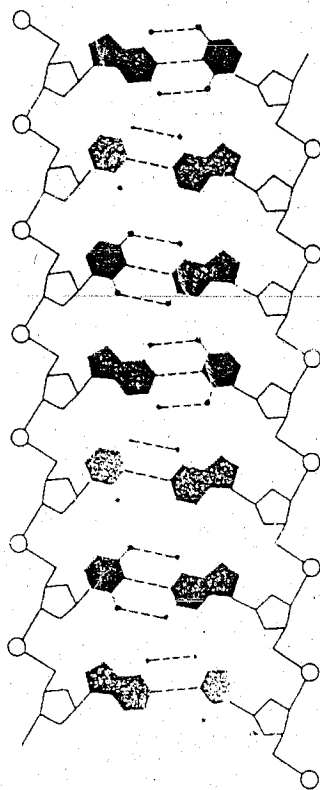
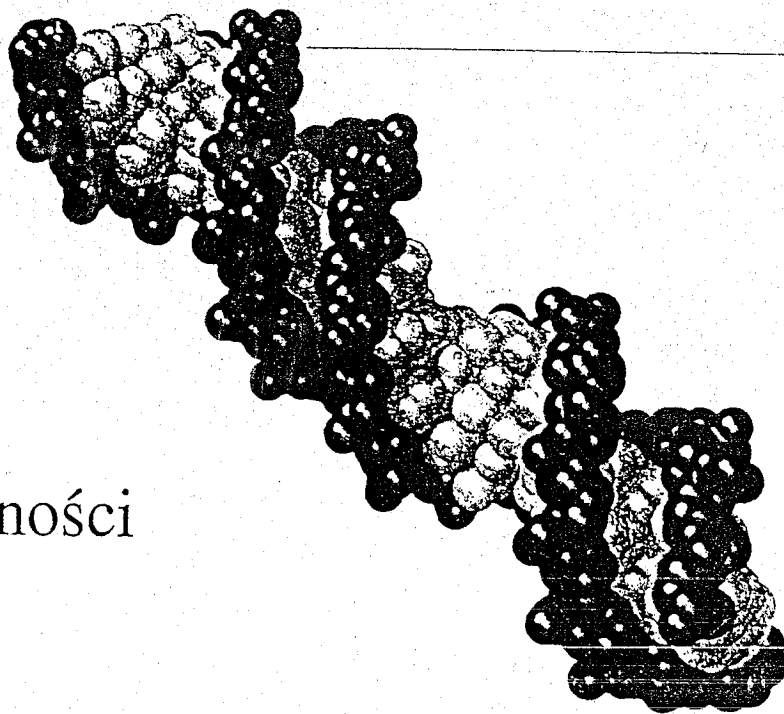


DNA i RNA: cząsteczki dziedziczności



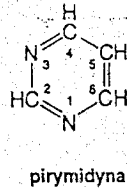
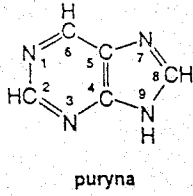
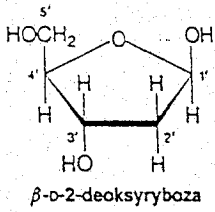
DNA jest bardzo długą makrocząsteczką podobną do nici, zbudowaną z wielkiej liczby deoksyrybonukleotydów, z których każdy składa się z zasady, cukru i grupy fosforanowej. *Nośnikiem informacji genetycznej są zasady zawarte w cząsteczkach DNA, podczas gdy reszty cukrowe i fosforanowe pełnią rolę strukturalną.* Niniejszy rozdział przedstawia kluczowe doświadczenia, które ujawniły, że materiałem genetycznym jest właśnie DNA. W dalszym ciągu rozdział ten opisuje budowę dwuniciowej helisy DNA. Z chwilą odkrycia tej struktury komplementarny charakter jej dwóch łańcuchów sugerował bezpośrednio, że każdy z nich jest matrycą dla drugiego podczas replikacji DNA. Replikację katalizują enzymy, zwane polimerazami DNA, które w procesie tym czerpią instrukcje od matrycowych łańcuchów DNA. Enzymy te są doskonale specyficzne i replikując DNA popełniają błędy z częstością mniejszą niż 1 na 100 milionów nukleotydów. Z DNA są zbudowane geny wszystkich komórek oraz wielu wirusów. Niektóre wirusy jako materiał genetyczny wykorzystują jednak RNA (kwas rybonukleinowy). Przykłady genetycznej roli RNA w wirusach roślinnych i wirusach nowotworów zwierzęcych są przedstawione w końcowej części tego rozdziału.

DNA składa się z 4 rodzajów zasad przyłączonych do rdzenia cukrowo-fosforanowego

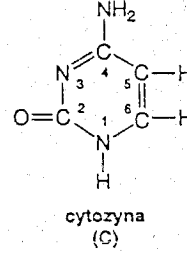
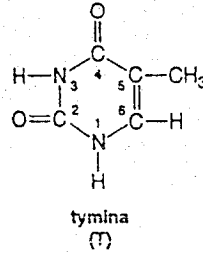
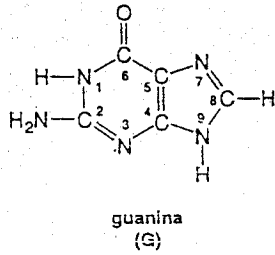
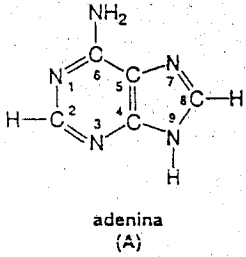
DNA jest polimerem zbudowanym z jednostek monomerycznych — deoksyrybonukleotydów. Każdy *nukleotyd* składa się z zasady azotowej, cukru oraz z jednej lub więcej grup fosforanowych. Cukrem występującym w deoksyrybonukleotydach jest *deoksyryboza*. Przedrostek *deoksy* oznacza, że w cząsteczce tego cukru brak jednego z atomów tlenu zawartych

Rysunek tytułowy: Model dwuniciowej helisy DNA. Intensywnymi kolorami przedstawiono łańcuchy fosforanowo-rybozowe, a zasady kolorami rozjaśnionymi.

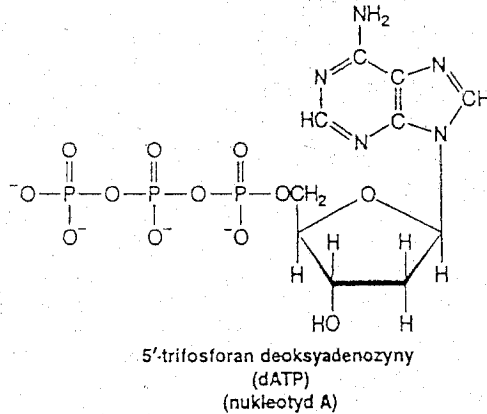
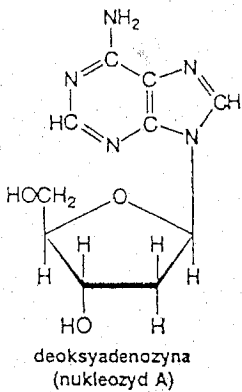
Rys. 4-1. Schemat struktury DNA. Szkielet cukrowo-fosforanowy — kolor czarny, zasady — inne kolory. [Według: A. Kornberg, *The synthesis of DNA*. Copyright © 1968 by Scientific American, Inc. All rights reserved]



w związku wyjściowym, tj. w rybozie. Zasadami azotowymi są pochodne *puryny* lub *pirymidyny*. Zasadami purynowymi w DNA są *adenina* (A) i *guanina* (G), a pirymidynowymi — *tymina* (T) i *cytozyna* (C).



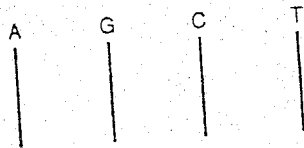
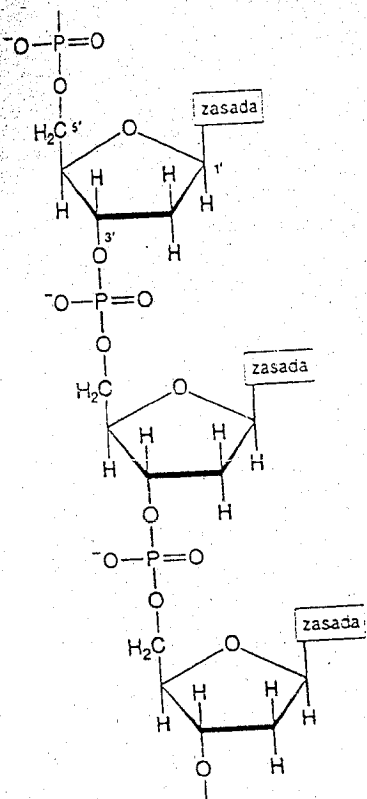
Związek zasady purynowej lub pirymidynowej z cukrem nazywamy *nukleozydem*. W DNA występują 4 rodzaje nukleozydów: *deoksyadenozyna*, *deoksyguanozyna*, *deoksytymidyna* i *deoksytydyna*. W deoksyrybonukleozydach N-9 zasady purynowej lub N-1 zasady pirymidynowej jest związany z C-1 deoksyrybozy. Utworzone w ten sposób wiązanie N-glikozydowe ma konfigurację β (zasada leży nad płaszczyzną pierścienia cukru). Ester nukleozydu i kwasu fosforowego nazywamy *nukleotydem*. Najczęstszym miejscem estryfikacji w nukleotydach występujących w przyrodzie jest grupa hydroksylowa związana z C-5 cukru. Tego rodzaju związek jest nazywany *nukleozydo-5'-fosforanem* lub *5'-nukleotydem*. Na przykład *deoksyadenozyno-5'-trifosforan* (dATP) jest aktywowanym prekursorem syntezy DNA. Jest on aktywowany dzięki obecności dwóch wiązań bezwodnikowych w reszcie trifosforanowej. Cyfra ze znaczką prim (') określa atom w cząsteczce cukru, natomiast cyfry bez znaczków prim określają atom pierścienia purynowego lub pirymidynowego. Przedrostek *d* w dATP oznacza, że cukrem jest deoksyryboza, co odróżnia ten związek od ATP, w którym cukrem jest ryboza.



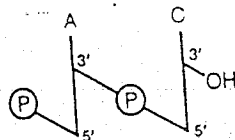
Rdzeń DNA jest niezmienny wzdłuż całej cząsteczki i składa się z reszty deoksyrybozy połączonych resztami fosforanowymi. Grupa 3'-hydroksylowa reszty cukrowej jednego deoksyrybonukleotydu jest połączona z grupą 5'-hydroksylową następną reszty cukrowej wiązaniem fosfodiesterowym.

Zmienną częścią DNA jest sekwencja czterech rodzajów zasad (A, G, C i T). Odpowiednie jednostki nukleotydowe nazywamy deoksyadenylanem, deoksyguanylanem, deoksytydylanem i deoksytymidylanem. Strukturę łańcucha DNA przedstawiono na rysunku 4-2.

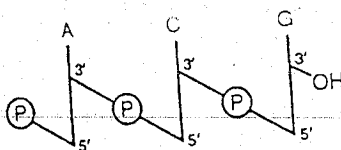
Strukturę DNA można w uproszczony sposób przedstawić następującymi symbolami czterech podstawowych deoksyrybonukleozydów są:



Pionowe linie oznaczają cukier, natomiast litery A, G, C i T przedstawiają zasady. Symbol \textcircled{P} oraz ukośne kreski widoczne na kolejnym schemacie oznaczają wiązanie fosfodiesterowe. Kreski te łączą środek jednej linii pionowej, oznaczający grupę 3'-OH, z końcem następnej linii, oznaczającym grupę 5'-OH. W przedstawionym tu przykładzie symbol \textcircled{P} oznacza, że deoksyadenylan jest połączony z deoksytydylanem wiązaniem fosfodiesterowym, a dokładniej, że 3'-OH deoksyadenylanu jest połączone przez grupę fosforanową z 5'-OH deoksytydylanu.



