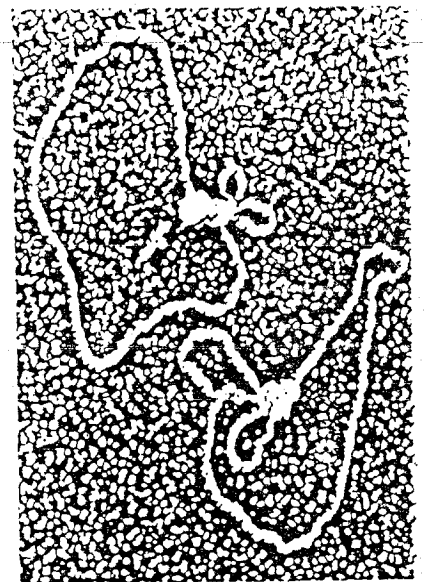


## Struktura, replikacja i naprawa DNA

Głównymi tematami poruszonymi w tej części książki są przechowywanie, przekazywanie i ekspresja informacji genetycznej. W części I książki omówiliśmy już rolę genetyczną i strukturę DNA oraz przepływ informacji genetycznej (rozd. 4 i 5). Nasze rozważania na ten temat zostaną teraz wznowione, gdyż wzbogaciliśmy się już o wiadomości dotyczące białek i metabolizmu, przedstawione w poprzednich częściach.

W rozdziale tym zajmiemy się strukturą, replikacją, mutacją i naprawą DNA. Skoncentrujemy się na omówieniu systemów spotykanych u *Prokaryota* ze względu na fakt, że były one intensywnie badane, a procesy w nich zachodzące są dobrym przykładem pewnych mechanizmów ogólnych. Bardziej skomplikowane systemy *Eukaryota* przedstawimy w innym rozdziale (s. 1032). Struktura DNA jest dynamiczna. Dwu niciowa helisa, której model opracowali Watson i Crick, może ulegać zgięciu, załamaniu lub rozplataniu. Może także przybierać rozmaite formy helikalne. Analiza dyfrakcji promieni rentgenowskich na kryształach oligomerów DNA umożliwiła poznanie jego właściwości konformacyjnych. Następnie omówimy enzymy, które przecinają i łączą DNA. Struktura DNA połączonego z endonukleazą restrykcyjną ukazuje, jak ten szczególnie wyspecjalizowany enzym znajduje i przecina specyficzną sekwencję docelową. Białka mogą rozpoznawać specyficzne sekwencje DNA, przeglądając układy donorów i akceptorów wodoru w małym i dużym rowku dwu niciowej helisy. Przedmiotem rozważań dalszej części rozdziału jest topologia i przybieranie przez cząsteczkę DNA konformacji superhelikalnej. Topoizomerazy, fascynująca grupa enzymów, katalizują przekształcanie DNA do formy superhelikalnej oraz jego relaksację, tnąc i ponownie łącząc nici helisy.

Rysunek tytułowy: Struktura dużego fragmentu polimerazy DNA i aktywnego katalitycznie. Domena prowadząca polimeryzację — kolor niebieski, miejsce o aktywności redagującej endonukleazy — żółty. Związany dwu niciowy DNA (kolor czerwony i zielony) jest wygięty. [Narysowano: według współrzędnych uprzejmie udostępnionych przez: Dr. Thomas Steitz, L.S. Beese, V. Derbyshire, T.A. Steitz. *Science* 260(1993):352]



Rys. 31-1. Mikrografia elektronowa przedstawiająca inicjację replikacji wirusa X174. Każda z kolistych cząsteczek DNA przyłączona jest do primosomu, stanowiącego grupę białek rozpoczynając replikację DNA. [Dzięki uprzejmości: Dr. Jack Griffith]

