC20 se váže na C-terminální doménu ISCU

(Ciesielski et al, 2012, Andrew et al, 2006). Následně HSPA9 s navázaným ATP interaguje s ISCU-HSC20 komplexem, dochází k hydrolýze ATP na ADP a interakce komplexu se stabilizuje (Dutkiewicz et al, 2004, Dutkiewicz et al, 2003, Manicki et al., 2014). V tuto chvíli se [2Fe-2S] klastr uvolňuje a interaguje s GLRX5. ATPázovou aktivitu stimuluje HSC20 interakcí s ATPázovou doménou HSP20. Následně se ADP vyměňuje za ATP na HSPA9 pomocí faktoru výměny nukleotidů GRPE1 a komplex se rozpadá. Tento cyklus se může dále opakovat (Chandramouli a Johnson, 2006, Shakamuri et al., 2012, Uzarska et al., 2013, Dutkiewicz et al, 2003).

Následně GLRX5 s navázaným [2Fe-2S] klastrem kooperuje s pozdní ISC mašinerií pro maturaci mitochondriálních železo-sirných proteinů nebo je transportován do cytosolu ve formě (Fe-S)_{int} (Uzarska et al., 2013., Pandey et al., 2019).

Export (Fe-S)_{int} do cytosolu zajišťuje ABCB7 transportér. Absence ABCB7 neovlivňuje maturaci mitochondriálních železo-sirných proteinů. Naopak biogeneze cytosolických a jaderných proteinů je na něm závislá (Kispal et al., 1999).

2.2. CIA dráha

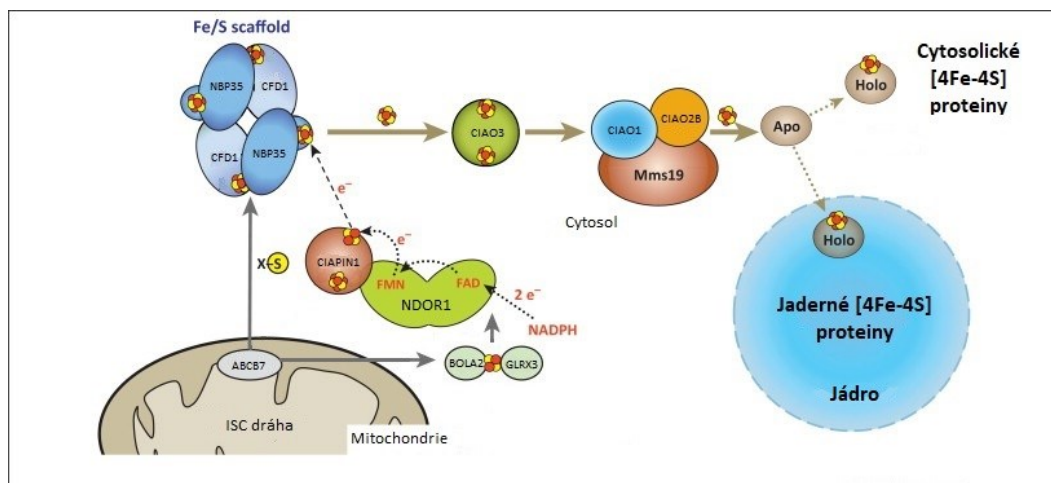
Maturace [4Fe-4S] klastrů *de novo* probíhá na heterotetramerním NBP35-CFD1 scaffold komplexu a je závislá na exportovaném (Fe-S)_{int} vzniklém pomocí ISC dráhy v mitochondrii (Obr. 4) (Pandey et al., 2019, Netz et al., 2007). Maturace klastrů na NBP35-CFD1 také vyžaduje přísun elektronů. Ten zajišťuje flavin-oxidoreduktáza NDOR1. NDOR1 obsahuje kofaktory flavinadenin dinukleotid a flavinmononukleotid, které jsou redukovány pomocí NADPH. Dále elektrony z kofaktorů putují na CIAPIN1, se kterým NDOR1 interaguje. CIAPIN1 obsahuje ve struktuře [2Fe-2S] a [4Fe-4S] klastry, které jsou vázány přes cysteinové zbytky na C-terminální doméně. Přes [2Fe-2S] klastr jsou přenášeny elektrony z NDOR1 na heterotetramer NBP35-CFD1, úloha [4Fe-4S] zatím není známa (Netz et al., 2010, Netz et al., 2016). Přestože přesná role [4Fe-4S] není známa, jeho absence má také negativní dopad na fungování dráhy, zejména na maturaci cytosolických železo-sirných proteinů, avšak jejich role při maturaci jaderných Fe-S proteinů nebyla prozkoumána (Netz et al., 2016).

BOLA2 tvoří komplex s monothiols glutaredoxinem GLRX3, přičemž jeho formování je závislé na [2Fe-2S] klastru. Předpokládá se, že [2Fe-2S] z GLRX3-BOLA2 komplexu může být přenesen na CIAPIN1, což ukazuje na jejich chaperonovou funkci (Frey et al., 2016).

CFD1 a NBP35 jsou NTPázy, které spolu tvoří stabilní komplex. Jak bylo zmíněno dříve, CFD1-NBP35 komplex je schopen za využití $(\text{Fe-S})_{\text{int}}$ a elektronů syntézy [4Fe-4S] klastrů *de novo* (Netz et al., 2007). Oba proteiny mohou labilně vázat vytvořený [4Fe-4S] na C-terminální doméně pomocí čtyř cysteinů (Hausmann et al., 2005, Netz et al., 2012).

[4Fe-4S] klastr vytvořený na CFD1-NBP35 se pak uvolňuje a putuje přes CIAO3 do targeting faktorů (CIAO1-CIAO2B-MMS19). CIAO3 je schopen přenosu dvou [4Fe-4S] klastrů, které se váží na cysteinové zbytky na C- a N-terminálních doménách (Urzica et al., 2009, Nicolet et al., 1999). Vliv CIAO3 pro maturaci jaderných železo-sirných proteinů byl experimentálně prokázán při pokusu provedeném na N-glykosidáze Ntg2p ze *Saccharomyces cerevisiae* (homolog EndoIII, viz kapitola 3.3.1.). Ntg2p byl označen HA-taggem a maturován za přítomnosti ^{55}Fe . U buněk s deplecí CIAO3 bylo pozorováno snížení obsahu železa až desetkrát ve srovnání s WT, ačkoli lokalizace ani množství samotného proteinu nebyly změněny (Balk et al., 2004).

Posledním krokem CIA dráhy je cílená integrace [4Fe-4S] klastrů do cytosolických a jaderných železo-sirných apoproteinů pomocí targeting komplexu (Stehling et al., 2012, Stehling et al., 2013). CIAO2B obsahuje reaktivní cysteinový zbytek a je zodpovědný za transport [4Fe-4S] (Weerapana et al., 2010). Spolu s CIAO1, který má místo s vysokou afinitou pro vazbu cílových apoproteinů, tvoří jádro komplexu. MMS19 je adaptérovou podjednotkou komplexu. Je flexibilní, zajišťuje přizpůsobení tvarům cílových proteinů. Pomocí MMS19 se například zvyšuje afinita targeting komplexu k jaderným železo-sirným proteinům primáze a XPD helikáze (viz kapitoly 3.1.1a. a 3.2.1) (Kassube a Thoma, 2020, Stehling et al., 2012).



Obrázek 4. Cytosolická CIA dráha. Na obrázku je běžově znázorněna mitochondrie, modře jádro. [4Fe-4S] klastry jsou označeny žluto-červenými koulemi. Biosyntéza klastrů probíhá na scaffold komplexu NBP35-CFD1, je závislá na X-S intermediátu z mitochondrie a elektronech (které putují z NDOR1 přes CIAPIN1). Dále je maturovaný klastr transportován CIAO3 do targeting faktoru CIAO1-CIAO2B-MMS19, který cíleně inkorporuje klastr do jaderných nebo cytosolických apoproteinů (upraveno z Netz et al., 2013).

2.3. Biogeneze jaderných železo-sirných proteinů od mitochondrie odvozenými organelami

Od mitochondrie odvozené organely (MRO) jsou redukované formy mitochondrií. K MRO patří hydrogenozómy a mitozómy (Lindmark a Müller, 1973, Makiuchi a Nozaki, 2014). U MRO došlo během evoluce ve specifickém anaerobním prostředí ke ztrátě mnoha funkcí, které jsou přítomné v klasických mitochondriích. I když jsou mitochondrie redukované, biogeneze železo-sirných klastrů pomocí ISC dráhy byla zachována a vzhledem k redukcí níže zmíněných funkcí je minimální a základní funkcí mitochondrií, resp. MRO (Braymer et al., 2021, Tsaousis et al., 2008).

Hydrogenozómy nemají DNA a elektron transportní řetězec, ale mají železo-sirný enzym hydrogenázu a ATP-syntázu, díky které produkují ATP (Makiuchi a Nozaki, 2014). Příkladem organismu s hydrogenozómy je lidský parazit *Trichomonas vaginalis* (Lindmark a Müller, 1973). V hydrogenozómech jsou přítomny proteiny jak časně, tak i pozdní fáze ISC (Carlton et al., 2007, Beltrán et al., 2013). Ve srovnání s lidskou CIA dráhou, je CIA *T. vaginalis* redukovaná. V CIA dráze *T. vaginalis*

jsou zachované CFD1, NBP35, CIAO3, CIAO1 a CIAO2B, ale nejsou přítomné NDOR1, CIAPIN1 a GLRX3 (Carlton et al., 2007, Tsaousis et al., 2014).

Mitozomy jsou MRO, které nemají ani elektron transportní řetězec, ani DNA, ani Krebsův cyklus, ani neprodukují ATP. Jedinou zachovanou funkcí je zřejmě biosyntéza železo-sirných klastrů (Jedelsky et al., 2011). Mitozomy jsou přítomny například u střevního parazita *Giardia intestinalis*. Mitozomy mají skoro kompletní časnou ISC dráhu, chybí jen ACP1, ISD11, FDXR, FXN (Vargová et al., 2022, Motyčková et al., 2022) a překvapivě mají i některé proteiny pozdní ISC dráhy, ačkoli mitozyomy neobsahují žádné železo-sirné proteiny, kterým by tato dráha klastry dodávala (Motyčková et al., 2022). *G. intestinalis* však chybí ABCB7 transportér meziprojektu (Fe-S)_{int} a zatím tedy není známo jak jsou u toho organismu ISC a CIA dráhy propojeny (Jedelsky et al., 2011, Motyčková et al., 2022). CIA dráha je u *Giardií* také značně redukována. Z celé dráhy jsou zachované jenom NBP35 scaffold, přenašeč CIAO3 a targeting faktory CIAO1 a CIAO2B a možná ortology proteinu NDOR1 zvané OR1 a OR2 (Pyrih et al., 2016).

3. Struktura a funkce jaderných železo-sirných proteinů

Železo-sirné klastry jsou důležitou součástí mnoha jaderných enzymů, které se podílejí na replikaci a opravě genomu. Mají strukturální roli a katalyzují reakce nezbytné pro efektivní kopírování a opravu genetické informace, což je důležité pro udržování integrity genomu a prevenci mutací a genetických poruch. V následujících kapitolách budou představeny jaderné železo-sirné proteiny, jejich funkce v buňce a vliv klastrů na funkci.