Przypuśćmy teraz, że do deoksytydylanu w tym dinukleotydzie zostanie przyłączony deoksyguanylan. Powstanie wówczas trinukleotyd, którego strukturę możemy przedstawić w ten sposób:



Trinukleotyd ten możemy zapisać w skróconej formie jako pApCpG, lub w jeszcze bardziej uproszczony sposób jako pACG.

Łańcuch DNA wykazuje polarność. Jeden z jego końców ma grupę 5'-OH, drugi 3'-OH, przy czym grupy te nie są połączone z jakimikolwiek innymi nukleotydami. Przyjęto konwencję, że niezwiązana grupa 5'-OH jest ulokowana w nukleotydzie znajdującym się po lewej stronie skróconej formy zapisu, natomiast grupa 3'-OH w ostatnim nukleotydzie po prawej stronie zapisu. W przytoczonym przykładzie (ACG) na końcu 5' znajduje się deoksyadenylan, na końcu 3' — deoksyguanylan. Tak więc kolejność zasad zapisuje się w kierunku 5' → 3'. Przypomnijmy tu, że sekwencje aminokwasów w białkach zapisuje się w kierunku od końca aminowego do karboksylowego. Należy zauważyć, że ACG i GCA są różnymi związkami, podobnie jak Glu-Phe-Ala różni się od Ala-Phe-Glu.

Transformacja pneumokoków przez DNA ujawniła, że geny są utworzone z DNA

W odkryciu genetycznej roli DNA ważną rolę odegrały bakterie *Pneumococcus*. Normalne pneumokoki są otoczone błoniastą, śluzową otoczką polisacharydową. Ta zewnętrzna warstwa decyduje o patogenności bakterii.

Rys. 4-2. Struktura fragmentu łańcucha DNA

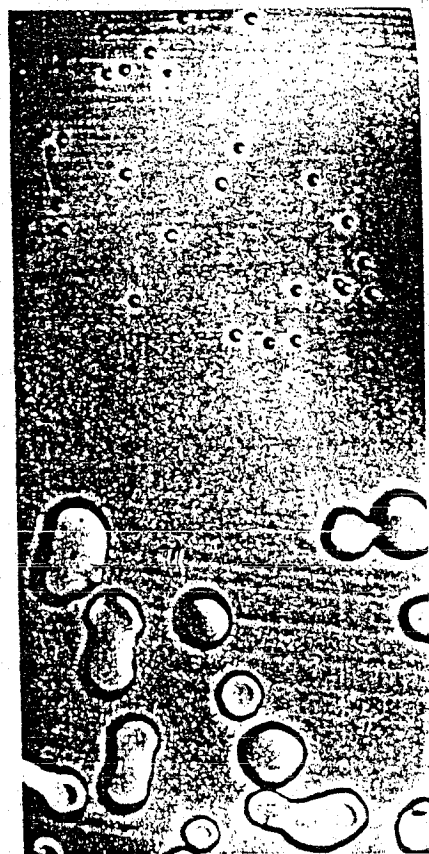
wywołujących zapalenie płuc u ludzi lub u innych ssaków podatnych na zakażenie. Mutanty pozbawione polisacharydowej otoczki nie są chorobotwórcze. Normalne bakterie oznacza się jako formę S (ang. *smooth* — gładki, ponieważ tworzą kolonie gładkie), natomiast mutanty bez otoczki są nazywane formą R (ang. *rough* — szorstki, gdyż tworzą kolonie szorstkie). Mutanty R nie zawierają enzymu potrzebnego do syntezy polisacharydu otoczki.

W 1928 roku Fred Griffith odkrył, że niechorobotwórczy mutant R może ulec transformacji w patogenną formę S. Wstrzykiwał on myszom mieszaninę żywych pneumokoków R oraz pneumokoków S zabitych wysoką temperaturą. Zaskakujący był fakt, że mieszanina ta była letalna dla myszy, chociaż zarówno same mutanty R, jak i same pneumokoki S zabite termicznie i wstrzykiwane osobno nie były letalne. Krew zabitej myszy zawierała żywe pneumokoki S. A więc pneumokoki S zabite działaniem wysokiej temperatury w jakiś sposób przeobrażały żywe pneumokoki R w żywe pneumokoki S. Zmiana ta była trwała: transformowane pneumokoki wytwarzały chorobotwórcze potomstwo formy S. Stwierdzono następnie, że transformacja R → S może zachodzić *in vitro*. Niektóre komórki formy R rosnącej w hodowli były transformowane w formę S po dodaniu *bezkomórkowego ekstraktu* pneumokoków S zabitych działaniem wysokiej temperatury. Odkrycie to stanowiło ważny etap w wyjaśnieniu chemicznego mechanizmu transformacji.

Bezkomórkowy ekstrakt zabitych termicznie pneumokoków S rozfrakcjonowano i zmierzono aktywność transformującą jego składników. W roku 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod i Maclyn McCarty ogłosili, że „u *Pneumococcus* typu III czynnikiem transformującym jest kwas nukleinowy typu deoksyrybozowego”. Wniosek ten uzasadniały wyniki eksperymentów: 1) analiza oczyszczonego i bardzo aktywnego czynnika transformującego wskazywała, że jest to DNA; 2) właściwości optyczne, sedymentacyjne, dyfuzyjne i elektroforetyczne oczyszczonego materiału transformującego były identyczne jak DNA; 3) nie stwierdzono utraty aktywności transformującej czynnika po ekstrakcji z niego białka i (lub) lipidów; 4) trawienie trypsyną i chymotrypsyną nie wpływało na aktywność transformującą; 5) rybonukleaza (rozkładająca kwas rybonukleinowy) nie działała na czynnik transformujący; 6) utrata aktywności transformującej następowała po dodaniu deoksyrybonukleazy.

Praca ta jest kamieniem milowym w historii rozwoju biochemii. Aż do 1944 roku ogólnie przyjmowano, że nośnikiem informacji genetycznej są białka chromosomowe i że DNA odgrywa rolę drugorzędną. Ten przeważający wówczas pogląd został obalony po udowodnieniu, że *oczyszczony DNA ma właściwości genetyczne*. Żywy opis badań i ich implikacje przedstawił Avery w 1943 roku w liście do brata, mikrobiologa pracującego w innym uniwersytecie (rys. 4-4).

Dalszego potwierdzenia genetycznej roli DNA dostarczyły badania wirusa, który infekuje bakterie *Escherichia coli*. Bakteriofag T2 jest zbudowany z DNA i okrywy białkowej (rys. 4-5). W 1951 roku Roger Herriott sugerował, że „wirus może działać jak mała strzykawka, wypełniona czynnikiem transformującym. Wirus jako taki nigdy nie wnika do komórki, tylko jego ogonek kontaktuje się z gospodarzem i prawdopodobnie enzymatycznie wycina małą dziurkę w błonie komórkowej. Następnie kwas nukleinowy wirusa wpływa do komórki”. Pomysł ten w 1952 roku sprawdzili Alfred Hershey i Martha Chase w następujący sposób: DNA fagowy znakowano radioizotopem ³²P, a białko otoczki znakowano ³⁵S. Znakowanie takie było bardzo specyficzne, ponieważ DNA nie zawiera siarki, a otoczka białkowa jest pozbawiona fosforu. Hodowlę *E. coli* infekowano znakowanym radioaktywnie fagiem, który łączył się z komórkami bakteryjnymi podczas krótkiego okresu inkubacji. Zawiesinę mieszano przez kilka minut w homo-



Rys. 4-3. Transformacja niepatogennych pneumokoków R (małe kolonie) w patogennych pneumokoki S (duże, błyszczące kolonie) przez DNA pochodzący z pneumokoków S zabitych wysoką temperaturą. [Z: O.T. Avery, C.M. MacLeod and M. McCarty. *J. Exp. Med.* 79(1944):158]

Przez ostatnie dwa lata próbowałem wykryć, najpierw z MacLeodem, a teraz z dr. McCartym, istotę chemiczną tej substancji w ekstrakcie bakteryjnym, która indukuje tę specyficzną zmianę. Nieoczyszczony ekstrakt pneumokoków typu III pelen jest otoczkowych polisacharydów, węglowodanów G (somaticznych), nukleoprotein, wolnych kwasów nukleinowych zarówno typu drożdżowego, jak i grasicowego, lipidów i innych składników komórkowych. Spróbuj znaleźć w tak złożonej mieszaninie aktywny składnik. Spróbuj go wyizolować i zidentyfikować chemicznie tę szczególną substancję, która po wejściu w kontakt z komórką R pochodzącą z pneumokoka typu II zmusza ją do wytwarzania polisacharydu otoczkowego typu III i do uzyskania wszystkich ważnych cech komórek, z których ekstrakt otrzymano. Tak wiele pracy, że aż głowa pęka. Lecz być może w końcu jakoś damy sobie radę.

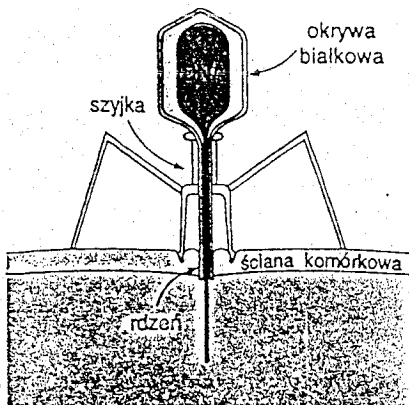
...Jeżeli udowodnimy, że mamy rację — a to oczywiście stoi pod wielkim znakiem zapytania — wtedy poznamy zarówno istotę chemiczną indukującego bodźca, jak i budowę chemiczną produkowanej substancji; bodźcem jest kwas nukleinowy typu grasicowego, natomiast wytwarzana substancja — polisacharydem pneumokoka typu III; obie te substancje są później replikowane w komórkach potomnych i po niezliczonych przenoszeniach bez dalszego dodawania czynnika indukującego można odzyskać tę samą aktywną i specyficzną transformującą substancję w ilości daleko większej niż użyta do reakcji indukcji. Wygląda to na wirus, a może i na gen. Jednakże mechanizmy te obecnie nie interesują mnie, nie mogę zajmować się wszystkim naraz. A więc przede wszystkim, jaka jest istota chemiczna czynnika indukcyjnego? Ktoś inny może zająć się resztą. Oczywiście problem najeżony jest implikacjami. Dotyczą one biochemii kwasów nukleinowych typu grasicowego, które jak wiadomo stanowią większą część chromosomów. Dotąd uważano je za jednakowe bez względu na pochodzenie i gatunek. Dotyczą one także genetyki, chemii enzymów, metabolizmu komórkowego i syntezy węglowodanów. Jednakże dzisiaj, aby przekonać kogokolwiek, że sól sodowa kwasu deoksyrybonukleinowego, bez białek, może być obdarzona taką biologiczną aktywnością i specyficznymi właściwościami, trzeba przedstawić liczne, dobrze udokumentowane fakty, a to właśnie pragniemy osiągnąć. Dużo jest zabawy z puszczaniem baniek, ale mądrzej jest samemu je przekłuć, zanim uczyni to ktoś inny...