Kolejno omawiane zagadnienie to replikacja DNA, która jest jednym z najważniejszych procesów biologicznych. Jak zachodzi synteza DNA? Jak rozwijają się i rozdzielają rodzicielskie nici DNA, służące jako matryce? Jak zostaje uzyskana tak wielka wierność sekwencji nici potomnych w stosunku do matrycy? Zdziwiająca cechą polimeraz DNA jest dodatkowa aktywność sprawdzania poprawności wbudowania nukleotydów podczas semikonserwatywnej replikacji. Ostatnia część tego rozdziału dotyczy molekularnej natury mutacji i mechanizmów jej naprawy. Uszkodzenia w DNA są naprawiane przez nieprzerwanie trwający proces, w którym informacje z nietkniętej nici wykorzystywane są do bezpośredniej naprawy nici uszkodzonej. Nieprawidłowo działający system naprawy DNA znacznie zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia raka.

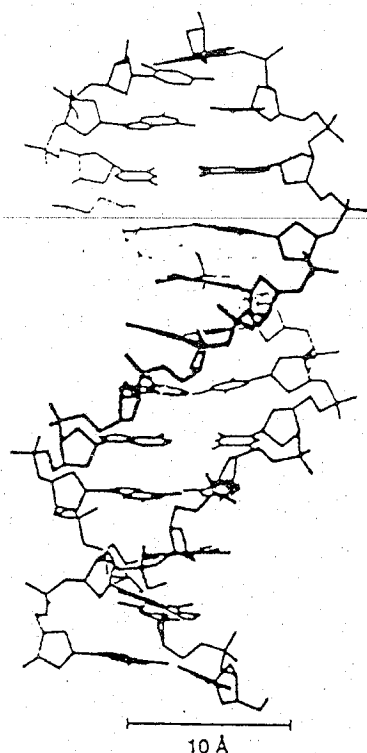
### Struktura DNA jest dynamiczna i może on przybierać różne formy

Odkrycie struktury dwuniciowej helisy DNA przez Watsona i Cricka wybitnie wpłynęło na rozwój wiedzy biologicznej, ponieważ jednocześnie pozwoliło przewidzieć, w jaki sposób następuje przechowywanie i powielanie informacji genetycznej. Jak opisywaliśmy wcześniej (s. 81), istotne cechy tego modelu to:

1. Dwa łańcuchy polinukleotydowe, biegnące w przeciwnych kierunkach, okręcają się wokół wspólnej osi tworząc prawoskrętną, dwuniciową helisę.
2. Zasady purynowe i pirymidynowe znajdują się wewnątrz helisy, natomiast reszty fosforanowe i deoksyrybozowe są na zewnątrz.
3. Adenina (A) tworzy parę z tyminą (T), a guanina (G) z cytozyną (C). Para A·T połączona jest przez dwa precyzyjnie skierowane wiązania wodorowe, a para G·C przez trzy takie wiązania. Struktura dwuniciowej helisy jest także stabilizowana oddziaływaniami między zasadami jednej nici, które określa się mianem asocjacji warstwowej.