3.1. Fe-S proteiny při replikaci DNA

3.1.1. DNA polymerázy

DNA polymeráza α (Pol α), DNA polymeráza δ (Pol δ) a DNA polymeráza ϵ (Pol ϵ) patří do rodiny B eukaryotických DNA polymeráz. Všichni příslušníci této proteinové rodiny mají charakteristickou strukturu zahrnující N-terminální doménu, DNA polymerázu, 3'-5' DNA exonukleázu a C-terminální doménu. Na C-terminální doméně se nachází CysA a CysB motivy. Na rozdíl od CysA, který váže Zn^{2+} iont, CysB motiv váže klastr typu [4Fe-4S]. Všechny tři polymerázy se účastní replikace DNA (Netz et al., 2011, Chanet et al., 2021).

3.1.1a. DNA polymeráza α - primáza komplex

Pol α -primáza komplex je nezbytný pro iniciaci replikace DNA. Je to multiproteinový komplex skládající se z DNA-dependentní RNA polymerázy zvané primáza a DNA-dependentní DNA polymerázy α . Pol α -primáza komplex má schopnost vytvářet chimérický RNA-DNA primer. To je velmi důležitý krok, protože procesivní DNA polymerázy (polymerázy schopné syntetizovat dlouhé řetězce DNA bez odpojení z templátové DNA, například Pol δ a Pol ϵ , viz níže) vyžadují volnou 3'-hydroxylovou skupinu pro nastartování syntézy. Na začátku primáza vytvoří krátký úsek RNA o délce přibližně 10 nukleotidů. Dále Pol α prodlouží tento úsek o přibližně dalších 20 DNA nukleotidů (Smith a Whitehouse, 2012, Kuchta a Stengel, 2010, Zhang et al. 2014).

Primáza je heterodimér sestavený z malé katalytické podjednotky PriS, která syntetizuje RNA primer, a velké regulační podjednotky PriL, která zajišťuje přenesení primeru na Pol α a regulaci malé podjednotky (Iyer et al., 2005; Zerbe a Kuchta, 2002). PriL obsahuje železo-sirný klastr na C-terminální doméně, která je nezbytná pro nastartování syntézy RNA primeru. Podjednotka PriS váže Zn^{2+} iont v aktivním místě

(Klinge et al., 2007; Agarkar et al., 2011). PriL má velkou globulární α -helixovou doménu a malou doménu obsahující α -helixy a β -listy. Pomocí menší domény PriL zajišťuje spojení s PriS a funguje jako mechanické rameno. β -listy katalytické domény PriS uvnitř struktury jsou obklopené α -helixy z vnější strany. Pro nastartování syntézy prvního dinukleotidu PriS vyžaduje regulační PriL podjednotku s železo-sírným klastrem a DNA templát. Nukleotidy musí být navázané na PriS současně, což vyžaduje regulaci výše zmíněnými součástmi replikonu (Kilkenny et al., 2013; Copeland a Tan., 1995).

[4Fe-4S] klastr regulační podjednotky PriL je zodpovědný za modulaci interakci velké podjednotky a substrátu díky přepínání redoxního potenciálu (O'Brien et al., 2017). Při navázání DNA dochází ke změně redoxního potenciálu a ve výsledku $[4Fe4S]^{3+}$ váže substrát mnohem pevněji než $[4Fe4S]^{2+}$. Tímto mechanismem dochází k předávání chimérického RNA/DNA úseku na Pol α . Při kontaktu Pol α se substrátem, který je navázán na primázu v $[4Fe4S]^{3+}$ stavu, dochází k její oxidaci a redukci primázy na $[4Fe4S]^{2+}$ stav pomocí putování nábojů RNA/DNA duplexem. RNA/DNA úsek s délkou primeru kolem 10 nukleotidu disociuje z primázy a pevně se navazuje na Pol α . Následně primáza se vrací do $[4Fe4S]^{3+}$ stavu, aby mohla předávat další úsek (Sontz et al., 2012; O'Brien et al., 2018).

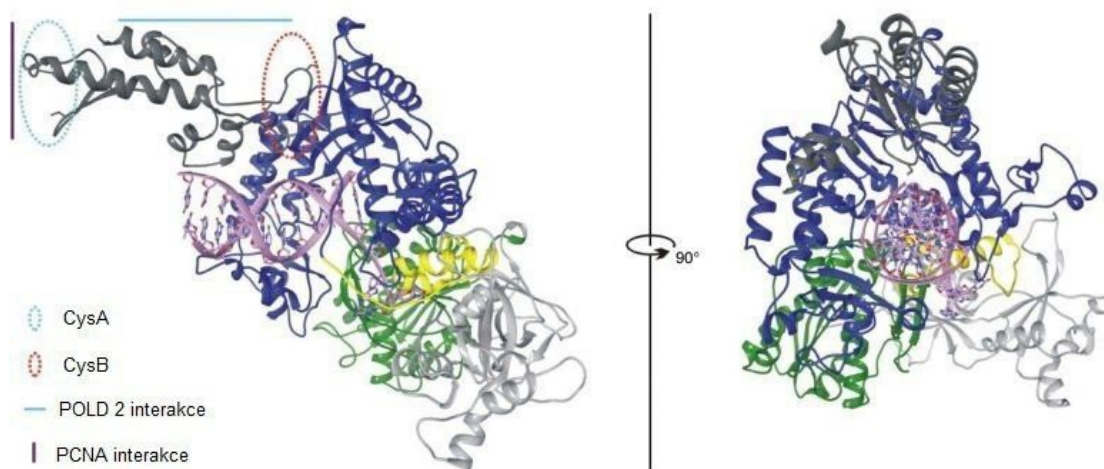
U kvasinek k přepínání redoxního potenciálu dochází přes tyrozinové zbytky Y395 a Y397, které jsou homologní s lidskými Y345 a Y347 (O'Brien et al., 2017). Mutanty s leuciny místo tyrozinů mají sníženou redoxní aktivitu ve srovnání s WT, ale struktura PriL se nemění. Mutace vyvolávají narušení přepínání Fe-S redoxního potenciálu, což má za následek snížení životaschopnosti buněk (O'Brien et al., 2018).

3.1.1b. DNA polymeráza δ

Pol δ je polymerázou s vysokou přesností. Její hlavní úlohou je prodlužování opožďujícího se řetězce DNA. Kromě toho, má 3'-5' exonukleázovou aktivitu spojenou s proofreadingem (Kunkel a Burgers, 2014, Morrison et al., 1991, Georgescu et al., 2014). Procesivita syntézy opožďujícího se řetězce Pol δ je závislá na specifické proteinové svorce zvané jaderný antigen proliferujících buněk (PCNA). PCNA udržuje Pol δ na molekule DNA (Stodola a Burgers, 2016).

Struktura lidské Pol δ zahrnuje katalytickou podjednotku POLD1, která zajišťuje jak polymerázovou, tak i 3'-5' exonukleázovou aktivitu a strukturní podjednotky POLD2, POLD3 a POLD4. Na rozdíl od lidské čtyřpodjednotkové Pol δ , kvasinková Pol δ je třípodjednotková. Koordinaci železo-sírného klastru POLD1 zajišťuje CysB motiv

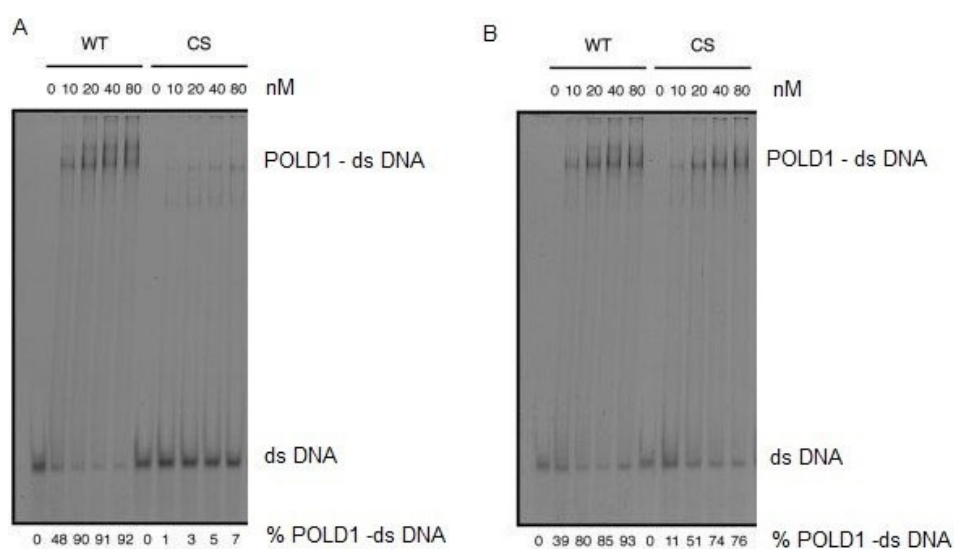
(Obr. 5). Výměna jednoho cysteinu v CysB vede ke ztrátě železo-sírných klastrů. (Netz et al., 2011; Jozwiakowski et al., 2019).



Obrázek 5. Struktura katalytické podjednotky POLD1 polymerázy δ . Světle šedou barvou je označená N-terminální doména. Tmavě šedou barvou – C-terminální doména. Zelenou barvou je označená exonukleázová doména. Modře je označená polymerázová doména. Žlutou barvu má oblast interdoménového linkeru. Fialově je označená dsDNA. Světle modrým tečkovaným kruhem je označená CysA doména, červeným – CysB. Místo interakce s POLD2 je znázorněno světle modrou čarou, s PSNA – fialovou (upraveno z Jozwiakowski et al., 2019).

U kvasinek je [4Fe-4S] klastr ve struktuře Pol δ nezbytný pro interakci katalytické a strukturních podjednotek, v nepřítomnosti klastru dochází ke ztrátě integrity celého komplexu. Na rozdíl od kvasinkové Pol δ , lidská Pol δ v menší míře vyžaduje železo-sírné klastry pro interagování katalytické podjednotky s POLD2, POLD3 a POLD4 (Netz et al., 2011; Jozwiakowski et al., 2019). Ztráta klastru vede k malému poklesu stability proteinového komplexu a výraznému snížení polymerázové aktivity Pol δ . Přítomnost PCNA to všechno kompenzuje (Stodola a Burgers, 2016). Absence [4Fe-4S] klastrů v lidské Pol δ vyvolává snížení afinity k dsDNA. Pokus byl proveden metodou gelové zpomalovací analýzy (*electrophoresis mobility shift assay* – EMSA). Ve srovnání s WT, Pol δ bez navázaného železo-sírného klastru měla výrazně nižší afinitu k dsDNA bez PCNA (92% WT vs. 7% mutant). Za přítomnosti PCNA afinita mutantních Pol δ k dsDNA byla ve srovnání s WT snížena méně než bez PCNA (93% WT vs. 76% mutant) (Obr. 6). To znamená, že PCNA hraje důležitou roli při navázání dsDNA substrátu na

Pol δ . Co se týče exonukleázové aktivity lidské Pol δ , byly purifikované různé varianty genů POLD1 se změnami v CysB, vzájemný železo-sírný klastr, a zkoumané jejich aktivity s PCNA a bez něj. Změněné varianty vykazovaly snížení exonukleázové aktivity ve srovnání s WT, a to jako u třípodjednotkových (charakteristické pro kvasinkovou variantu), tak i u čtyřpodjednotkových (charakteristické pro lidskou variantu) enzymů za přítomnosti a absenci PCNA. To znamená, že exonukleázová funkce není závislá na PCNA ani na kompletní struktuře enzymu, hlavní roli zde hraje CysB motiv. Změna v tomto motivu vyvolává nárůst replikačních chyb a tím snižuje přesnost celého procesu (Jozwiakowski et al., 2019).