Rys. 4-4. Fragment listu napisanego w maju 1943 roku przez Oswalda Avery'ego do brata Roya [Z: R.D. Hotchkiss. In *Phage and the Origins of Molecular Biology*. J. Cairns, G.S. Stent and J.D. Watson. eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1966), pp. 185- 186]

genizatorze typu Waring Blendor z szybkością 10000 obr./min. W ten sposób zainfekowane fagiem komórki poddawano działaniu dużych sił tarcia, które rozrywały połączenia między wirusem a bakterią. Uzyskaną zawiesinę wirowano z szybkością pozwalającą na osadzenie bakterii na dnie próbówki. W osadzie znajdowały się więc zainfekowane bakterie, zaś w supernatancie — mniejsze cząstki. Obie frakcje badano na obecność ^{32}P i ^{35}S w celu zlokalizowania DNA i okrywy białkowej. Wyniki tych eksperymentów były następujące:

1. Większość fagowego DNA znajdowała się w bakteriach.
2. Większość fagowego białka znaleziono w supernatancie.
3. Homogenizowanie prawie nie miało wpływu na zdolność zainfekowanych bakterii do tworzenia wirusów potomnych.

Dodatkowe doświadczenia wykazały, że mniej niż 1% ^{35}S był przenoszony z faga rodzicielskiego na faga potomnego, natomiast 30% rodzicielskiego ^{32}P pojawiało się w fagu potomnym. Te proste, ale bardzo precyzyjne eksperymenty pozwoliły sformułować wniosek, że „możliwe jest fizyczne rozdzielanie faga T2 na część genetyczną i niegenetyczną... Zawierające siarkę białko spoczynkowych cząstek fagowych jest ograniczone do ochronnej okrywy, która warunkuje adsorpcję faga na bakterii i działa jako instrument wstrzykujący fagowy DNA do komórki bakteryjnej. Białko okrywy prawdopodobnie nie spełnia żadnej funkcji we wroście faga wewnątrz komórki. Natomiast DNA spełnia jakieś funkcje. Z powyższych eksperymentów nie



Rys. 4-5. Schemat bakteriofaga T2, wstrzykującego DNA do komórki bakteryjnej [Według: W.B. Wood and R.S. Edgar, Building a bacterial virus. Copyright © 1967 by Scientific American, Inc. All rights reserved]

należy jednak wyciągać dalszych wniosków o współzależnościach chemicznych”.

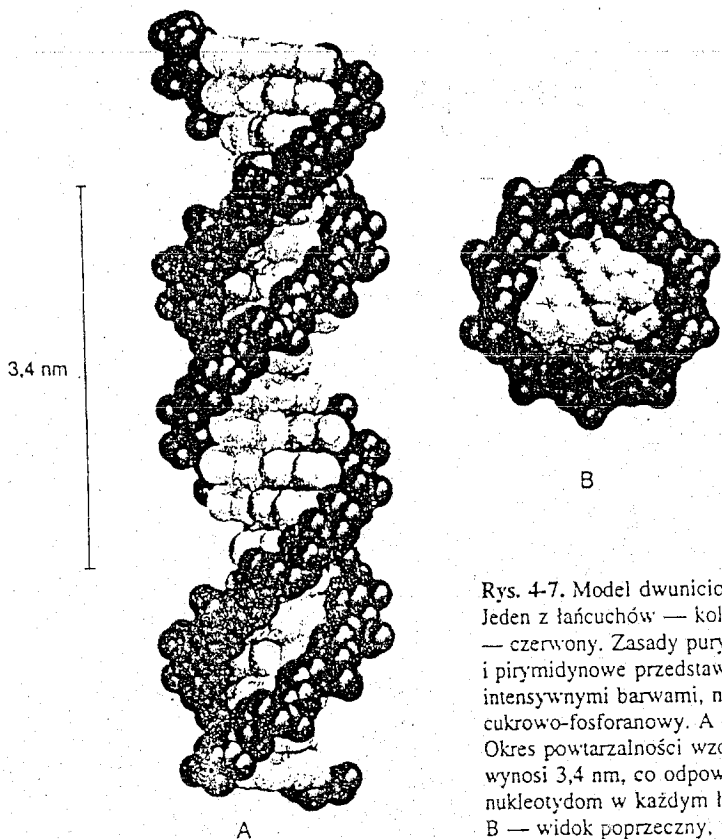
Ostrożny ton tego wniosku nie pomniejszał bynajmniej jego wagi. Genetyczna rola DNA stała się wkrótce ogólnie akceptowanym faktem. Eksperymenty Hersheya i Chase znacznie wsparty wykonane 8 lat wcześniej doświadczenia Avery'ego, MacLeoda i McCarty'ego. Dodatkowym potwierdzeniem były badania zawartości DNA w pojedynczych komórkach. Wykazały one, że *we wszystkich komórkach danego gatunku, które mają diploidalny zespół chromosomów, zawartość DNA jest taka sama. Stwierdzono też, że komórki haploidalne mają o połowę mniej DNA.*

Odkrycie przez Watsona i Cricka dwuniciowej helisy DNA zrewolucjonizowało biologię

W 1953 roku James Watson i Francis Crick wydedukowali przestrzenną strukturę DNA i bezpośrednio z niej wnioskowali o mechanizmie replikacji DNA. To błyskotliwe osiągnięcie uznano za jedno z najznakomitszych w historii biologii, ponieważ otworzyło drogę do zrozumienia działania genu na poziomie molekularnym. Watson i Crick analizowali obrazy dyfrakcji promieni rentgenowskich na DNA uzyskane przez Rosalind Franklin i Maurice'a Wilkinsa i na tej podstawie zaproponowali model, który w zasadzie okazał się prawidłowy. Istotne cechy tego modelu to:

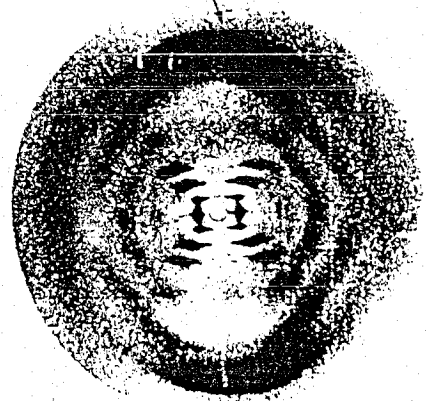
1. Dwa helikalne łańcuchy polinukleotydowe oplatają wspólną oś. Łańcuchy te biegną w przeciwnych kierunkach (rys. 4-7).

2. Zasady purynowe i pirymidynowe znajdują się wewnątrz, a fosforany i reszty deoksyrybozy — na zewnątrz helisy (rys. 4-8). Płaszczyzny zasad są prostopadłe do osi helisy, a płaszczyzny pierścieni cukrów są ułożone prostopadłe względem zasad.



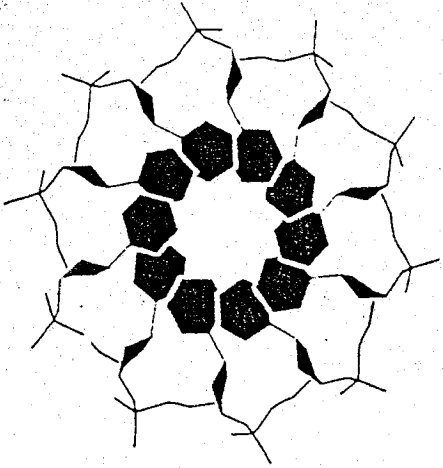
Rys. 4-7. Model dwuniciowej helisy DNA. Jeden z łańcuchów — kolor zielony, drugi — czerwony. Zasady purynowe i pirymidynowe przedstawiono mniej intensywnymi barwami, niż rdzeń cukrowo-fosforanowy. A — widok z boku. Okres powtarzalności wzdłuż osi helisy wynosi 3,4 nm, co odpowiada 10 nukleotydów w każdym łańcuchu; B — widok poprzeczny, wzdłuż osi helisy

odstęp 0,34 nm



Rys. 4-6. Obraz dyfrakcji promieni rentgenowskich na hydratowanym włóknie DNA. Ciemne refleksy ułożone w kształcie krzyża świadczą o strukturze helikalnej. Silnie zaciemnione łuki o kierunku południkowym świadczą, że zasady purynowe i pirymidynowe są ułożone regularnie jedna nad drugą, prostopadłe do osi helisy, co 0,34 nm [Dzięki uprzejmości: Dr. Maurice Wilkins]

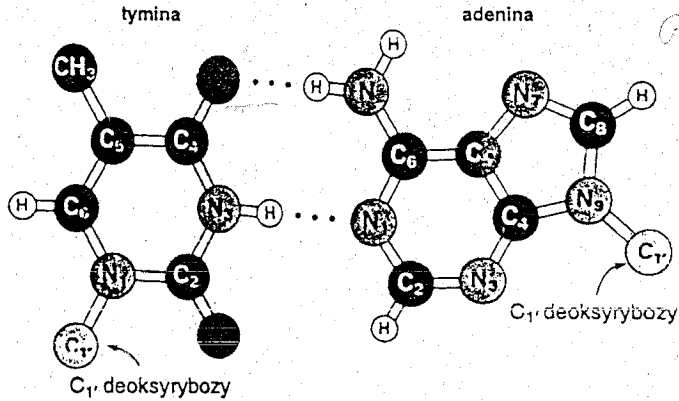
4
NA / FIN



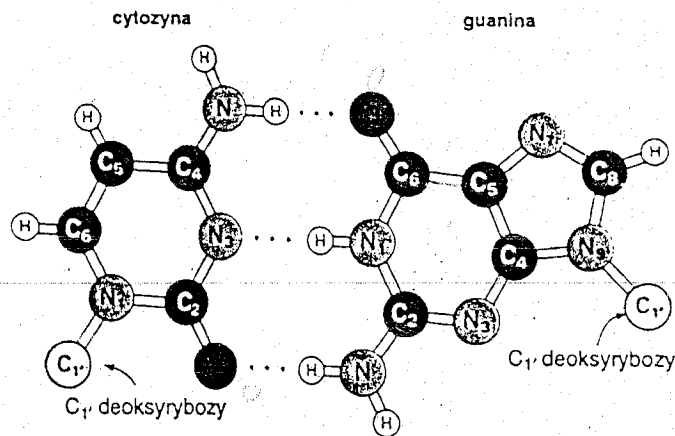
Rys. 4-8. Schemat jednej z dwóch nici helisy DNA, widzianej z góry. Zasady (tutaj tylko pirymidyny) znajdują się wewnątrz, a szkielet cukrowo-fosforanowy na zewnątrz helisy. Ewidentna jest symetria dziesięciokrotna. Zasady — kolor niebieski, reszty cukrowe — czerwony

3. Średnica helisy wynosi 2,0 nm. Odległość między sąsiednimi zasadami, mierzona wzdłuż osi helisy, wynosi 0,34 nm. Zasady te są skręcone względem siebie pod kątem 36°. Na całkowity skręt helisy przypada więc po 10 nukleotydów w każdym łańcuchu, co daje okres powtarzalności równy 3,4 nm.

4. Dwa łańcuchy łączą się ze sobą wiązaniami wodorowymi między zasadami tworzącymi komplementarne pary. Adenina zawsze tworzy parę z tyminą, a guanina z cytozyną (rys. 4-9 i 4-10).