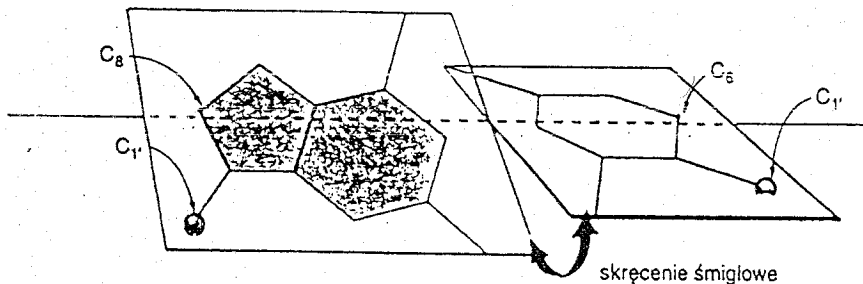
Model zaproponowany przez Watsona i Cricka (znany jako *helisa B-DNA*) stworzono na podstawie obrazów uzyskiwanych z dyfrakcji promieni rentgenowskich na *włóknach* DNA. Uzyskane w ten sposób informacje dawały wyobrażenie o cechach dwuniciowej helisy, w której pozycje poszczególnych jej składowych zostały uśrednione. Więcej informacji o strukturze można uzyskać na podstawie analizy dyfrakcji promieni rentgenowskich na *kryształach* DNA. Takie badania stały się jednak możliwe dopiero dzięki opracowaniu *technik syntezy* dużych ilości oligomerów DNA o *zdefiniowanej sekwencji nukleotydowej* (s. 127). Analiza dyfrakcji promieni rentgenowskich na kryształach prowadzona z rozdzielczością pozwalającą określić pozycję pojedynczego atomu wykazała znacznie większą różnorodność i zmienność strukturalną cząsteczek DNA niż pierwotnie przypuszczano. Łańcuch DNA może wykonywać obroty wokół jednego z sześciu wiązań przypadających na monomer: wiązania *N*-glikozydowego między zasadą azotową i cukrem, wiązania między C-4 i C-5 reszty cukrowej, i czterech wiązań w mostku fosfodiestrowym, łączącym C-3 reszty cukrowej z C-5 reszty cukrowej kolejnego nukleotydu; można to porównać z dwoma wiązaniami, wokół których obraca się łańcuch polipeptydowy (s. 28). Jak to wkrótce przedstawimy, istotnym czynnikiem determinującym strukturę cząsteczki DNA jest konformacja pierścienia rybozowego.

Analiza dyfrakcji promieni rentgenowskich przeprowadzona przez Richarda Dickersona i jego współpracowników na kryształach dodekameru DNA wykazała, że struktura tego fragmentu ogólnie przypomina model



Rys. 31-2. Model szkieletowy odcinka formy B DNA o długości 12 par zasad. Jedna nić DNA — kolor zielony, druga — czerwony. Zwróćmy uwagę na miejscowe odchylenia struktury od modelu zaproponowanego przez Watsona i Cricka oraz na zakrzywienie osi helisy. [Narysowano według: 2bna.pdb. H.R. Drew, S. Samson, R.E. Dickerson. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79(1982):4040]

DNA zaproponowany przez Watsona i Cricka. Odcinek dwunastonukleotydowy różnił się jednak od modelu tym, że był on konformacyjnie niejednorodny; występowały tu stosunkowo duże lokalne zmiany struktury. Model Watsona i Cricka zakłada występowanie 10 par zasad na całkowity skręt helisy, tak więc kąt skręcenia jednej zasady względem kolejnej, występującej w łańcuchu, wynosi 36 stopni. W cząsteczce badanej przez Dickersona kąty skręcenia między sąsiadującymi w łańcuchu zasadami wynosiły od 28 stopni (dla odcinków o luźniejszej strukturze) do 42 stopni (dla odcinków skręconych ciasniej). Także pierścienie zasad należących do jednej pary nie leżą w jednej płaszczyźnie (rys. 31-3). Są one raczej skręcone względem siebie jak łopaty śmigła. To odchylenie od wyidealizowanej struktury, zwane *śmigłowym skręceniem* zasad, wzmacnia asocjację warstwową między zasadami jednej nici. *Występowanie tych i innych miejscowych różnic budowy dwuniciowej helisy zależy od sekwencji nukleotydowej fragmentu DNA. Białko poszukujące specyficznej sekwencji może wykryć jej obecność dzięki efektowi dokładnego dopasowania swego kształtu do dwuniciowej helisy.*

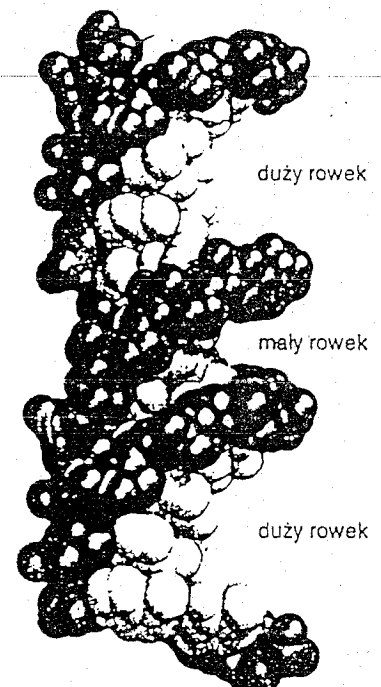


Rys. 31-3. Pierścienie zasad azotowych jednej pary zasad DNA nie leżą dokładnie w jednej płaszczyźnie. Są one skręcone względem siebie jak łopaty śmigła