Obrázek 6. Výsledek EMSA analýzy u WT a mutované POLD1 podjednotky, kde byla zkoumána jejich afinita k dsDNA substrátu (A) za přítomnosti PCNA (B) bez přítomnosti PCNA. První sloupec je WT podjednotka, druhý je mutovaná varianta POLD1 bez [4Fe-4S] klastru (označena jako CS). Komplexy POLD1-dsDNA se pohybují v gelu pomaleji (horní řádek) než samotná dsDNA (dolní řádek) (upraveno z Jozwiakowski et al., 2019).

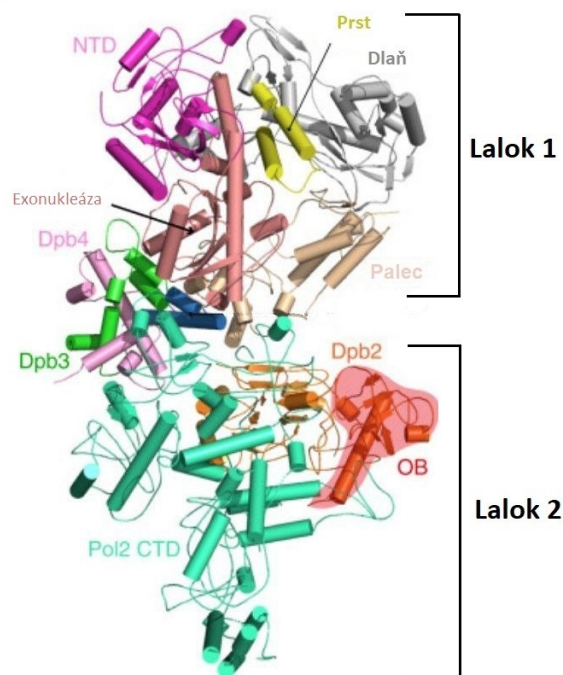
Pro shrnutí výše uvedeného, Pol δ vyžaduje [4Fe-4S] klastry ve struktuře pro správné fungování. Absence klastrů má za následek snížení afinity Pol δ k dsDNA (Jozwiakowski et al., 2019). Při defektní koordinaci železo-sírných klastrů Pol δ dochází ke vzniku poškozených molekul DNA během S fáze buněčného dělení. Jsou velmi toxické pro buňky a snižují jejich životaschopnost. Výrazná nestabilita genomu může vést až k smrti (Netz et al., 2011). K podobnému fenotypu, vykazujícímu defektní replikaci DNA vyvolané defektem syntézy Okazakiho fragmentů, celkovou nestabilitu genomu,

zvýšení závislosti buněčné viability na rekombinantních opravách a kontrolních bodech, vede i úplná absence Pol δ (Koussa a Smith., 2021).

3.1.1c. DNA polymeráza ϵ

Pol ϵ se jako Pol δ považuje za polymerázu s vysokou přesností, protože v její struktuře je přítomná 3'-5' exonukleázová doména, jejíž proofreadingová aktivita poskytuje opravy DNA ihned po vzniku syntetických chyb. Pol ϵ zajišťuje syntézu vedoucího DNA řetězce (Kunkel a Burgers, 2014; Morrison et al., 1991; Pursell et al., 2007). Na rozdíl od ostatních polymeráz zmíněných v této práci, Pol ϵ má katalytické místo na N-terminální doméně. Na ní byl nalezen cysteinový motiv CysX vázající [4Fe-4S] klastr (Jain et al., 2014; Yuan et al., 2020).

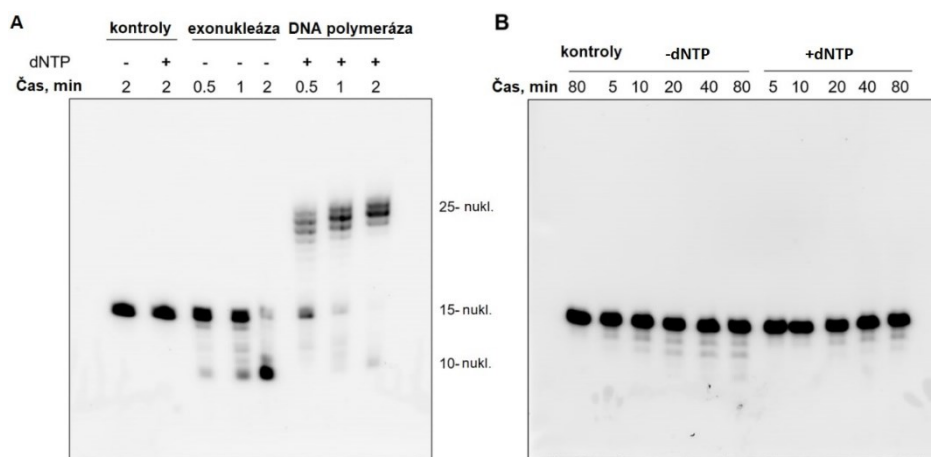
Pomocí kryo-elektronové mikroskopie bylo stanoveno, že ve struktuře kvasinkové Pol ϵ jsou dvě flexibilně propojené domény. Skládají se z čtyř částí: katalytické podjednotky Pol2 spojené s podjednotkami Dpb2, Dpb3 a Dpb4. První lalok je složen z exonukleázy, dlaně, prstu, palce a aktivní Pol2 na N-terminální doméně (NTD) (Obr. 7). Druhý lalok obsahuje neaktivní Pol2 na C-terminální doméně (CTD), OB doménu, inaktivovanou kalcineurinu podobnou fosfoesterázovou doménu a Dpb2. Dpb2 zajišťuje flexibilitu celého komplexu, která je důležitá pro navázání molekuly DNA. Díky tomu se Pol ϵ může navázat na dlouhý řetězec DNA a prodlužovat 3' konec bez putování celou délkou molekuly od její začátku do místa působení. Je to výhodné při polymeraci na dlouhých lineárních molekulách a cirkulárních DNA. Heterodimer Dpb3-Dpb4 má histonový záhyb. Pozice Dpb3-Dpb4 zatím není jasná. Předpokládá se, že kromě flexibilní funkční formy Pol ϵ existuje i rigidní, kterou možná zajišťuje zmíněný heterodimer (Asturias et al., 2006; Yuan et al., 2020).



Obrázek 7. Struktura DNA polymerázy ϵ . Lalok 1 má ve struktuře dlaň, prst, palec a Pol2 NTD. Lalok 2 má ve struktuře Pol2 CTD, OB doménu, inaktivovanou kalcineurinu podobnou fosfoesterázovou doménu a Dpb2. Na obrázku je také znázorněn heterodimer Dpb3-Dpb4 (upraveno z Yuan et al., 2020).

Pro studium vlivu Fe-S klastrů na funkci Pol ϵ byly provedeny tři experimenty. První pokus byl proveden na *S. cerevisiae*. CysX koordinuje klastry [4Fe-4S] typu pomocí cysteinů C665, C668, C677 a C763. *S. cerevisiae* s mutovaným motivem CysX, ve kterém C665 a C668 byly vyměněny za serin, nebyly schopné produkovat kolonie. Výsledek tohoto pokusu ukazuje na důležitou roli CysX a tudíž Fe-S klastrů, jelikož buňky s jeho mutantní variantou nebyly životaschopné (ter Beek et al., 2019). Další pokusy byly provedeny na lidské Pol ϵ . Katalytická doména Pol ϵ byla exprimována v *Escherichia coli* a v buňkách hmyzu. Vzorek izolovaný z *E. coli* byl hnědý, což ukazuje na přítomnost železa, zatímco vzorek z buněk hmyzu byl bezbarvý. Koncentrace železa v hmyzích buňkách byla 8,6krát nižší, než v *E. coli*. Následně bylo změřeno množství aktivních molekul zajišťujících interakce polymerázy s DNA: v *E. coli* 51 % a v hmyzích buňkách 8,5%. Tato korelace podporuje názor, že železo-sírné klastry hrají důležitou roli při interakci mezi Pol ϵ a DNA. Ještě jeden experiment byl proveden pro potvrzení důležitosti [4Fe-4S] klastru pro interakci DNA s Pol ϵ . Byla připravena mutantní varianta Pol ϵ s deficiencí klastrů podobným způsobem jako v prvním pokusu na kvasinkách. Pomocí EMSA bylo ukázáno, že mutantní Pol ϵ neinteragovala ani se ssDNA, ani

s dsDNA. Dále byla kontrolována exonukleázová a DNA polymerázová aktivita WT a mutantů v CysX pomocí Cy3-označeného 15nukleotidového primeru vázajícího se na 25nukleotidový templát. Také byly přidány dNTP ke vzorkům pro kontrolu DNA-polymerázové aktivity. Výsledky ukazují na plnou absenci DNA polymerázové aktivity a na pokles exonukleázové aktivity u mutantů (Obr. 8) (Lisova et al., 2022).



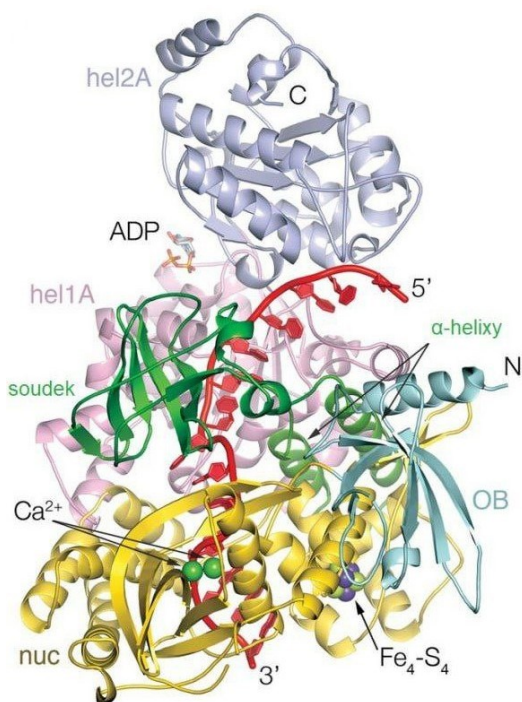
Obrázek 8. Test DNA-polymerázové (+dNTP) a exonukleázové aktivity (-NTP) Pol ϵ . (A) WT, první dva sloupce obsahují kontroly (primery bez přidané Pol ϵ), třetí až pátý sloupec: test exonukleázové aktivity v závislosti na čase, šestý až osmý sloupec: test DNA-polymerázové aktivity v závislosti na čase. (B) Pol ϵ s mutovaným CysX motivem (pořadí sloupců na gelu je shodné jako u A, vyjma času) (upraveno z Lisova et al., 2022).