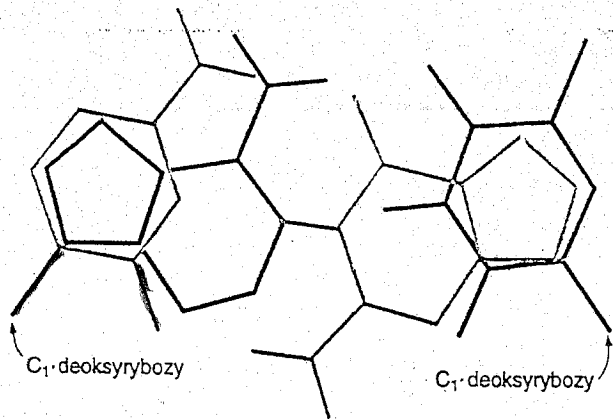
Rys. 4-9. Model pary zasad adenina-tymina



Rys. 4-10. Model pary zasad guanina-cytosyna

5. Kolejność zasad w łańcuchu polinukleotydowym nie jest w żaden sposób ograniczona. *Ścisłe określona sekwencja zasad niesie informację genetyczną.*

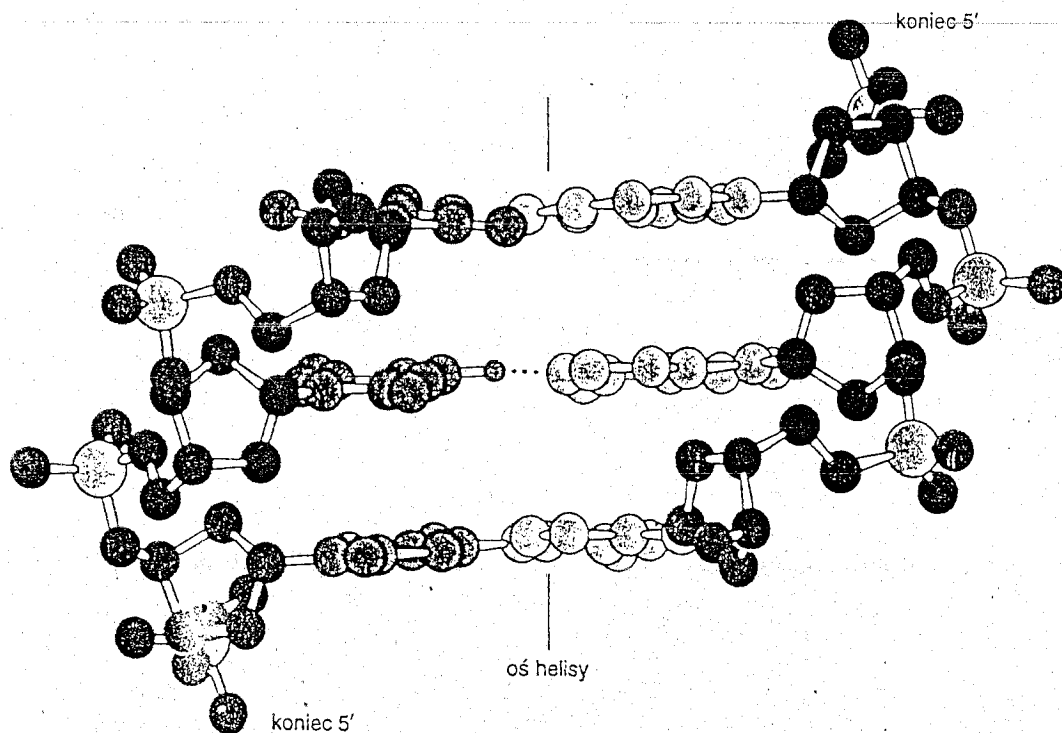
[Najważniejszą cechą dwuniciowej helisy DNA jest specyficzność parowania zasad.] Watson i Crick stwierdzili, że ze względu na czynniki przestrzenne i możliwość powstawania wiązań wodorowych adenina musi tworzyć parę z tyminą, a guanina z cytozyną. Te ograniczenia przestrzenne narzuca regularna helikalna natura szkieletu cukrowo-fosforanowego każdego łańcucha polinukleotydowego. Wiązania glikozydowe, które łączą sparowane zasady z resztami cukrowymi, zawsze oddalone są od siebie o 1,08 nm (rys. 4-11). Do odległości tej doskonale pasują purynowo-pirymidynowe pary zasad. Za mało jest jednak miejsca dla pary złożonej z dwóch puryn, za dużo natomiast dla par zbudowanych z dwóch pirymidyn: byłyby one zbyt oddalone od siebie, aby utworzyć wiązania wodorowe. A więc z powodów przestrzennych jednym składnikiem pary musi być puryna, drugim — pirymidyna. Po-



Rys. 4-11. Nakładanie się pary zasad G-C (kolor niebieski) na parę A-T (czerwony). Położenie wiązań glikozydowych (zielony) oraz atomów C_{1'} deoksyrybozy w obu parach zasad jest prawie identyczne

wstawanie par zasad jest też ograniczone warunkami tworzenia się wiązań wodorowych. Atomy wodoru w zasadach purynowych i pirymidynowych zajmują dokładnie zdefiniowane położenia. Adenina nie może tworzyć pary z cytozyną, ponieważ w jednej z pozycji wiążących mogłyby znajdować się dwa wodory, natomiast w drugiej w ogóle brakowałoby wodoru. Podobnie guanina nie może tworzyć pary z tyminą. Natomiast adenina tworzy dwa wiązania wodorowe z tyminą, a guanina — trzy wiązania z cytozyną (rys. 4-9 i 4-10). Kierunki i odległości wiązań są optymalne dla osiągnięcia silnego przyciągania się zasad.

Przedstawiony schemat parowania zasad był zgodny z wynikami wcześniejszych badań składu zasad DNA, pochodzącego z różnych organizmów. W 1950 roku Erwin Chargaff stwierdził, że *stosunki ilościowe adeniny do tyminy i guaniny do cytozyny są bliskie 1,0 dla DNA wszystkich badanych gatunków*. Znaczenia tych równoważności nie doceniano aż do chwili



Rys. 4-12. Model podwójnej helisy DNA, pokazujący trzy pary zasad (kolor szary). Dwie nici biegną w przeciwnych kierunkach. Przedstawiony tu model ilustruje formę B DNA, tj. klasyczną dwuniciową helisę Watsona-Cricka. W tej formie płaszczyzny zasad są prostopadłe do osi helisy

zapropozowania modelu Watsona-Cricka. Dopiero wtedy można było zauważyć, że odzwierciedlają one istotną cechę struktury i funkcji DNA — specyficzność parowania zasad.

Struktura dwuniciowej helisy DNA przedstawiona na rys. 4-12 jest formą *B DNA* (*B-DNA*). W jednym z następnych rozdziałów (s. 840) przedstawimy, że DNA może przybierać także inne formy helikalne, takie jak *A-DNA* i *Z-DNA*. W warunkach fizjologicznych jednak większość DNA występuje w formie *B* Watsona-Cricka.

Komplementarne łańcuchy helisy funkcjonują jako matryce podczas replikacji DNA

Model dwuniciowej helisy DNA od razu sugerował mechanizm replikacji DNA. W miesiąc po przedstawieniu modelu struktury DNA Watson i Crick opublikowali swoją hipotezę w niezwykle prostej, jasnej pracy:

„Jeżeli znana jest kolejność zasad jednego łańcucha, dzięki specyficzności parowania zasad można podać dokładny porządek zasad drugiego łańcucha. A więc jeden łańcuch jest komplementarny do drugiego i właśnie ta cecha sugeruje, w jaki sposób cząsteczka DNA może się powielać.

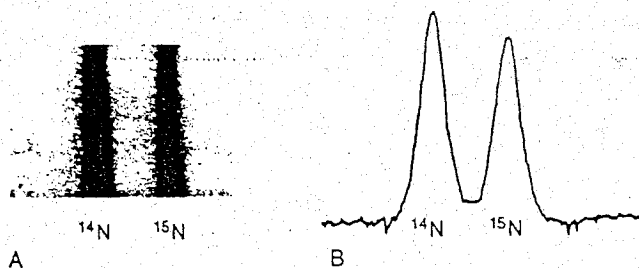
Wcześniejsze dyskusje o samopowielaniu zawierały zwykle koncepcje matrycy, czyli formy. Koncepcja matrycy zakładała albo jej bezpośrednie kopiowanie, albo tworzenie „negatywu”, który następnie stanowił matrycę dla tworzenia „pozytywu”. Nigdy dokładnie nie wyjaśniono, w jaki sposób proces ten zachodzi na poziomie atomowym i cząsteczkowym.

Nasz model DNA stanowi parę matryc, przy czym każda jest komplementarna do drugiej. Wyobraźmy sobie, że przed duplikacją wiązania wodorowe ulegają zerwaniu, a dwa łańcuchy rozplatają się i rozdzielają. Każdy łańcuch może wtedy działać jako matryca dla tworzenia nowego łańcucha, tak że ostatecznie powinniśmy mieć dwie pary łańcuchów tam, gdzie przedtem była tylko jedna. Sekwencje zasad zostaną w ten sposób dokładnie podwojone”.

Replikacja DNA jest semikonserwatywna

Watson i Crick zaproponowali, że jedna z nici każdej potomnej cząsteczki DNA jest syntetyzowana *de novo*, a druga pochodzi z rodzicielskiej cząsteczki DNA. Takie rozdzielenie rodzicielskich atomów nazywamy *semikonserwatywnym*. Ostatecznego sprawdzenia tej hipotezy dokonali Matthew Meselson i Franklin Stahl. Rodzicielski DNA znakowano ciężkim izotopem azotu, ^{15}N , aby jego gęstość była większa od zwykłego DNA. Dokonano tego przez hodowanie wielu pokoleń *E. coli* w środowisku zawierającym $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ jako jedyne źródło azotu. Następnie bakterie szybko przeniesiono do środowiska, zawierającego zwykły izotop azotu, ^{14}N . Postawiono pytanie: w jaki sposób rozdzielają się ^{14}N i ^{15}N w cząsteczkach DNA po kilku kolejnych replikacjach?

Rozdzielanie się ^{14}N i ^{15}N badano nowo opracowaną metodą *wirowania równowagowego w gradiencie gęstości*. Małą ilość DNA rozpuszczano w stężonym roztworze chlorku cezu o gęstości bliskiej gęstości DNA (około $1,7\text{ g/cm}^3$). Roztwór ten wirowano prawie do stanu równowagi. Przeciwnastawne procesy sedymentacji i dyfuzji wytworzyły gradient stężenia chlorku cezu wzdłuż próbki wirówkowej. Wynikiem był ciągły gradient gęstości roztworu, od $1,66$ do $1,76\text{ g/cm}^3$. Cząsteczki DNA w tym gradiencie były przesuwane przez siłę odśrodkową do obszaru, w którym gęstość roztworu była równa ich własnej gęstości. DNA o dużej masie cząsteczkowej dawało wyraźne pasmo wykrywane dzięki absorpcji światła nadfioletowego. Cząste-



Rys. 4-13. Rozdzielanie ^{14}N -DNA i ^{15}N -DNA metodą wirowania w gradiencie gęstości. A — zdjęcie kuwety ultrawirówkowej w ultrafiolecie (UV); B — densytometryczny wykres zdjęcia w UV. [Z: M. Meselson i F.W. Stahl. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44(1958):671]

czki ^{14}N -DNA i ^{15}N -DNA dały ostro rozdzielone pasma, ponieważ różnią się gęstością o około 1% (rys. 4-13).

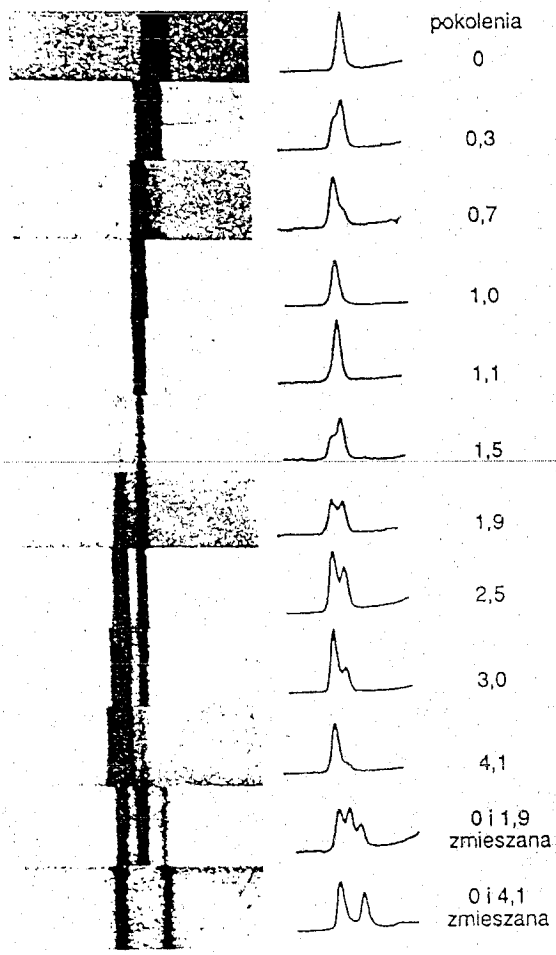
DNA ekstrahowano z bakterii po różnym czasie od przeniesienia ich z pożywki ^{15}N do pożywki ^{14}N . Analiza tych prób, dokonana metodą wirowania w gradiencie gęstości, wykazała, że po jednym pokoleniu pojawia się jedno pasmo DNA (rys. 4-14), którego gęstość jest dokładnie równa średniej gęstości ^{14}N - i ^{15}N -DNA. Brak ^{15}N -DNA wskazywał, że rodzicielski DNA nie jest zachowywany jako niezmienna jednostka replikacji. Brak ^{14}N wskazywał natomiast, że wszystkie potomne cząsteczki DNA pochodziły w całości od DNA rodzicielskiego. Proporcja pomiędzy elementami rodzicielskimi i potomnymi musiała być 1:1, ponieważ gęstość pasma hybrydowego była wypadkową gęstości ^{14}N -DNA i ^{15}N -DNA.

Po dwóch pokoleniach stwierdzono obecność dwóch jednakowo intensywnych pasm DNA: jedno zawierało DNA hybrydowy, a drugie — ^{14}N -DNA. Na podstawie tych wyników Meselson i Stahl stwierdzili, „że azot cząsteczki DNA jest równo dzielony między dwie fizycznie ciągle podjednostki, że w wyniku duplikacji każda z cząsteczek potomnych otrzymuje po jednej podjednostce i że podjednostki te są zachowywane przez wiele duplikacji”. Uzyskane przez nich wyniki doskonale zgadzały się z modelem replikacji DNA zaproponowanym przez Watsona i Cricka (rys. 4-15).

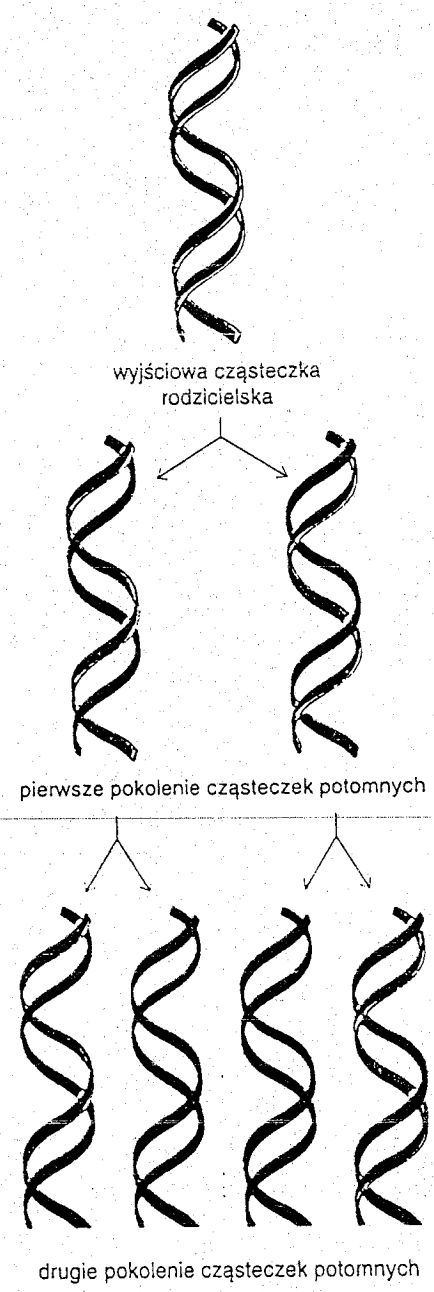
Dwuniciowa helisa ulega odwracalnemu topnieniu

Po zerwaniu wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami dwa łańcuchy helisy DNA z łatwością się rozdzielają. Można to uzyskać przez ogrzewanie roztworu DNA lub jego zakwaszenie albo alkalizację, powodujące jonizację zasad. Rozplatanie dwuniciowej helisy DNA jest nazywane *topnieniem*, ponieważ w określonej temperaturze przebiega w sposób nagły. Temperatura, w której dochodzi do utraty połowy helikalnej struktury, jest nazywana temperaturą topnienia (T_m). Duża szybkość tego przejścia wskazuje, że dwuniciowa helisa DNA jest *strukturą wysoce kooperacyjną*, utrzymywaną dzięki działaniu wielu wiązań „wzmacniających”. Strukturę stabilizuje zarówno tworzenie się par zasad, jak i asocjacja warstwowa zasad. Topnienie DNA można z łatwością śledzić przez pomiar absorpcji światła o długości fali 260 nm. Zanik asocjacji warstwowej par zasad powoduje wzrost absorpcji próby DNA; efekt ten nazwano *hiperchromizmem** (rys. 4-16).

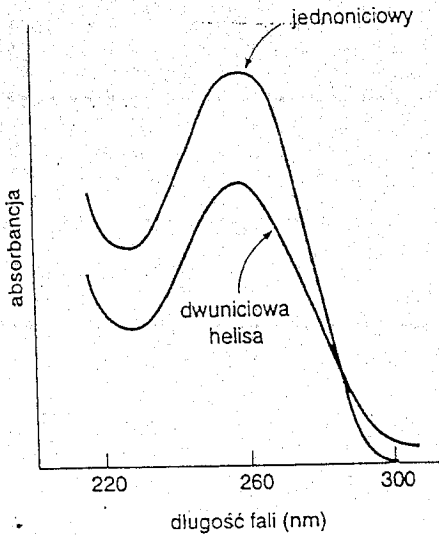
* Częściej jest stosowany termin „hipochromizm”, oznaczający zmniejszenie się absorpcji próby DNA o uporządkowanej strukturze w stosunku do absorpcji tej samej próby w pełni zdenaturowanej. *Przyp. tłum.*



Rys. 4-14. Dowód na semikonserwatywność replikacji u *Escherichia coli* uzyskany metodą wirowania w gradiencie gęstości. Pozycja pasma DNA zależy od zawartości w nim ^{14}N i ^{15}N . Po jednym pokoleniu wszystkie cząsteczki DNA są hybrydami, zawierającymi równe ilości ^{14}N i ^{15}N ; brak cząsteczek rodzicielskiego DNA (^{15}N). [Z: M. Meselson, F.W. Stahl. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44(1958):671]



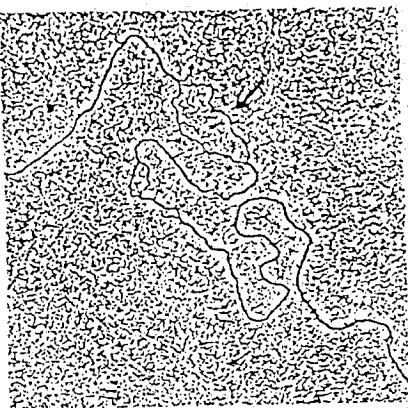
Rys. 4-15. Schemat replikacji semi-konserwatywnej. Rodzicielski DNA — kolor zielony, nowo zsintetyzowany DNA — czerwony. [Według: M. Meselson, F.W. Stahl. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44(1958):671]



Rys. 4-16. Absorbancja roztworu DNA przy długości fali 260 nm wzrasta, gdy dwuniciowa helisa ulega topnieniu do dwóch łańcuchów pojedynczych

Temperatura topnienia cząsteczki DNA wyraźnie zależy od jej składu zasad. Cząsteczki DNA bogate w pary G·C mają wyższą T_m niż cząsteczki, w których dominują pary A·T (rys. 4-17). Istotnie T_m DNA z wielu gatunków zmienia się liniowo wraz z zawartością par G·C, przybierając wartość od 77°C dla DNA zawierającego 20% par G·C do 100°C dla DNA o 78% par G·C. Pary G·C są stabilniejsze niż pary A·T, ponieważ w parze G·C zasady są związane trzema wiązaniami wodorowymi, a w parze A·T — tylko dwoma. Ponadto sąsiednie pary G·C są silniej zasocjowane warstwowo niż sąsiadujące ze sobą pary A·T. Z tego powodu *rejony DNA bogate w A·T ulegają łatwiej topnieniu niż rejony bogate w G·C* (rys. 4-18). *In vivo* dwuniciowa helisa ulega stopnieniu w wyniku działania specyficznych białek (s. 858).

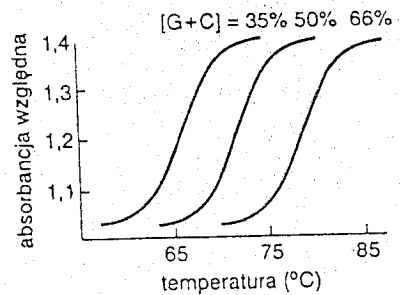
Po obniżeniu temperatury poniżej T_m rozdzielone komplementarne łańcuchy DNA ulegają spontanicznej reasocjacji, odtwarzając strukturę dwuniciowej helisy. Ten proces renaturacji (reasocjacji łańcuchów) czasami jest określany jako *splatanie (annealing)*. Łatwość, z jaką dwuniciowa helisa ulega topnieniu, a następnie reasocjacji, jest bardzo istotna dla biologicznych funkcji DNA. Ważna też jest elastyczność cząsteczek DNA nawet w temperaturze znacznie niższej niż T_m .



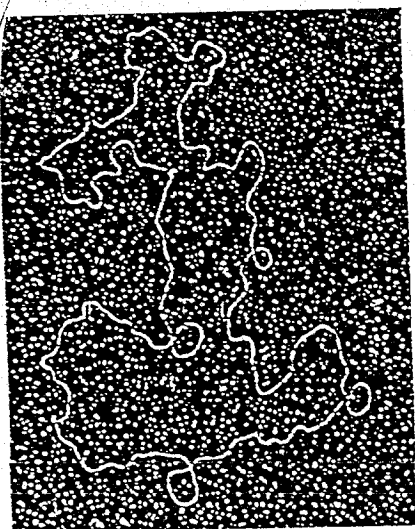
Rys. 4-18. Mikrografia elektronowa cząsteczki DNA częściowo rozplecionej pod wpływem środowiska alkalicznego. Rejony jednoniciowe są widoczne jako pętla ulegające mniej intensywnemu wybarwieniu niż segmenty dwuniciowe. Rejony, które uległy tu rozpleceniu, są bogate w pary A·T. Jeden z takich rejonów jest zaznaczony strzałką. [Według: R.B. Inman i M. Schnos. *J. Mol. Biol.* 49(1970):93]

Cząsteczki DNA są bardzo długie

Uderzającą cechą występujących w przyrodzie cząsteczek DNA jest ich długość. Cząsteczki DNA muszą być bardzo długie, aby mogły kodować dużą liczbę białek znajdujących się nawet w najprostszej komórce. Chromo-



Rys. 4-17. Krzywe topnienia DNA. Wykres przedstawia wzrost absorbancji następujący w miarę wzrostu temperatury. Absorbancję w temp. 25°C przyjęto za 1. (Mierzono absorbancję światła o długości fali 260 nm). DNA z *E. coli* (50% par G·C) wykazuje T_m około 72°C. DNA z *Pseudomonas aeruginosa* (66% par G·C) 79°C

1,0 μm

Rys. 4-19. Mikrografia elektronowa kolistej cząsteczki DNA bakteriofaga λ . [Dzięki uprzejmości: Dr. Thomas Broker]

som *E. coli*, na przykład, jest pojedynczą cząsteczką DNA o strukturze dwuniciowej helisy, złożoną z 4-milionów par zasad. Cząsteczka ta ma masę 2,6 gigadaltanów ($2,6 \times 10^9$ daltonów). Po usunięciu z komórki wykazuje *bardzo nieregularny kształt*. Długość cząsteczki DNA zawartej w *E. coli* wynosi $1,4 \times 10^6$ nm, ale średnica tylko 2,0 nm. Tak więc długość tej cząsteczki (1,4 mm) mieści się w makroskopowej skali wymiarów, natomiast jej szerokość mieści się w skali atomowej. Bruno Zimm stwierdził, że największy chromosom *Drosophila melanogaster* zawiera pojedynczą cząsteczkę DNA o $6,2 \times 10^7$ parach zasad, której długość wynosi 2,1 cm. Tak mocno asymetryczne cząsteczki (długie, ale cienkie) bardzo łatwo ulegają zerwaniu przez siły tarcia. Jeśli nie zachowa się szczególnej ostrożności w manipulacjach takimi cząsteczkami, łatwo ulegają one rozerwaniu na fragmenty o masie rzędu tysięcznych części masy cząsteczki wyjściowej.