3.1.2. DNA2

DNA2 je důležitá pro udržování stability genomu, protože odstraňuje dlouhé 5' přesahy během syntézy opoždujícího se řetězce, pozastavuje replikační vidličku během S-fázového checkpointu a je zodpovědná za tvorbu dvouřetězcového zlomu při homologní rekombinaci. Při odstraňování přesahů hrají nezbytnou roli replikační proteiny A (Rpa), které obalují dlouhý úsek ssDNA a DNA2 je na interakci s Rpa závislá (Bae et al., 2001; Cejka et al., 2010; Hu et al., 2012). DNA2 je protein, který má jak nukleázovou, tak i ATP-dependentní 3'-5' DNA helikázovou aktivitu. Nukleázová doména patří do PD-(D/E)XK superskupiny a helikázová doména patří do SF1B superskupiny, protože má charakteristickou motorovou část na C-terminální doméně. Kromě toho, N-terminální doména interaguje s nukleázovou a helikázovou domény a tím inhibuje jejich aktivitu (Budd a Campbell, 1995., Budd et al., 2000., Bae et al., 2001).

Struktura Dna2 má cylindrický tvar. V centrální části je tunel, kterým prochází ssDNA. Bázi Dna2 tvoří kruhová nukleázová doména (žlutě na Obrázku 9), její aktivní část je lokalizována uvnitř tunelu. Nad nukleázou jsou umístěny beta-soudek a 1A helikázová doména. Spolu tvoří prostřední cylindrickou část, kterou také prochází tunel pro ssDNA. 2A helikázová doména se nachází v horní koncové části Dna2 a je nakláněna nad dolním zbytkem struktury. Oligonukleotidy/oligosacharidy vázající (OB) doména se nachází na vnější straně nukleázy. 1B helikázová doména je jako OB doména a beta-soudek spojená s nukleázou. ssDNA je orientována 5' koncem protaženým přes helikázu a 3' koncem protaženým přes nukleázu (Zhou et al., 2015).

Nukleáza má dvojitou specifitu a může fungovat jak v 5'-3' tak i v 3'-5' směru. Dna2 nukleáza vyžaduje ssDNA a není schopna štěpení dsDNA, protože její aktivní místo je příliš úzké. Optimální počet nukleotidu pro započítání štěpení je kolem 15. Tato délka je dána tím, že ke štěpení nukleázou dochází až po navázání ssDNA na helikázovou doménu, protože interakce substrátu s nukleázou není dost silná pro jeho udržování v aktivním místě (Gloor et al., 2012., Zhou et al., 2015, Balakrishnan a Bambara, 2011).



Obrázek 9. Struktura Dna2 s navázanou molekulou DNA. Žlutou barvou je označena nukleázová doména (nuc). Želenou barvou je označen beta-soudek. Bledě modrou barvou je označena OB doména. Růžovou barvou je označena 1A helikázová doména (hel1A). Fialovou barvou je označena 2A helikázová doména (hel2A). Červeným řetězcem je molekula ssDNA, na ni jsou označeny 3' a 5' konce. Na obrázku jsou také znázorněny železo-sirný klastr a Ca^{2+} iont (Zhou et al., 2015).

N-terminální doména nukleázy obsahuje β - α - α strukturu na kterou se váže [4Fe-4S] klastr. Pomocí něho dochází ke spojení s α - α strukturou C-terminální domény. Železo-sirný klastr má za úlohu udržování smyčky překročující tunel pro DNA. Klastr typu [4Fe-4S] je navázan na cysteinový motiv (C519, C768, C771 a C777), jeden

z koordinujících cysteinu se nachází na smyčce vzdálené víc než na 250 aminokyselin (Zhou et al., 2015, Yeeles et al., 2009). Byl proveden pokus na kvasinkové Dna2, při kterém každý z cysteinů byl jednotlivě vyměněn za alanin. Purifikovaný WT protein měl charakteristickou žlutě-hnědou barvu. Mutované proteiny na rozdíl od WT byly bezbarvé, protože chyběly cysteiny vázající železo-sírný klastr, který právě zbarvuje vzorky. Je to charakteristickým rysem pro všechny železo-sírné proteiny. U mutantů v každém cysteinovém zbytku byla změřena nukleázová aktivita. Jak při syntéze Okazakiho fragmentů, tak i při opravách dvouřetězcových zlomů bylo pozorováno výrazné snížení aktivity. WT štěpil >98% substrátu (ssDNA a dvojité přesahy). Mutanty ve zbytcích C519 a C768 štěpili jen 40-50% dvojitých přesahů a 70-80 % substrátu ssDNA. Mutanty ve zbytcích C771 a C777 štěpili <10% dvojitých přesahů a 30–40% ssDNA (Pokharel a Campbell, 2012). Na rozdíl od nukleázové aktivity, afinita mutantních proteinů k jejich DNA substrátů se nelišila od WT, ale rychlost navázání poklesla. Dále bylo stanoveno, že mutace mají negativní vliv na ATPázovou aktivitu helikázové domény, i když jsou tyto domény vzdáleny. Z toho je možné shrnout, že železo-sírný klastr v nukleázové doméně Dna2 je důležitý pro její aktivitu, rychlosti navázání DNA substrátů a také existuje funkční propojení mezi nukleázou a ATPázou (Bruschi et al., 1976., Pokharel a Campbell, 2012).

Jak bylo zmíněno výše, helikázová doména Dna2 patří do rodiny SF1B. Příslušníky této rodiny rozvolňují dsDNA ve směru od 5' konce do 3' konce (Fairman-Williams et al., 2010). Dna2 helikáza je koordinována Van der Waalsovými silami přes leucin a valin smyčky 1A helikázové domény (Saikrishnan et al., 2009). Tato koordinace je důležitá, protože zabraňuje sklouznutí templátu během rozvolnění dvouvlákna. Interakce s molekulou DNA zajišťují proteinové kapsy, které mají hodně hydroxylových a amidových skupin s krátkými postranými řetězci (Saikrishnan et al., 2009). Vazba je zajištěná přes fosfodiesterové skupiny. Doména 2A váže 3 skupiny, doména 1A váže 5-6 skupin. 4 fosfodiesterové skupiny se nachází mezi 2A a 1A, nekontaktují protein (Zhou et al., 2015). Helikáza neobsahuje železo-sírný klastr, a proto nebude podrobně probrána v této práci. Její fungování je zhruba podobné jiným helikázám, jedná z nich je popsána v kapitole 4.2.1.

3.2. Fe-S proteiny při nukleotidové excizní opravě (NER)

NER je jeden z opravných systému organismů, který je důležitý pro udržování integrity genomu. NER je charakterizována schopností opravovat dlouhé DNA léze a také strukturně a chemicky různorodé substráty, jako jsou UV-indukované fotoprodukty, produkty vzniklé působením enviromentálních mutagenů a produkty vzniklé chemoterapeutickými léky. Na začátku reparační dráhy je detekce poškození, která je zajištěna XPC-HR23B faktory. Následuje rozvolnění krátkého úseku dsDNA transkripčním faktorem TFIIH, jehož podjednotkou je XPD helikáza obsahující železo-sírný klastr. V dalším kroku dochází ke vzniku dvouřetězcového zlomu pomocí endonukleázového faktoru ERCC1-XPF. Závěrečným procesem je reparační DNA. Jeho hlavními hráči jsou polymerázy δ nebo ϵ (viz kapitoly 3.1.1b. a 3.1.1c.), které syntetizují chybějící část molekuly, faktory PCNA, RPA, RFC zajišťující procesivitu a DNA ligázy I (Gillet a Scharer, 2006; Kokic et al., 2019).

3.2.1. XPD helikáza

Helikázy SF2 rodiny mají charakteristické sekvenční motivy lokalizované blízko N-terminální domény. Hlavní charakteristikou těchto motivů je přítomnost čtyř cysteinových zbytků, které koordinují železo-sírné klastry. Právě do SF2 rodiny spadá níže popsáný protein XPD (Rudolf et al., 2006; Soultanas et al., 2000).

Ve struktuře XPD helikázy jsou tři hlavní domény. První dvě jsou motorické, které za využití energie z hydrolyzy ATP zajišťují přemísťování DNA. Jejich katalytická místa mají strukturně konzervované motivy, které jsou charakteristické i pro jiné helikázy vázající ATP. Kromě toho, ve struktuře XPD jsou přítomny další kanonické motivy, které interagují s jednovláknovou DNA (ssDNA). V první doméně jsou lokalizovány sekvence, na které se váže železo-sírný klastr. Předpokládá se, že právě tato motorická doména rozvíjí dvouvláknovou DNA (dsDNA), což ukazuje na důležitou roli klastru v tomto procesu. Třetí doména se nazývá Arch doména (Liu et al., 2008).

Helikáza XPD patří do SF2 rodiny a má 5'-3' polaritu. Arch doména se ohýbá přes vrchol první domény, čímž vytváří úzký a velmi bazický kanál, kterým může projít jenom ssDNA. Dále se 5'-ssDNA protahuje přes tento kanál pomocí aktivity motorických domén. Právě průchodem kanálem dochází k rozdělení vláken dsDNA. Během toho procesu ssDNA je udeřována v kanálu Van der Walsovými silami. Na zadní stráně

domény 1 je také bazický povrch. Předpokládá se, že s ním interaguje druhé 3'-DNA vlákno (Liu et al., 2008; White, 2009; Wolski et al., 2008).

Role Fe-S klastrů v lidské XPD zatím není přesně známa. Předpokládá se, že klastry mají strukturální funkce, stabilizují domény během rozvolnění dsDNA. Jinou možností je role Fe-S klastrů v inaktivaci proteinů při oxidativním stresu, to je tzv. redoxsenzitivní funkce (White, 2009).

Byl proveden pokus na archeální XPD. Pomocí elektronové paramagnetické rezonance oxidované XPD *Sulfolobus acidocaldarius* bylo stanoveno, že protein obsahuje železo-sírný klastr. Mutanti bez přítomnosti klastrů vykazují absolutní ztrátu helikázové aktivity ve srovnání s divoký typem (WT), které si tuto aktivitu zachovali. Výsledek tohoto experimentu ukazuje na to, že železo-sírné klastry mají přímý vliv na funkčnost helikázy (Rudolf et al., 2006).

XPD obecně vykazuje nízkou procesivitu při rozvolňování dsDNA a při translokaci ssDNA, kolem 0,3 bp/s. Avšak v průběhu reakce bylo pozorováno zvětšení procesivity do 4 bp/s v některých úsecích. To poukazuje na existenci dvou režimů XPD: rychlý a pomalý. Při pomalém režimu se XPD váže na molekulu DNA nepříliš pevně, což vede k velkému počtu pauz a zpětných kroků. Při rychlém režimu se XPD naopak váže na DNA pevně a tím se zmenšuje počet pauz a zpětných kroků. Bylo pozorováno, že helikáza je většinu času v pomalém režimu, což vysvětluje její nízkou procesivitu (Mao a Mills, 2023). Mutace XPD vyvolává u člověka řadu klinických projevů, jako jsou trichothiodystrofie, xeroderma pigmentosum a Cockaynův syndrom (Gillet a Scharer, 2006).