DNA izolowany z różnych bakterii i wirusów łatwo można uwidocznic w mikroskopie elektronowym (rys. 4-19). Długość niektórych cząsteczek DNA przedstawiono w tab. 4-1. Należy podkreślić, że nawet najmniejsze cząsteczki DNA są bardzo silnie wydłużone. Na przykład DNA wirusa polioma jest zbudowany z 5100 par zasad i ma długość 1,7 μm (1700 nm). Hemoglobina, której cząsteczki są prawie kuliste, ma średnicę 6,5 nm; kolagen, jedno z najdłuższych białek, ma długość 300 nm. Porównania te wyraźnie podkreślają wyjątkową długość cząsteczek i asymetrię (rozumianą tu jako stosunek długości do szerokości) cząsteczek DNA.

Tabela 4-1. Wielkość genomowego DNA niektórych organizmów

Organizm	Pary zasad w tysiącach zasad (kz) liczonych w jednej nici	Długość (w μm)
Wirusy		
Polioma i SV40	5,1	1,7
Fag λ	48,6	17
Fag T2	166	56
Wirus-krowianki	190	65
Bakterie		
Mikoplazma	760	260
<i>E. coli</i>	4 000	1 360
Eukariota		
Drożdże	13 500	4 600
Muszka owocowa (<i>Drosophila</i>)	165 000	56 000
Człowiek	2 900 000	990 000

Według: A. Kornberg i T.A. Baker *DNA Replication* (2nd ed.), W.H. Freeman, 1992, p. 20.

Niektóre cząsteczki DNA są koliste i superhelikalne

Za pomocą mikroskopu elektronowego wykazano, że nie uszkodzone cząsteczki DNA z wielu źródeł są koliste (rys. 4-19). Odkrycie w *E. coli* chromosomu kolistego było poprzedzone wynikami badań genetycznych, które wykazały, że *mapa genetyczna chromosomu tej bakterii jest kolista*. Termin „kolisty” wskazuje na ciągłość łańcucha DNA, nie zaś na jego kształt geometryczny. Cząsteczki DNA *in vitro* muszą być ściśle upakowane, gdyż — jak łatwo zauważyć — długość chromosomu *E. coli* jest około 1000 razy większa niż największy wymiar tej bakterii.

Nie wszystkie cząsteczki DNA są koliste. Na przykład DNA bakteriofaga T7 jest *liniowy*. Cząsteczki DNA niektórych wirusów, np. bakteriofaga λ .

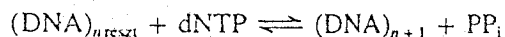
oscylują między formą liniową a kolistą. Z liniową formą DNA spotykamy się w dojrzałych cząstkach wirusowych, natomiast wewnątrz komórki gospodarza fagowy DNA przybiera formę kolistą.

Przejściu dwuniciowej helisy w kowalencyjnie ciągłą strukturę kolistą towarzyszy pojawienie się nowych właściwości DNA. Oś podwójnej helisy może sama ulec spiralizacji, tworząc *superhelisę*. Kolistą cząsteczką DNA nie wykazującą jakichkolwiek dodatkowych splotów jest określana jako *cząsteczka zrelaksowana*. Tworzenie się struktur superhelikalnych ma z dwóch względów duże znaczenie biologiczne. Po pierwsze, *superhelikalny DNA ma kształt bardziej zwarty niż DNA w formie zrelaksowanej* (rys. 4-20). Superspiralizacja DNA jest koniecznym warunkiem jego upakowania wewnątrz komórki. Po drugie, tworzenie się superhelisy stwarza warunki rozplatania się łańcuchów w podwójnej helisie, wpływając tym samym na ich interakcje z innymi cząsteczkami. Topologiczne właściwości DNA zostaną omówione bardziej szczegółowo w dalszym rozdziale (str. 846).

Replikację DNA katalizują polimerazy pobierające instrukcje od matrycy

Przejdziemy obecnie do opisu molekularnego mechanizmu replikacji DNA. W roku 1958 Arthur Kornberg i jego współpracownicy wyizolowali z *E. coli* enzym, który katalizuje syntezę DNA. Enzym ten nazwali *polimerazą DNA*; obecnie enzym ten nazywa się *polimerazą DNA I*, ponieważ po jego wyizolowaniu wykryto także inne polimerazy DNA*. W replikacji DNA uczestniczy więcej niż 20 białek wzajemnie oddziałujących w bardzo skomplikowany i skoordynowany sposób. Tutaj skoncentrujemy się na polimerazie DNA I, aby na jej przykładzie przedstawić pewne ogólne reguły działania tych enzymów.

Polimeraza DNA I jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 103 kDa. *Katalizuje ona krok po kroku dodawanie jednostek deoksyrybonukleotydowych do łańcucha DNA:*

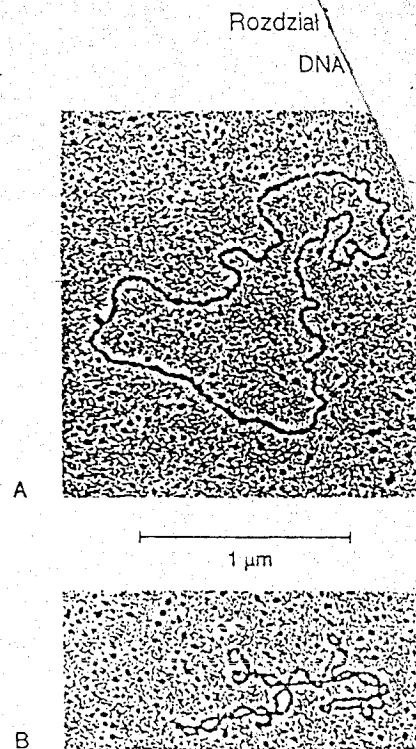


(dNTP — jakikolwiek trifosforan deoksyrybonukleozydu, PP_i — grupa pirofosforanowa). Do syntezy łańcucha DNA polimeraza DNA I potrzebuje następujących składników (rys. 4-21):

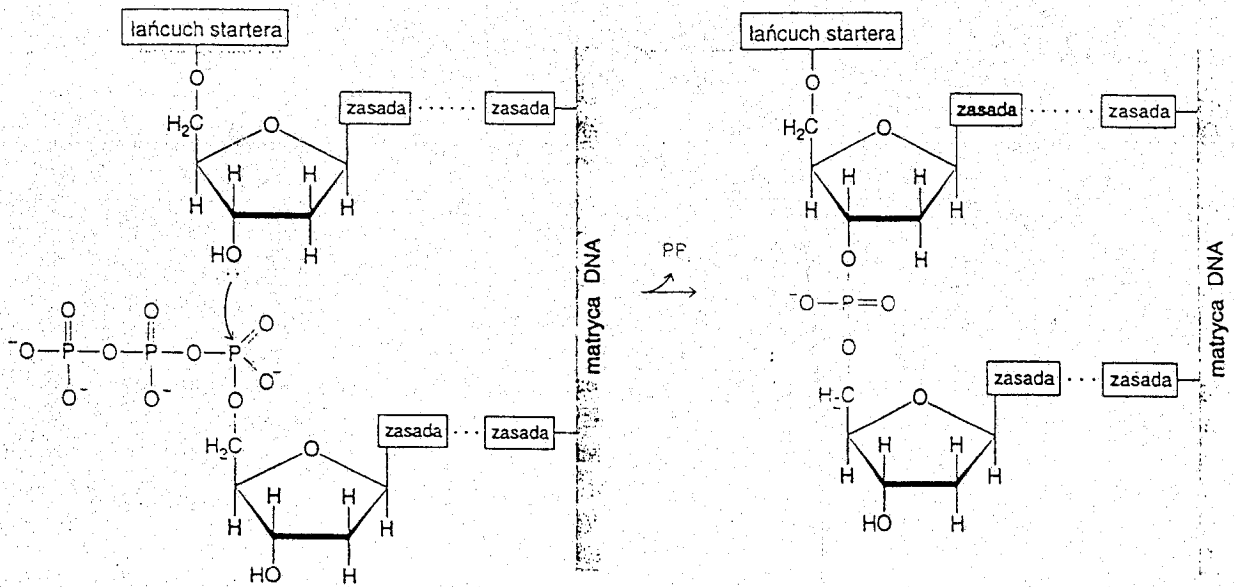
1. Wszystkich czterech aktywowanych prekursorów — *5'-trifosforanów deoksyrybonukleotydów*: *dATP*, *dGTP*, *dTTP* i *dCTP*; konieczna jest też obecność jonów Mg^{2+} .
2. *Odcinka starterowego (primera)*, gdyż polimeraza DNA I dołącza deoksyrybonukleotydy do wolnej grupy 3'-hydroksylowej już istniejącego odcinka DNA.
3. *Matrycy DNA* jako istotnego składnika układu. Matrycą może być DNA jedno- lub dwuniciowy. Dwuniciowy DNA jest efektywną matrycą tylko wtedy, gdy jego rdzeń fosforanowo-rybozowy ulegnie zerwaniu co najmniej w jednym miejscu.

Reakcja wydłużania łańcucha katalizowana przez polimerazę DNA zachodzi w wyniku *nukleofilowego ataku grupy 3'-OH primera na atom fosforu trifosforanu deoksyrybonukleozydu położony najbliższej deoksyrybozy*. Tworzy się wiązanie fosfodiestrowe i równocześnie zostaje uwolniony pirofosforan.

* Poprawnie: nukleotydylotransferazy DNA. *Przyp. red.*

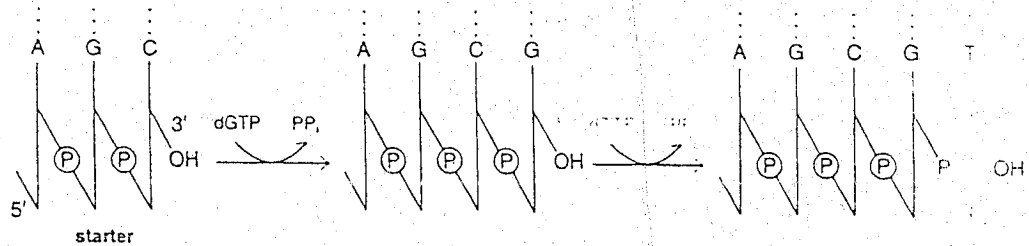


Rys. 4-20. Mikrografie elektronowe DNA z mitochondriów. A — zrelaksowana forma kolistą; B — superhelikalna forma kolistą [Dzięki uprzejmości: Dr. David Clayton]



Rys. 4-21. Reakcja wydłużania łańcucha, katalizowana przez polimerazy DNA

Hydroliza uwolnionego pirofosforanu, katalizowana przez ubikwistyczną (wszędobylską) pirofosfatazę, jest czynnikiem napędzającym reakcję w kierunku tworzenia się polimeru. *Elongacja łańcucha DNA odbywa się w kierunku 5' → 3'* (rys. 4-22).



Rys. 4-22. Polimerazy DNA katalizują wydłużanie łańcuchów DNA w kierunku 5' → 3'.

Polimeraza DNA katalizuje tworzenie się wiązań fosfodiestrowych tylko wtedy, gdy zasada przyłączanego nukleotydu jest komplementarna do zasady w łańcuchu stanowiącym matrycę, tj. gdy tworzy z nią parę typu Watsona-Cricka. W innych przypadkach prawdopodobieństwo utworzenia kowalencyjnego wiązania jest bardzo małe. Tak więc polimeraza DNA jest enzymem *instruowanym przez matrycę*. Enzym czerpie instrukcje od matrycy i dokonuje syntezy produktu, którego sekwencja zasad jest komplementarna do sekwencji zasad matrycy. W rzeczy samej polimeraza DNA I była pierwszym poznany enzymem tego typu. Inną uderzającą właściwością polimerazy DNA I jest jej zdolność do korygowania pomyłek przez eliminację nukleotydów nie dopasowanych do matrycy. Dzięki tej właściwości polimerazy DNA I replikacja DNA przebiega bardzo wiernie, a błędy pojawiają się nie częściej niż jedna zasada mylna na 10⁸ zasad poprawnych (s. 853).

DNA niektórych wirusów jest jednoniciowy podczas części ich cyklu życiowego

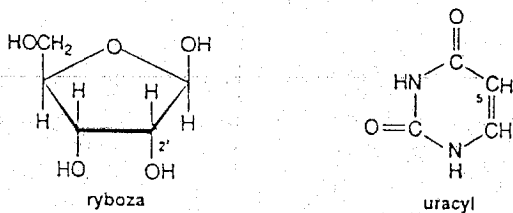
DNA nie zawsze jest dwuniciowy. Robert Sinsheimer odkrył, że DNA ϕ X174, małego wirusa infekującego *E. coli*, jest jednoniciowy. Do tego nieoczekiwanego wniosku doprowadziły wyniki szeregu eksperymentów. Po

pierwsze, stosunki molowe zasad w DNA $\phi X174$ nie odpowiadały regule, że $[A] = [T]$ i $[G] = [C]$. Po drugie, roztwór DNA $\phi X174$ jest znacznie mniej lepki niż roztwór DNA *E. coli* o tym samym stężeniu. Właściwości hydrodynamiczne DNA $\phi X174$ są podobne do właściwości polimeru w formie kłęбка statystycznego, natomiast dwuniciowa helisa DNA pod względem hydrodynamicznym zachowuje się jak sutywna pałeczka. Po trzecie, grupy aminowe zasad DNA $\phi X174$ łatwo reagują z formaldehydem, natomiast zasady w dwuniciowej helisie DNA są niedostępne dla tego odczynnika.

Odkrycie jednociowego DNA wywołało wątpliwości, dotyczące uniwersalności schematu semikonserwatywnej replikacji, zaproponowanego przez Watsona i Cricka. Jednak już wkrótce wykazano, że DNA $\phi X174$ jest jednociowy tylko przez część swego cyklu życiowego. Sinsheimer odkrył, że zakażone komórki *E. coli* zawierają dwuniciową formę $\phi X174$. Dwuniciowy DNA jest nazywany formą replikacyjną, ponieważ służy jako matryca do syntezy DNA wirusów potomnych. Jego wykrycie jako intermediatu podczas replikacji wirusowego DNA umocniło poglądy o uniwersalności ogólnego schematu replikacji proponowanego przez Watsona i Cricka.

Geny niektórych wirusów zbudowane są z RNA

Geny wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych są zbudowane z DNA, natomiast w wirusach geny są utworzone albo z DNA, albo też z RNA (tj. kwasu rybonukleinowego). Podobnie jak DNA, RNA jest długim, nierozgałęzionym polimerem zbudowanym z nukleotydów połączonych wiązaniami 3' \rightarrow 5' fosfodiestrowymi (rys. 4-24). Kowalencyjna struktura RNA różni się od DNA pod dwoma względami: Jednostką cukrową w RNA jest ryboza, a nie deoksyryboza, na co zresztą wskazuje sama nazwa kwasu rybonukleinowego. Ryboza zawiera grupę 2'-hydroksylową, której brak



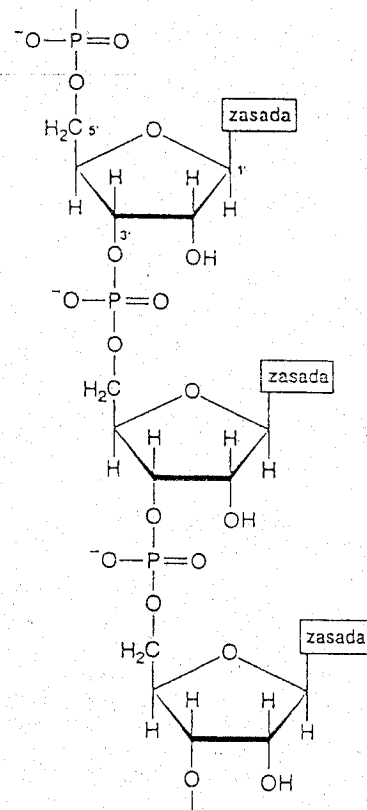
w deoksyrybozie. Druga różnica polega na tym, że w RNA jedną z czterech głównych zasad jest uracyl (U) zamiast tyminy (T). Podobnie jak tymina, uracyl może tworzyć parę zasad z adeniną, ale nie zawiera grupy metylowej, znajdującej się w tyminie. Cząsteczki RNA mogą być jednociowe lub dwuniciowe. RNA nie może tworzyć podwójnej helisy takiej jak DNA w formie B ze względu na zawadę przestrzenną w postaci grup 2'-hydroksylowych. RNA może jednak przybrać postać dwuniciowej helisy, w której pary zasad są odchylone o około 30 stopni od położenia prostopadłego do osi helisy, tj. ma strukturę podobną do formy A DNA (s. 842).

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych wirusów RNA jest wirus mozaiki tytoniu, który zakaża liście tej rośliny. Zbudowany jest on z jednej cząsteczki RNA (6390 nukleotydów), otoczonej okrywą białkową, złożoną z 2130 jednakowych podjednostek. Białko to można oddzielić od RNA, działając na wirusa fenolem. RNA wyizolowany z wirusa ma właściwości zakaźne, w przeciwieństwie do białka wirusowego, które jest ich pozbawione. Znanych jest wiele różnych szczepów wirusa mozaiki tytoniu. Wykorzystując RNA szczepu 1 oraz białko szczepu 2 przygotowano syntetyczny, hybrydowy wirus; przygotowano też taki hybryd, który zawierał RNA szczepu 2,

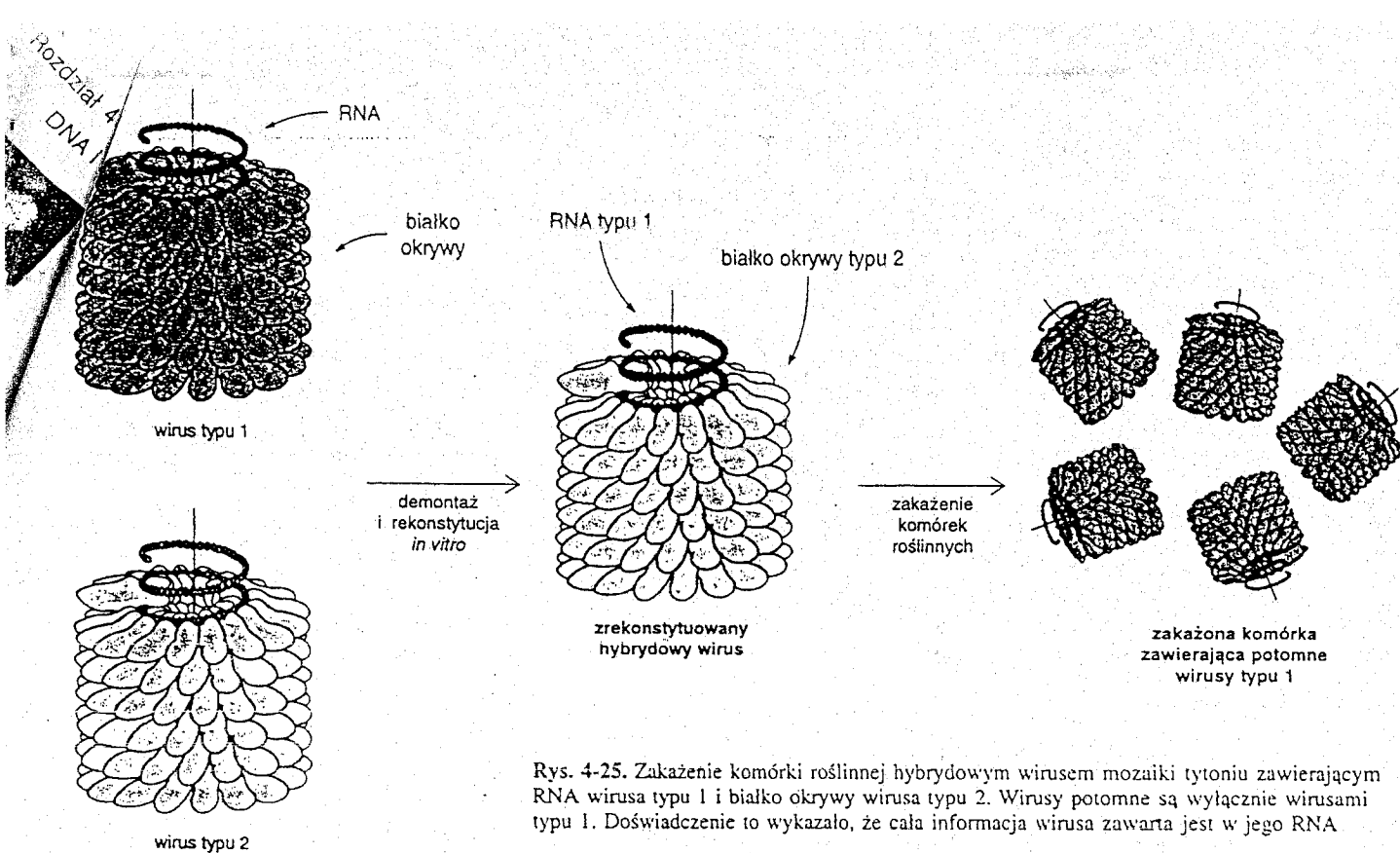


50 nm

Rys. 4-23. Mikrografia elektronowa wirusa $\phi X174$. [Dzięki uprzejmości: Dr. Robley Williams]



Rys. 4-24. Struktura fragmentu łańcucha RNA



Rys. 4-25. Zakażenie komórki roślinnej hybrydowym wirusem mozaiki tytoniu zawierającym RNA wirusa typu 1 i białko okrywy wirusa typu 2. Wirusy potomne są wyłącznie wirusami typu 1. Doświadczenie to wykazało, że cała informacja wirusa zawarta jest w jego RNA

Wirion —

Zewnątrzkomórkowa kompletna forma wirusa składająca się z DNA lub RNA otoczonego przez kapsyd.