3.3. Fe-S proteiny při báze excizní opravě (BER)

Na rozdíl od NER, která je schopna opravovat větší úseky DNA, BER odstraňuje jen poškozené báze. Je důležitým mechanismem oprav poškození, které vznikají kvůli nestabilitě DNA a vlivu vnějších a vnitřních mutagenů. Příkladem poškození mohou být ztráty bází DNA, oxidace, metylace bází a jiné chemické poškození (Lindahl, 1993). Oprava začíná tím, že DNA glykosidáza detekuje a odstraňuje poškozenou bázi přerušením N-glykosidové vazby. Následuje štěpení fosfodiesterové vazby pomocí endonukleázy, což vede ke vzniku jednořetězcového zlomu. Na 3'-konci je volná hydroxylová skupina, na 5'-konci je fosfátová skupina. Hydroxylová skupina je nezbytná pro nasednutí DNA polymerázy, která podle druhého nepoškozeného vlákna DNA

dosyntetizuje chybějící úsek. Posledním krokem BER je spojení volných konců DNA ligázou (Dianov a Hubscher, 2013). Opravy pomocí BER se účastní dva železo-sírné enzymy glukosidáza MUTYH a endonukleáza III.

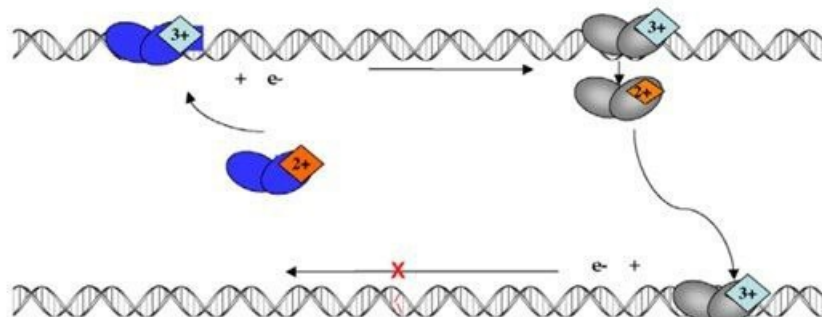
3.3.1. Glykosidáza MUTYH/Endonukleáza III (EndoIII)

MUTYH a EndoIII budou popsány v jedné kapitole, protože mají podobný způsob fungování. Endonukleáza III odstraňuje různorodé oxidované pyrimidiny z DNA (Cunningham et al., 1989). Hlavní funkcí glykosidázy MUTYH při BER opravách je odstraňování adeninů a 2-hydroxy-adeninů, které byly chybně zařazené naproti 7,8-dihydro-8-oxo-guaninům (8-oxoG). 8-oxoG vzniká kvůli poškození DNA vlivem reaktivních forem kyslíků (Au et al., 1988). Oba enzymy mají ve struktuře rozpoznávací DNA poškození motiv šroubovice-vlásačka-šroubovice obsahující železo-sírný klastr (Thayer et al., 1995; Guan et al., 1998).

Katalytická Fe-S část je lokalizována na N-terminální doméně (Manuel a Lloyd, 1997; Guan et al., 1998). Klastr je vázán na cysteinový motiv C-X₆-C-X₂-C-X₅-C (Boal et al., 2007). Na této doméně je lokalizována specifická smyčka tvořená dvěma ze čtyř cysteinů. Kromě cysteinů tato smyčka obsahuje hodně kladně nabitých zbytků. Díky tomu dochází ke snadné interakci s bazickou DNA (Guan et al., 1998). Při mutaci tří kladně nabitých zbytků (dvou lysinu a argininu) na alanin se snižuje afinita MUTYH k poškozené DNA (Chepanoske et al., 2000). Mutací lysinu na kyselinu glutamovou v EndoIII došlo ke zvýšení kladného náboje ve smyčce a tím se zvýšila afinita substrátu a enzymu víc než 100násobně. Tento výsledek ukazuje na to, že smyčka vázající Fe-S klastr se účastní vazby DNA (Thayer et al., 1995). Při navázání DNA nedochází ke změně struktury enzymů. V obou případech je železo-sírný klastr je lokalizován 13Å od nejbližšího atomu fosfátové kostry DNA a 20 Å od aktivního centra enzymů (Boal et al., 2007).

[4Fe-4S] klastr zajišťuje DNA-dependentní přenos elektronů a díky tomu MUTYH a EndoIII vyhledávají poškození způsobem DNA-zprostředkovaného transportu náboje (DNA-CT) (Boal et al., 2007). Díky π -stakům ve dvoušroubovicové DNA během párování je možný přenos náboje na vzdálenosti minimálně 200 Å (Kelley et al., 1999). (Obr. 10). Po navázání DNA dochází k oxidaci na [4Fe-4S]³⁺ formu a uvolněný elektron putuje molekulou DNA. Pokud na ni nejsou poškození, elektron doputuje do jiné glykosidázy obsahující oxidovaný železo-sírný klastr a ten redukuje. Redukovaný protein disociuje z DNA a neredukovaný zůstane navázaný, což má za následek shromažďování

enzymu na poškozené molekule DNA. Pokud DNA bude poškozena, nedojde k transportu elektronu na jinou glykosidázu a tím se odhalí místo poškození (Lukianova a David, 2005, Boal et al., 2005).



Obrázek 10. Schéma fungování DNA-zprostředkovaného transportu náboje. Vlevo nahoře je znázorněn proces oxidace enzymu, putování elektronu nepoškozenou DNA na jiný oxidovaný enzym a jeho následná redukce (vpravo nahoře). Dole je znázorněno, že při poškození DNA nedochází k přenosu elektronu na jiný oxidovaný enzym (upraveno z Boal et al., 2007).

Byla zkoumána redoxní aktivita MUTYH a Endo III vázaných na povrch elektrody modifikované DNA. Byly použity cyklické voltametrické metody a provedeny měření před a po hromadné elektrolýze. Výsledky ukázaly, že při redukčním potenciálu (-350 mV) došlo k oslabení signálu proteinů vázaných na DNA, zatímco při oxidačním potenciálu (+50 mV) došlo ke zvýšení signálu, což naznačuje, že vázání DNA podporuje oxidaci proteinů. Tyto pozorování naznačují, že enzym s oxidovaným klastrem $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ vykazuje vyšší afinitu k DNA než enzym s redukovaným klastrem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (Boal et al., 2005).

3.4. Fe-S proteiny udržující délku telomer

3.4.1. Helikáza RTEL1

RTEL1 má několik důležitých úloh. První je regulace délky telomer a druhou je regulace homologní rekombinace v dělicích se buňkách (Landry a Ding, 2014, Barber et al., 2008). RTEL1 je jedním z paralogů rodiny XPD helikáz a proto má podobnou strukturu jako dříve popsaná helikáza XPD. RTEL1 je 5'→3' DNA helikázou obsahující esenciální doménu pro vázání železo-sírného klastru (White, 2009).

Pokusy na *Mus musculus* a *Mus spretus* identifikovaly RTEL1 jako hlavní faktor kontroly délky telomer (Ding et al., 2004). Telomery *M. musculus* jsou poměrně dlouhé

25-150 kb, zatímco lidské a *M. spretus* telomery jsou kratší 5-15 kb (Kipling a Cooke, 1990, Starling et al., 1990, Cross et al., 1989). Porovnáním genetického kódu obou druhů a potomků jejich křížení byl nalezen faktor prodlužování telomer RTEL1. Delece genu *Rtell* má za následek zkrácení délky telomer kmenových buněk o 68% od délky WT. Tato delece také vede k defektu orgánů a smrti myši (Ding et al., 2004).

Kromě regulace délky telomer, RTEL1 reguluje homologní rekombinaci. Pomocí RNA interferencí byla snížena exprese mRNA lidského RTEL1 o 90% v porovnání s kontrolou. Delece RTEL1 v lidských buňkách vedla ke zvýšení frekvence opravy homologní rekombinací a zvýšení citlivosti na léčiva poškozující DNA. Působení mitomycinu snižovalo životaschopnost buněk až na polovinu. RTEL1 je také schopen ovlivňovat reakce homologní rekombinace. RTEL1 působí jako inhibiční faktor, který narušuje strukturu D-smyčky intermediátů. RTEL1 je schopen rozpouštět tvořené D-smyčky, čímž reverzně ovlivňuje proces rekombinace *in vitro*. Tato aktivita RTEL1 je závislá na ATP hydrolýze. To má za následek potlačení homologní rekombinace (Barber et al., 2008).

Struktura lidské RTEL1 obsahuje na N-terminální doméně [4Fe-4S] klastr vázaný přes čtyři cysteinové zbytky (White a Dillingham, 2012). N-terminální doména lidského RTEL1 byla exprimována v buňkách *E. coli* a vyčištěna. Purifikovaný protein měl červeně-hnědou barvu, což poukazuje na přítomnost železa. Absorpční měření ukázaly na přítomnost železo-sírného klastru s absorpčním vrcholem při 415 nm (absorpční vrchol kolem 415 nm je charakteristický pro klastry typu [4Fe-4S]). [4Fe-4S] klastr má redoxní aktivitu. Přidáním dithionicitanu sodného do roztoku s N-terminální doménou RTEL1 byl eliminován absorpční vrchol železo-sírného klastru. Reoxidace klastru kyslíkem obnovila absorpční vrchol. Elektronová paramagnetická resonance potvrdila schopnost reverzibilní redukci klastru (Landry a Ding, 2014).

Funkce [4Fe-4S] klastru v RTEL1 zatím není známa. Předpokládá se, že za fyziologických podmínek železo-sírný klastr je redukován, ale v případě oxidativního stresu nebo apoptózy se plně oxiduje. Tato oxidace může ovlivnit DNA helikázovou aktivitu RTEL1 prostřednictvím redoxních signálů. Fluktuace intracelulárního redoxního potenciálu tak může ovlivnit aktivitu RTEL1 změnou redoxního stavu železo-sírového klastru (Landry a Ding, 2014).

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout současné poznatky o drahách biosyntézy jaderných železo-sírných proteinů a jejich funkcích v buňkách. Ačkoli se ISC a CIA dráhy doposud aktivně zkoumají, byl již definován základní mechanismus tvorby železo-sírných klastrů u modelových organismů. Mnoho proteinů těchto drah je konzervováno napříč eukaryoty. K takovým proteinům patří desulfuráza NFS1, donory elektronů FDX2, scaffold ISCU a chaperonový systém HSPA9-HSC20 u ISC dráhy a NBP35-CFD1 scaffold, CIAO3 dopravní protein a CIAO1-CIAO2B targeting faktory u CIA dráhy. Vzhledem k tomu lze očekávat, že průběh biogeneze železo-sírných klastrů je také u všech eukaryot podobný. V mitochondrii v časně ISC dráze je z Fe^{2+} a síry uvolněné z cysteinu na scaffold proteinu ISCU sestaven $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ klastr. Následně tento klastr může být maturován pomocí pozdní ISC do $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastru pro mitochondriální proteiny nebo dochází k transportu dodnes neznámého intermediátu $(\text{Fe}-\text{S})_{\text{int}}$ do cytosolu. V cytosolu se z $(\text{Fe}-\text{S})_{\text{int}}$ v CIA dráze formuje na heterotetramerním CFD1-NBP35 scaffoldu $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr. Ten je následně cíleně inkorporován do cytosolických nebo jaderných apoproteinů. Hlavním tajemstvím dodnes zůstává neznámý intermediát $(\text{Fe}-\text{S})_{\text{int}}$, na kterém je závislá CIA dráha. Jeho struktura ještě nebyla objevena, ale již víme, že by měl obsahovat jak síru, tak i železo (Pandey et al., 2019). U MRO je v tom ohledu ještě víc nejasností, protože např. u *G. intestinalis* není transportér ABCB7, kterým jsou propojeny dvě dráhy biosyntézy klastrů, vůbec přítomen. Objevení alternativního transportéru či jiného způsobu propojení ISC a CIA drah by bylo velkým přínosem v pochopení biosyntézy železo-sírných klastrů u tohoto organismu.

Železo-sírné klastry jsou kofaktory jaderných proteinů, ve kterých mají různorodé úlohy. V regulační podjednotce primázy $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr moduluje interakci katalytické podjednotky se substrátem pomocí přepínání redoxního potenciálu. Ve struktuře Pol δ hraje $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr strukturální roli a přispívá ke stabilitě interakce katalytické a strukturálních podjednotek. $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr Pol ϵ je zodpovědný za regulaci interakce katalytické domény s DNA substrátem. U DNA2, která se podílí na opravě genomu, zvyšuje klastr její aktivitu nukleázové domény a také nepřímo ovlivňuje ATPázovou aktivitu helikázové domény. Zajímavou funkci má $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ klastr v katalytické části MUTYH a EndoIII, kde mechanismem DNA-CT umožňuje vyhledávání poškozené DNA. U některých proteinů, jako například u helikázy RTEL1 funkce klastru zatím není známá, zatímco u jiných, jako např. Pol δ , Pol ϵ a DNA2, známe efekty absence klastru,

ale přesný mechanismus jejich fungování také dodnes není objeven. Proto je zde stále prostor pro další experimenty, které by se měly zabývat přesným mechanismem fungování [4Fe-4S] klastrů v jaderných proteinech a funkcí těchto klastrů v buňkách dalších, méně zkoumaných, organismů. Zajímavým a důležitým směrem tohoto oboru bude studium biosyntézy železo-sirných klastrů u organismů s MRO, protože ty mají pouze základní soustavu proteinů ISC a CIA drah. Prozkoumání jejich vlivu na jaderné železo-sirné proteiny může přinést důležité poznatky i z evolučního hlediska. Právě výzkumem ISC a CIA drah u *G. intestinalis* se zabývá naše laboratoř, a vliv jednotlivých proteinů CIA dráhy na klastrování jaderných proteinů by měl být předmětem mého dalšího výzkumu.

5. Seznam zkratek

8-oxoG – 7,8-dyhydro-8-oxo-guanin

BER – *base excision repair*, bázová excizní oprava

CIA – *cytosolic iron-sulfur protein assembly*, cytosolická dráha maturace železo-sirných proteinů

CTD – C-terminální doména

DNA-CT – *DNA charge transport*, DNA-zprostředkový transport náboje

dsDNA – *double-stranded DNA*, dvouvláknová DNA

EMSA – *electrophoresis mobility shift assay*, gelová zpomalovací analýza

ISC assembly – *iron-sulfur cluster assembly*, dráha vzniku železo-sirných klastrů

MRO – *mitochondrion-related organelles*, od mitochondrie odvozené organely

NER – *nucleotid excision repair*, nukleotidová excizní oprava

NIA – NFS1-ISD11-ACPI

PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*, jaderný antigen proliferujících buněk

pol – polymeráza

Rpa – *Replication protein A*, replikační protein A

ssDNA – *single-stranded DNA*, jednovláknová DNA

WT – *wild-type*, divoký typ

7. Seznam použité literatury

Review jsou označeny symbolem *

ADAM A. C., BORNHÖVD C., PROKISCH H., NEUPERT W., HELL K. (2006): The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J*, 25, 1, 174-83.

ADROVER M., HOWES B. D., IANNUZZI C., SMULEVICH G., PASTORE A. (2015): Anatomy of an iron-sulfur cluster scaffold protein: understanding the determinants of [2Fe-2S] cluster stability on IscU. *Biochim Biophys Acta*, 1853, 6, 1448–1456.

AGARKAR V. B., BABAYEVA N. D., PAVLOV Y. I., TAHIROV T. H. (2011): Crystal structure of the C-terminal domain of human DNA primase large subunit: Implications for the mechanism of the primase-polymerase α switch. *Cell Cycle*, 10, 6, 926-21.

ALORIA K., SCHILKE B., ANDREW A., CRAIG E. A. (2004): Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable *in vivo*. *EMBO Rep*, 5, 11, 1096–1101.

ANDREW A. J., DUTKIEWICZ R., KNIESZNER H., CRAIG E. A., MARSZALEK J. (2006): Characterization of the Interaction between the J-protein Jac1p and the Scaffold for Fe-S Cluster Biogenesis, Isu1p. *J Biol Chem*, 281, 21, 14580–14587.

ASTURIAS F. J., CHEUNG I. K., SABOURI N., CHILKOVA O., WEPPLD D., JOHANSSON E. (2006): Structure of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 1, 35-43.

AU K. G., CABRERA M., MILLER J. H., MODRICH P. (1998): *Escherichia coli* mutY gene product is required for specific A-G-C-G mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 23, 9163-9166.

BAE S. H., BAE K. H., KIM J. A., SEO Y. S. (2001): RPA governs endonuclease switching during processing of okazaki fragments in eukaryotes. *Nature*, 412, 6845, 456-61.

BAE S. H., KIM J. A., CHOI E., LEE K.H., KANG H. Y., KIM H. D., KIM J. H., BAE K. H., CHO Y., PARK C. (2001): Tripartite structure of *Saccharomyces cerevisiae* Dna2 helicase/endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 29, 14, 3069-79.

BALAKRISHNAN L., BAMBARA R. (2011): Eukaryotic lagging strand DNA replication employs a multi-pathway mechanism that protects genome integrity. *J Biol Chem*, 286, 9, 6865-70.*

BALK J., PIERIK A. J., AGUILAR NETZ D., MÜHLENHOFF U., LILL R. (2004): The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *EMBO J*, 23, 10, 2105–2115.

BARBER L. J., YOUDS J. L., WARD J. D., MCILWRAITH M. J., O'NEIL N. J., PETALCORIN M. I. R., MARTIN J. S., COLLIS S. J., CANTOR S. B., AUCLAIR M., TISSENBAUM H., WEST S. C., ROSE A. M., BOULTON S. J. (2008): RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell*, 135, 2, 261-271.

BEINERT H., HOLM R. H., MUNK E. (1997): Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular, Multipurpose Structures. *Science*, 277, 5326, 653-659.*

BIEDERBICK, A., STEHLING, O., RÖSSER, R., NIGGEMEYER, B., NAKAI, Y., ELSÄSSER, H.-P., LILL, R. (2006): Role of human mitochondrial Nfs1 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis and iron regulation. *Mol Cell Biol*, 26, 15, 5675-87.

- BELTRÁN N. C., HORVÁTHOVÁ L., JEDELSKÝ P. L., ŠEDINOVÁ M., RADA P., MARCINČIKOVÁ M., HRDÝ I., TACHEZY J. (2013): Iron-induced changes in the proteome of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. *PLoS One*, 8, 5, e65148.
- BOAL A. K., YAVIN E., BARTON J. K. (2007): DNA repair glycosylases with a [4Fe-4S] cluster: a redox cofactor for DNA-mediated charge transport? *J Inorg Biochem*, 101, 11-12, 1913-1921.*
- BOAL A. K., YAVIN E., LUKIANOVA O. A., O'SHEA V. L., DAVID S. S., BARTON J. K. (2005): DNA-Bound Redox Activity of DNA Repair Glycosylases Containing [4Fe-4S] Clusters. *Biochemistry*, 44, 23, 8397-8407.
- BRAYMER J. J., FREIBERT S. A., RAKWALSKA-BANGE M., LILL R. (2021): Mechanistic concepts of iron-sulfur protein biogenesis in Biology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868, 1, 118863.*
- BRUSCHI M., HATCHIKIAN C., LE GALL J., MOURA J. J., XAVIER A. V. (1976): Purification, characterization and biological activity of three forms of ferredoxin from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *Biochim Biophys Acta*, 449, 2, 275-84.
- BUDD M. E., CAMPBELL J. L. (1995): A yeast gene required for DNA replication encodes a protein with homology to DNA helicases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 17, 7642-6.
- BUDD M. E., CHOE W., CAMPBELL J. L. (2000): The nuclease activity of the yeast DNA2 protein, which is related to the RecB-like nucleases, is essential *in vivo*. *J Biol Chem*, 275, 22, 16518-29.
- CAMASCHELLA C., CAMPANELLA A., FALCO L., BOSCHETTO L., MERLINI R., SILVESTRI L., LEVI S., IOLASCON A. (2007): The human counterpart of zebrafish *shiraz* shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, 110, 4, 1353-1358.
- CARLTON J. M., HIRT R. P., SILVA J. C., DELCHER A. L., SCHATZ M., ZHAO Q., WORTMAN J. R., BIDWELL S. L., ALSMARK U. C. M., BESTEIRO S., SICHERITZ-PONTEN T., NOEL C. J., DACKS J. B., FOSTER P. G., SIMILLION C., VAN DE PEER Y., MIRANDA-SAAVEDRA D., BARTON G. J., WESTROP G. D., MÜLLER S., DESSI D., FIORI P. L., REN Q., PAULSEN I., ZHANG H., BASTIDA-CORCUERA F. D., SIMOES-BARBOSA A., BROWN M. T., HAYES R. D., MUKHERJEE M., OKUMURA C. Y., SCHNEIDER R., SMITH A. J., VANACOVA S., VILLALVAZO M., HAAS B. J., PERTEA M., FELDBLYUM T. V., UTTERBACK T. R., SHU C. L., OSOEGAWA K., DE JONG P. J., HRDY I., HORVATHOVA L., ZUBACOVA Z., DOLEZAL P., MALIK S. B., LOGSDON JR J. M., HENZE K., GUPTA A., WANG C. C., DUNNE R. L., UPCROFT J. A., UPCROFT P., WHITE O., SALZBERG S. L., TANG P., CHIU C. H., LEE Y. S., EMBLEY T. M., COOMBS G. H., MOTTRAM J. C., TACHEZY J., FRASER-LIGGETT C. M., JOHNSON P. J. (2007): Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315, 5809, 207-12.
- CEJKA P., CANNAVO E., POLACZEK P., MASUDA-SASA T., POKHAREL S., CAMPBELL J. L., KOWALCZYKOWSKI S. C. (2010): DNA end resection by Dna2-Sgs1-RPA and its stimulation by Top3-Rmi1 and Mre11-Rad50-Xrs2. *Nature*, 467, 7311, 112-6.
- CIESIELSKI S. J., SCHILKE B. A., OSIPIUK J., BIGELOW L., MULLIGAN R., MAJEWSKA J., JOACHIMIAK A., MARSZALEK J., CRAIG E. A., DUTKIEWICZ R. (2012): Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe-S Scaffold Isu Is Indispensable *In Vivo* and Conserved in Evolution. *J Mol Biol*, 417, 1-2, 1-12.
- COPELAND W. C., TAN X. (1995): Active Site Mapping of the Catalytic Mouse Primase Subunit by Alanine Scanning Mutagenesis. *J Biol Chem*, 270, 8, 3905-13.