Kapsyd —

Okrywa białkowa otaczająca wirusowy DNA lub RNA.

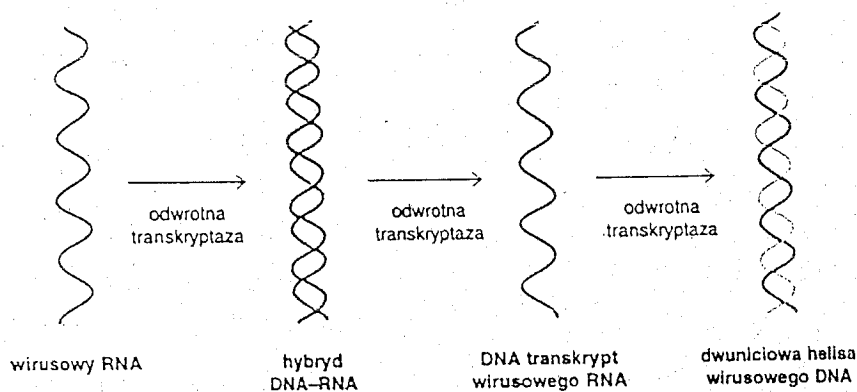
a białko szczepu 1. Po infekcji wirusy potomne zawsze składały się z RNA i białka odpowiadających RNA znajdującemu się w hybrydzie wirusowym użytym do zakażenia (rys. 4-25).

Wirus mozaiki tytoniu replikując się w zakażonej komórce roślinnej syntetyzuje najpierw nić (–) RNA, komplementarną do nici (+) RNA, znajdującej się w cząstce wirusowej. Nić (–) RNA służy następnie jako matryca do syntezy wielu potomnych nici (+) RNA, które po połączeniu się z białkową okrywą są uwalniane z komórki w postaci nowych cząstek wirusa. Synteza nowych nici RNA jest katalizowana przez polimerazę RNA czerpiącą instrukcje z matrycy RNA (*polimerazę RNA zależną od RNA*, nazywaną *replikazą RNA*). Przyjęto konwencję, że nić (+) RNA oznacza łańcuch służący jako matryca (informacyjny RNA) do syntezy białek.

Wirusy RNA wywołujące raka i inne retrowirusy ulegają replikacji za pośrednictwem intermediatów w postaci dwuniciowego helikalnego DNA

Wiele wirusów RNA wywołuje powstawanie nowotworów złośliwych w organizmie podatnych gospodarzy zwierzęcych. Jednym z najlepiej poznanych wirusów grupy nowotworowych wirusów RNA jest *wirus mięsaka Rousa* (ang. *Rous sarcoma virus*, RSV), którego genom jest zbudowany z pojedynczej nici RNA (s. 889). Charakterystyczną cechą *onkogennych wirusów RNA* jest ich replikacja za pośrednictwem intermediatów DNA (rys. 4-26). Strategię taką wykorzystuje między innymi ludzki wirus niedoboru immunologicznego (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV-1), wywołujący zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). Onkogenne wirusy RNA, między innymi HIV-1, są znane jako *retrowirusy*, ponieważ w ich przypadku następuje przepływ informacji genetycznej od RNA do DNA, a nie od DNA do RNA.

Początkiem zakażenia jest wprowadzenie wirusowej nici (+) RNA do komórki gospodarza. Nici (+) RNA jest matrycą do syntezy komplementarnego łańcucha (-) DNA, katalizowanej przez *odwrotną transkryptazę*, wirusowy enzym wprowadzany do komórki gospodarza razem z wirusowym RNA. Odwrotna transkryptaza jest polimerazą DNA zależną od RNA. Nazwa enzymu „odwrotna transkryptaza” dobrze oddaje istotę procesu, w którym RNA służy jako matryca do syntezy DNA, co stanowi odwrócenie normalnego kierunku przepływu informacji genetycznej. Nici (-) DNA służy następnie jako matryca do syntezy nici (+) DNA (rys. 4-26). Powstająca w ten sposób wersja wirusowego genomu o strukturze dwuniciowego DNA zostaje wprowadzona do chromosomowego DNA gospodarza i ulega replikacji wraz z normalnym komórkowym DNA podczas podziału komórkowego. Zintegrowany genom wirusowy ulega następnie ekspresji z utworzeniem wirusowej nici (+) RNA i białek wirusowych organizujących się w nowe cząstki wirusowe. Do tej niezwyklej strategii genetycznej powrócimy w jednym z dalszych rozdziałów (s. 889).



Rys. 4-26. W cyklu życiowym retrovirusów informacja genetyczna przepływa od RNA do DNA. DNA komplementarny do wirusowego RNA jest syntetyzowany przez odwrotną transkryptazę, enzymem wprowadzany do komórki przez zakażający ją wirus. Odwrotna transkryptaza katalizuje syntezę nici (-) DNA, rozkład nici (+) RNA oraz syntezę nici (+) DNA

Streszczenie

Cząsteczką dziedziczości wszystkich organizmów prokariotycznych i eukariotycznych jest DNA. W przypadku wirusów materiałem genetycznym jest albo RNA, albo DNA. Komórkowy DNA składa się z dwóch bardzo długich łańcuchów polinukleotydowych, zwiniętych wokół jednej wspólnej osi. Każda z dwóch nici helisy jest zorientowana w przeciwnym kierunku. Na zewnątrz dwuniciowej helisy znajdują się rdzenie cukrowo-fosforanowe każdego z łańcuchów, podczas gdy zasady purynowe i pirymidynowe są skierowane do wnętrza helisy. Obydwa łańcuchy są połączone wiązaniami wodorowymi między zasadami tworzącymi pary. Adenina (A) zawsze tworzy parę z tyminą (T), a guanina (G) jest zawsze sparowana z cytozyną (C), dzięki czemu jeden łańcuch helisy jest zawsze komplementarny do drugiego. Informację genetyczną koduje ściśle określona sekwencja zasad w każdym z łańcuchów. Wiele cząsteczek DNA tworzy formy kolistę. Oś dwuniciowej helisy kolistego DNA sama może ulegać zwinięciu, tworząc superhelisę. DNA zwinięty superhelikalnie jest bardziej zwarty niż zrelaksowane formy DNA.

Podczas replikacji obydwa łańcuchy helisy DNA ulegają rozpleceniu i rozdzielają się w miarę postępu syntezy nowych łańcuchów. Każdy łańcuch rodzicielski stanowi matrycę dla nowo powstającego łańcucha komplementarnego. Tak więc replikacja DNA jest procesem semikonserwatywnym — każda potomna cząsteczka uzyskuje jeden łańcuch z rodzicielskiej cząsteczki DNA i drugi nowo syntetyzowany. Replikacja DNA jest złożonym

procesem zachodzącym z udziałem wielu białek, w tym kilku polimeraz DNA. Aktywowanymi prekursorami w syntezie DNA są cztery 5'-trifosforany deoksyrybonukleozydów. Nowa nić jest syntetyzowana w kierunku 5' → 3' przez nukleofilowy atak grupy 3'-hydroksylowej odcinka starterowego na atom fosforu α trifosforanu deoksyrybonukleozydu. Co bardzo ważne, polimeraza DNA katalizuje powstanie wiązania fosfodiesterowego tylko wtedy, gdy zasada nowo wchodzącego nukleotydu jest komplementarna do zasady w łańcuchu stanowiącym matrycę. Innymi słowy, polimerazy DNA są enzymami zależnymi od matrycy (sterowanymi przez matrycę).

Niektóre wirusy podczas części swego cyklu życiowego zawierają jednociowy DNA. Taki DNA występuje w ϕ X174, małym wirusie infekującym *E. coli*. Jednak w zainfekowanej komórce gospodarza jest wytwarzany drugi, komplementarny łańcuch, dzięki czemu powstaje forma replikacyjna o strukturze dwuniciowej helisy. Materiałem genetycznym niektórych wirusów, takich jak wirus mozaiki tytoniu, jest jednociowy RNA. W replikacji takiego RNA bierze udział polimeraza RNA zależna od RNA (replikaza RNA). Retrowirusy, których przykładem mogą być onkogenne wirusy RNA i HIV-1, wykazują niezwykły kierunek przepływu informacji genetycznej od RNA do DNA, to jest odwrotny od normalnego. Zawarty w nich jednociowy RNA jest transkrybowany do dwuniciowego DNA przez odwrotną transkryptazę, czyli polimerazę DNA zależną od RNA.

WYBÓR PIŚMIENICTWA

Literatura wprowadzająca

- Felsenfeld G., 1985. DNA. *Sci. Amer.* 253(4):58-67 [Wydrukowane także w *The Molecules of Life* — serii doskonałych artykułów. W.H. Freeman, 1985.]
- Darnell J.E., Jr., 1985. RNA. *Sci. Amer.* 253(4):26-36. [Wydrukowane także w *The Molecules of Life*.]
- Dickerson R.F., 1983. The DNA helix and how it is read. *Sci. Amer.* 249(6):94-111.
- Crick F.H.C., 1954. The structure of the hereditary material. *Sci. Amer.* 191(4):54-61. [Doskonały opis odkrycia dwuniciowej helisy. Przedrukowane w *Scientific American: Science in the 20-th Century* 1991.]

Odkrycie głównych pojęć

- Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus Type III*. *J. Exp. Med.* 79:137-158.
- Hershey A.D., Chase M., 1952. The Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39-56.
- Watson J.D., Crick F.H.C., 1953a. Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
- Watson J.D., Crick F.H.C., 1953b. Genetic implications of structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964-967.
- Kornberg A., 1960. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131:1503-1508.
- Meselson M., Stahl F.W., 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44:671-682.
- Taylor J.H., (ed.), 1965. *Selected Papers on Molecular Genetics*. Academic Press. [Zawiera klasyczne publikacje wymienione wyżej.]

Struktura DNA

- Saenger W., 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag. [Doskonały przegląd struktury przestrzennej nukleotydów DNA i RNA. Zawiera wiele świetnych ilustracji.]
- Dickerson R.E., Drew H.R., Conner B.N., Wing R.M., Fratini A.V., Kopka M.L., 1982. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* 216:475-485.
- Cantor C.R., Schimmel P.R., 1980. *Biophysical Chemistry* (3 vols.). W.H. Freeman. [W rozdziałach 3 i 6 (część I) oraz w rozdziałach 22, 23 i 24 (część III) doskonale omówiono konformacje kwasów nukleinowych].

Replikacja DNA

- Kornberg A., Baker T.A., 1992. *DNA Replication* (2nd. ed.). W.H. Freeman. [Wyróżniająca się, poczytna książka.]

Wspomnienia i przeglądy historyczne

- Watson J.D., 1968. *The Double Helix*. Atheneum [Żywa, osobista opowieść o odkryciu struktury DNA i jego znaczeniu biologicznym. tłum. pol.: 1975. *Podwójna spirala*. Wiedza Powszechna.]
- McCarty M., 1985. *The transforming Principle: Discovering that Genes Are Made of DNA*. Norton. [Żywa i klarowna relacja dotycząca jednego z głównych odkryć obecnego wieku napisana przez wrażliwego uczestnika prowadzonych badań.]
- Cairns J., Stent G.S., Watson J.D. (eds.), 1966. *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory. [Fascynujący zbiór wspomnień jednego z architektów biologii molekularnej.]
- Olby R., 1974. *The Path to the Double Helix*. University of Washington Press.
- Portugal F.H., Cohen J.S., 1977. *A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance*. MIT Press.
- Judson H., 1979. *The Eighth Day of Creation*. Simon and Schuster.