- CORY S. A., VAN VRANKEN J. G., BRIGNOLE E. J., PATRA S., WINGE D. R., DRENNAN C. L., RUTTER J., BARONDEAU D. P. (2017): Structure of human Fe-S assembly subcomplex reveals unexpected cysteine desulfurase architecture and acyl-ACP-ISD11 interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114, 27, E5325–E5334.
- CROSS S. H., ALLSHIRE R. C., MCKAY S. J., MCGILL N. I., COOKE H. J. (1989): Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature*, 338, 6218, 771–774.
- CUNNINGHAM R. P., ASAHARA H., BANK J. F., SCHOLES C. P., SALERNO J. C., SURERUS K., MUNCK E., MCCRACKEN J., PEISACH J., EMPTAGE M. H. (1989): Endonuclease III is an iron-sulfur protein. *Biochemistry*, 28, 10, 4450–4455.
- DIANOV G. L., HUBSCHER U. (2013): Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Res*, 41, 6, 3483–90.*
- DING H., SCHERTZER M., WU X., GERTSENSTEIN M., SELIG S., KAMMORI M., POURVALI R., POON S., VULTO I., CHAVEZ E., TAM P. P. L., NAGY A., LANSDROP P. M. (2004): Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell*, 117, 7, 873–886.
- DUTKIEWICZ R., SCHILKE B., CHENG S., KNIESZNER H., CRAIG E. A., MARSZALEK J. (2004): Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their *in vivo* function. *J Biol Chem*, 279, 28, 29167–29174.
- DUTKIEWICZ R., SCHILKE B., KNIESZNER H., WALTER W., CRAIG E. A., MARSZALEK J. (2003): Ssq1, a Mitochondrial Hsp70 Involved in Iron-Sulfur (Fe/S) Center Biogenesis. *J Biol Chem*, 278, 32, 29719–29727.
- FAIRMAN-WILLIAMS M. E., GUENTHER U. P., JANKOWSKY E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, 20, 3, 313–24.*
- FREY A. G., PALENCHAR D. J., WILDEMANN J. D., PHILPOTT C. C. (2016): A Glutaredoxin·Bola Complex Serves as an Iron-Sulfur Cluster Chaperone for the Cytosolic Cluster Assembly Machinery. *J Biol Chem*, 291, 43, 22344–22356.
- GEORGESCU R. E., LANGSTON L., YAO N. Y., YURIEVA O., ZHANG D., FINKELSTEIN J., AGARWAL T., O'DONNELL M. E. (2014): Mechanism of asymmetric polymerase assembly at the eukaryotic replication fork. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 8, 664–70.
- GERVASON S., LARKEM D., MANSOUR A. B., BOTZANOWSKI T., MÜLLER C. S., PECQUEUR L., PAVEC G., DELAUNAY-MOISAN A., BURN O., AGRAMUNT J., GRANDAS A., FONTECAVE M., SCHUNEMANN V., CIANFERANI S., SIZUN C., TOLEDANO M. B., D'AUTREAUX. (2019): Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat Commun*, 10, 1, 3566.
- GILLET L. C., SCHARER O. D. (2006): Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, 106, 2, 253–76.*
- GLOOR J. W., BALAKRISHNAN L., CAMPBELL J. L., BAMBARA R. A. (2012): Biochemical analyses indicate that binding and cleavage specificities define the ordered processing of human okazaki fragments by Dna2 and FEN1. *Nucleic Acids Res*, 40, 14, 6774–86.
- GUAN Y., MANUEL R. C., ARVAI A. S., PARIKH S. S., MOL C. D., MILLER J. H., LLOYD R. S., TAINER J. A. (1998): MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat Struct Biol*, 5, 12, 1058–1064.

- HAUSMANN A., NETZ D. J. A., BALK J., PIERIK A. J., MUHLENHOFF U., LILL R. (2005): The eukaryotic P-loop NTPase Nbp35: an essential component of the cytosolic and nuclear iron-sulfur protein assembly machinery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 9, 3266–3271.
- HU J., SUN L., SHEN F., CHEN Y., HUA Y., LIU Y., ZHANG M., HU Y., WANG Q., XU W., SUN F., JI J., MURRAY J. M., CARR A. M., KONG D. (2012): The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell*, 149, 6, 1221-32.
- CHANDRAMOULI K., JOHNSON M. K. (2006): HscA and HscB Stimulate [2Fe-2S] Cluster Transfer from IscU to Apoferritin in an ATP-Dependent Reaction. *Biochemistry*, 45, 37, 11087–11095.
- CHANET R., BAILLE D., GOLINELLI-COHEN M. P., REQUIRE S., GUTTEN O., LEPOVIRE M., HUANG M. E., VERNIS L. (2021): Fe-S coordination defects in the replicative DNA polymerase delta cause deleterious DNA replication *in vivo* and subsequent DNA damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *G3*, 11, 7, jkab124.
- CHEPANOSKE C. L., GOLINELLI M. P., WILLIAMS S. D., DAVID S. S. (2000): Positively charged residues within the iron-sulfur cluster loop of *E. coli* MutY participate in damage recognition and removal. *Arch Biochem Biophys*, 380, 1, 11-19.
- CHRISTENSON E. T., GALLEGOS A. S., BANERJEE A. (2017): *In vitro* reconstitution, functional dissection, and mutational analysis of metal ion transport by mitoferrin-1. *J Biol Chem*, 293, 10, 3819-3828.
- IYER L. M., KOONIN E. V., LEIPE D. D., ARAVIND L. (2005): Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: Structural insights and new members. *Nucleic Acids Res*, 33, 12, 3875-96.
- JAIN R., VANAMEE E. S., DZIKOVSKI B. G., BUKU A., JOHNSON R. E., PRAKASH L., PRAKASH S., AGGARWAL A. K. (2014): An iron-sulfur cluster in the polymerase domain of yeast DNA polymerase ϵ . *J Mol Biol*, 426, 2, 301-8.
- JEDELSKY P. L., DOLEZAL P., RADA P., PYRIH J., SMID O., HRDY I., SEDINOVA M., MARCINIKOVA M., VOLEMAN L., PERRY A. J., BELTRAN N. C., LITHGOW T., TACHEZY J. (2011): The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One*, 6, 2, e17285.
- JEOUNG J. H., DOBBEK H. (2018): ATP-dependent substrate reduction at an [Fe8S9] double-cubane cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, 12, 2994-2999.
- JOHNSON M. K. (1998): Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr Opin Chem Biol*, 2, 2, 173-181.*
- JOZWIAKOWSKI S. K., KUMMER S., KERSTIN G. (2019): Human DNA polymerase delta requires an iron-sulfur cluster for high-fidelity DNA synthesis. *Life Sci Alliance*, 2, 4, e201900321.
- KASSUBE S. A., THOMA N. H. (2020): Structural insights into Fe-S protein biogenesis by the CIA targeting complex. *Nat Struct Mol Biol*, 27, 8, 735–742.
- KELLEY, S. O., BARTON, J. K. (1999): Electron transfer between bases in double helical DNA. *Science*, 283, 5400, 375-381.
- KILKENNY M. L., LONGO M. A., PERERA R. L., PELLEGRINI L. (2013): Structures of human primase reveal design of nucleotide elongation site and mode of Pol α tethering. *Proc Natl Acad Sci*, 110, 40, 15961-6.

- KIM J. H., FUZERY A. K., TONELLI M., TA D. T., WESTLER W. M., VICKERY L. E., MARKLEY J. L. (2009): Structure and dynamics of the iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU and its interaction with the cochaperone HscB. *Biochemistry*, 48, 26, 6062–6071.
- KIPLING D., COOKE H. J. (1990): Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347, 6291, 400–402.
- KISPAL G., CSERE P., PROHL C., LILL R. (1999): The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J*, 18, 14, 3981-9.
- KLINGE S., HIRST J., MAMAN J. D., KRUDE T., PELLEGRINI L. (2007): An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 9, 875-7.
- KOKIC G., CHERNEV A., TEGUNOV D., DIENEMANN C., URLAUB H., CRAMER P. (2019): Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair. *Nat Commun*, 10, 1, 2885.
- KOUSSA N.C., SMITH D.J. (2021): Limiting DNA polymerase delta alters replication dynamics and leads to a dependence on checkpoint activation and recombination-mediated DNA repair. *PLoS Genet*, 17, 1, e1009322.
- KUCHTA R. D., STENGEL G. (2010): Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 5, 1180-9.*
- KUNKEL T. A., BURGERS P. M. (2014): Delivering nonidentical twins. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 8, 649-51.
- LANDRY A. P., DING H. (2014): The N-Terminal Domain of Human DNA Helicase Rtel1 Contains a Redox Active Iron-Sulfur Cluster. *Biomed Res Int*, 2014, 285791.
- LANGE H., KAUT A., KISPAL G., LILL R. (2000): A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3, 1050–1055.
- LINDAHL T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 6422, 709-15.*
- LINDMARK D. G., MÜLLER M. (1973): Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem*, 248, 22, 7724-8.
- LISOVA A. E., BARANOVSKIY A. G., MORSTADT L. M., BABAYEVA N. D., STEPCHENKOVA E. I. A., TAHIROV T. H. (2022): The iron-sulfur cluster is essential for DNA binding by human DNA polymerase ϵ . *Sci Rep*, 12, 1, 17436.
- LIU H., RUDOLF J., JOHNSON K. A., MCMAHON S. A., OKE M., CARTER L., MCROBBIE A., BROWN S. E., NAISMITH J. H., WHITE M. F. (2008): Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell*, 133, 5, 801-12.
- LUKIANOVA O. A., DAVID S. S. (2005): A role for iron-sulfur clusters in DNA repair. *Curr Opin Chem Biol*, 9, 2, 145-151.*
- MAKIUCHI T., NOZAKI T. (2014): Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie*, 100, 3–17.*
- MANICKI M., MAJEWSKA J., CIESIELSKI S., SCHILKE B., BLENSKA A., KOMINEK J., MARSZALEK J., CRAIG E. A., DUTKIEWICZ R. (2014): Overlapping Binding Sites of the Frataxin Homologue Assembly Factor and the Heat Shock Protein 70 Transfer Factor on the Isu Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein. *J Biol Chem*, 289, 44, 30268–30278.

- MANUEL R. C., LLOYD R. S. (1997): Cloning, overexpression, and biochemical characterization of the catalytic domain of MutY. *Biochemistry*, 36, 37, 11140-11152.
- MAO C., MILLS M. (2023): Characterization of human XPD helicase activity with Single Molecule Magnetic Tweezers. *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.02.07.527508>
- MENDEL R. R., HERCHER T. W., ZUPOK A., HASNAT M. A., LEIMKÜHLER S. (2020): The requirement of inorganic Fe-S clusters for the biosynthesis of the organometallic molybdenum cofactor. *Inorganics*, 8, 7, 43.*
- MORRISON A., BELL J. B., KUNKEL T. A., SUGINO A. (1991): Eukaryotic DNA polymerase amino acid sequence required for 3'-5' exonuclease activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 21, 9473-7.
- MOTYČKOVÁ A., VOLEMAN L., NAJDROVÁ V., MARKOVÁ L., BENDA M., DOHNÁLEK V., JANOWICZ N., MALYCH R., ŠUŤÁK R., ETTEMA T. J. G., SVÄRD S., STAIRS C. W., DOLEŽAL P. (2022): The late ISC pathway interactome reveals mitochondrial-cytoplasmic crosstalk in *Giardia intestinalis*. *BioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502261>.
- NETZ D. J. A., GENAU H. M., WEILER B. D., BILL E., PIERIK A. J., LILL R. (2016): The conserved protein Dre2 uses essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters for its function in cytosolic iron-sulfur protein assembly. *Biochem J*, 473, 14, 2073-2085.
- NETZ D. J. A., MASCARENHAS J., STHELING O., PIERIK A. J., LILL R. (2013): Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol*, 24, 5, 303-12.*
- NETZ D. J. A., STITH C. M., STUMPFIG M., KOPF G., VOGEL D., GENAU H. M., STODOLA J. L., LILL R., BURGERS P. M. J., PIERIK A. (2011): Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol*, 8, 1, 125-32.
- NETZ D. J. A., STUMPFIG M., DORE C., MUHLENHOFF U., PIERIK A. J., LILL R. (2010): Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat Chem Biol*, 6, 10, 758-765.
- NETZ D. J., PIERIK A. J., STÜMPFIG M., BILL E., SHARMA A. K., PALLESEN L. J., WALDEN W. E., LILL R. (2012): A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *J Biol Chem*, 287, 15, 12365-12378.
- NETZ D.J., PIERIK A.J., STÜMPFIG M., MÜHLENHOFF U., LILL R. (2007): The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat Chem Biol*, 3, 5, 278-286.
- NICOLET Y., PIRAS C., LEGRAND P., HATCHIKIAN C. E., FONTECILLA-CAMPS J. C. (1999): *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: The structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, 7, 1, 13-23.
- O'BRIEN E., HOLT M. E., THOMPSON M. K., SALAY L. E., EHLINGER A. C., CHAZIN W. J., BARTON J. (2017): The [4Fe4S] cluster of human DNA primase functions as a redox switch using DNA charge transport. *Science*, 355, 6327, eaag1789.
- O'BRIEN E., SALAY L. E., EPUM E. A., FRIEDMAN K. L., CHAZIN W. J., BARTON J. K. (2018): Yeast require redox switching in DNA primase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115, 52, 13186-13191.
- OHKI Y., IMADA M., MURATA A., SUNADA Y., OHTA S., HONDA M., SASAMORI T., TOKITOH N., KATADA M., TATSUMI K. (2009): Synthesis, Structures, and Electronic

Properties of [8Fe-7S] Cluster Complexes Modeling the Nitrogenase P-Cluster. *J Am Chem Soc*, 131, 36, 13168–13178.

PANDEY A. K., PAIN J., DANCIS A., PAIN D. (2019): Mitochondria export iron-sulfur and sulfur intermediates to the cytoplasm for iron-sulfur cluster assembly and tRNA thiolation in yeast. *J Biol Chem*, 294, 24, 9489–9502.

POKHAREL S., CAMPBELL J. L. (2012): Cross talk between the nuclease and helicase activities of Dna2: role of an essential iron–sulfur cluster domain. *Nucleic Acid Res*, 40, 16, 7821-30.

PRITTS J. D., MICHEL S. L. J. (2022): Fe-S clusters masquerading as zinc finger proteins. *J Inorg Biochem*, 230, 111756.*

PURSELL Z. F., ISOZ I., LUNDSTROM E. B., JOHANSSON E., KUNKEL T. A. (2007): Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science*, 317, 5834, 127-30.

PYRIH J., PYRIHOVÁ E., KOLÍSKO M., STOJANOVOVÁ D., BASU S., HARANT K., HAINDRICH A. C., DOLEŽAL P., LUKEŠ J., ROGER A., TACHEZY J. (2016): Minimal cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery of *Giardia intestinalis* is partially associated with mitosomes, *Mol Microbiol*, 102, 4, 701–714.

RODRIGUEZ-MANZANEQUE M. T., TAMARIT J., BELLI G., ROS J., HERRERO E. (2002): Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell*, 13, 4, 1109–1121.

RUDOLF J., MAKRANTONI V., INGLEDEW W. J., STARK M. J. R., WHITE M. F. (2006): The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell*, 23, 6, 801-8.

SAIKRISHNAN K., POWELL B., COOK N. J., WEBB M. R., WIGLEY D. B. (2009): Mechanistic basis of 5′- 3′ translocation in SF1B helicases. *Cell*, 137, 5, 849–859.

SHAKAMURI P., ZHANG B., JOHNSON M. K. (2012): Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe₂S₂] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *J Am Chem Soc*, 134, 37, 15213–15216.

SHI R., HOU W., WANG Z. Q., XU X. (2021): Biogenesis of Iron–Sulfur Clusters and Their Role in DNA Metabolism. *Front Cell Dev Biol*, 9, 735678.

SMITH D. J., WHITEHOUSE I. (2012): Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly. *Nature*, 483, 7390, 434-8.

SONTZ P. A., MUI T. P., FUSS J. O., TAINER J. A., BARTON J. K. (2012): DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 6, 1856-61.

SOULTANAS P., DILLINGHAM M. S., WILEY P., WEBB M. R., WIGLEY D. B. (2000): Uncoupling DNA translocation and helicase activity in PcrA: direct evidence for an active mechanism. *EMBO J*, 19, 14, 3799-810.

STARLING J. A., MAULE J., HASTIE N. D., ALLSHIRE R. C. (1990): Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res*, 18, 23, 6881–6888.

STEHLING O., MASCARENHAS J., VASHISHT A. A., SHEFTEL A. D., NIGGEMEYER B., RÖSSER R., PIERIK A. J., WOHLSCHLEGEL J. A., LILL R. (2013): Human CIA2A-FAM96A and CIA2B-FAM96B integrate iron homeostasis and maturation of different subsets of cytosolic-nuclear iron-sulfur proteins. *Cell Metab*, 18, 2, 187–198.

- STEHLING O., VASHISHT A. A., MASCARENHAS J., JONSSON Z. O., SHARMA T., NETZ D. J., PIERIK A. J., WOHLSCHEGEL J. A., LILL R. (2012): MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science*, 337, 6091, 195–199.
- STODOLA J. L., BURGERS P. M. (2016): Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 5, 402–8.
- TER BEEK J., PARKASH V., BYLUND G. O., OSTERMAN P., SAUER-ERIKSSON A. E., JOHANSSON E. (2019): Structural evidence for an essential Fe–S cluster in the catalytic core domain of DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acid Res*, 47, 11, 5712–5722.
- THAYER M. M., AHERN H., XING D., CUNNINGHAM R. P., TAINER J. A. (1995): Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J*, 14, 16, 4108–4120.
- TSAOUSIS A.D., KUNJI E.R., GOLDBERG A.V., LUCOCQ J.M., HIRT R.P., EMBLEY T.M. (2008): A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 453, 7194, 553–556.
- URZICA E., PIERIK A. J., MÜHLENHOFF U., LILL R. (2009): Crucial role of conserved cysteine residues in the assembly of two iron-sulfur clusters on the CIA protein Nar1. *Biochemistry*, 48, 22, 4946–4958.
- UZARSKA M. A., DUTKIEWICZ R., FREIBERT S. A., LILL R., MUHLENHOF U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol Biol Cell*, 24, 12, 1830–1841.
- VARGOVÁ R., HANOUSKOVÁ P., SALAMONOVÁ J., ŽIHALA D., SLIBERMAN J. D., ELIÁŠ M., ČEPIČKA I. (2022): Evidence for an Independent Hydrogenosome-to-Mitosome Transition in the CL3 Lineage of Fornicates. *Front Microbiol*, 19, 13, 866459.
- VAN VRANKEN J. G., JEONG M. Y., WEI P., CHEN Y.C., GYGI S. P., WINGE D. R., RUTTER J. (2016): The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *eLife*, 5, e17828.
- WEERAPANA E., WANG C., SIMON G. M., RICHTER F., KHARE S., DILLON M. B. D., BACHOVCHIN D. A., MOWEN K., BAKER D., CRAVATT B. F. (2010): Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature*, 468, 7325, 790–795.
- WHITE M. F. (2009): Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. *Biochem Soc Trans*, 37, 3, 547–551.
- WHITE M. F., DILLINGHAM M. S. (2012): Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr Opin Struct Biol*, 22, 1, 94–100.*
- WIESENBERGER G., LINK T. A., AHSEN U., WALDHERR M., SCHWEYEN R. J. (1991): MRS3 and MRS4, Two Suppressors of mtRNA Splicing Defects in Yeast, are New Members of the Mitochondrial Carrier Family. *J Mol Biol*, 217, 1, 23–37.
- WOLSKI S. C., KUPER J., HÄNZELMANN P., TRUGLIO J. J., CROTEAU D. L., VAN HOUTEN B., KISKER C. (2008): Crystal structure of the FeS cluster-containing nucleotide excision repair helicase XPD. *PLoS Biol*, 6, 6, 1332–1342.
- YE H., JEONG S. Y., GHOSH M. C., KOVTUNOVYCH G., SILVESTRI L., ORTILLO D., UCHIDA N., TISDALE J., CAMASCHELLA C., ROUAULT T. A. (2010): Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J Clin Invest*, 120, 5, 1749–1761.

- YEELES J. T., CAMMACK R., DILLINGHAM M. S. (2009): An iron-sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase-nucleases. *J Biol Chem*, 284, 12, 7746-55.
- YOON H., KNIGHT S. A. B., PANDEY A., PAIN J., ZHANG Y., PAIN D., DANCIS A. (2014): Frataxin-bypassing Isu1: characterization of the bypass activity in cells and mitochondria. *Biochem J*, 459, 1, 71–81.
- YUAN Z., GEORGESCU R., SCHAUER G. D., O'DONNELL M. E., LI H. (2020): Structure of the polymerase ϵ holoenzyme and atomic model of the leading strand replisome. *Nat Commun*, 11, 1, 3156.
- YUTIN N., MAKAROVA K. S., MEKHEDOV S. L., WOLF Y. I., KOONIN E. V. (2008): The deep archaeal roots of eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 25, 8, 1619–30.
- ZERBE L. K., KUCHTA R. D. (2002): The p58 subunit of human DNA primase is important for primer initiation, elongation, and counting. *Biochemistry*, 41, 15, 4891-900.
- ZHANG Y., BARANOVSKIY A. G., THAIROV T. H., PAVLOV Y. I. (2014): The C-terminal domain of the DNA polymerase catalytic subunit regulates the primase and polymerase activities of the human DNA polymerase α -primase complex. *J Biol Chem*, 289, 32, 22021-34.
- ZHENG L., WHITE R. H., CASH V. L., JACK R. F., DEAN D. R. (1993): Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 7, 2754–2758.
- ZHOU C., POURMAL S., PAVLETICH N. P. (2015): Dna2 nuclease-helicase structure, mechanism and regulation by Rpa. *eLife*, 4, e09832.