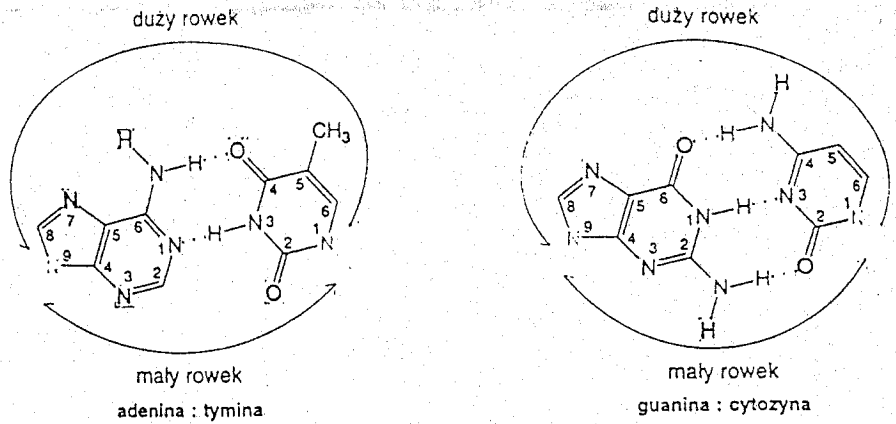
Jeszcze jedna właściwość DNA jest godna odnotowania. *Helisa może łatwo się wyginać w łuk lub przyjmować formę superhelikalną bez większych lokalnych zmian struktury.* Łatwość z jaką DNA ulega deformacji jest biologicznie niezwykle istotna, ponieważ dopuszcza tworzenie się kolistych cząsteczek DNA i umożliwia nawijanie się DNA wokół białek. Zagęszczanie DNA, pozwalające na zajmowanie przestrzeni jak najmniejszej objętości, zależy od zdolności cząsteczki do ulegania deformacjom. Gdyby DNA musiał pozostać liniowy, nie zmieściłby się w komórce. DNA może także ulegać zafamowaniu, czyli *zaginaniu* w dyskretnych miejscach. Zaginanie się DNA, jak to przedstawimy wkrótce, może być powodowane występowaniem specyficznych sekwencji nukleotydowych (takich jak ciąg czterech reszt adeniny) lub też przyłączeniem białek.

**Mały i duży rowek są wyścielane grupami zdolnymi do tworzenia wiązań wodorowych, specyficznymi dla sekwencji danego odcinka DNA**

Na powierzchni helisy B-DNA można wyróżnić dwa zagłębienia, zwane *dużym rowkiem* (większą bruzdą) (1,2 nm szerokości), oraz *małym rowkiem* (mniejszą bruzdą) (0,6 nm szerokości). Powstają one dlatego, że wiązania glikozydowe komplementarnych par zasad nie leżą dokładnie naprzeciwko siebie (rys. 4-9 i 4-10 na s. 82). Do małego rowka skierowane są O-2 pirymidyny i N-3 puryny danej pary zasad, natomiast duży rowek tworzy się po przeciwnej stronie pary zasad (rys. 31-5). Duży rowek jest nieco głębszy od małego rowka (0,85–0,75 nm). Rowki są wyścielane atomami lub grupami, będącymi potencjalnymi donatorami lub akceptorami wodoru (w wiąz-



Rys. 31-4. Helisa B-DNA zawiera mały i duży rowek. Ta helisa została dodatkowo wygięta dla uwidocznienia znacznej różnicy wielkości między rowkami

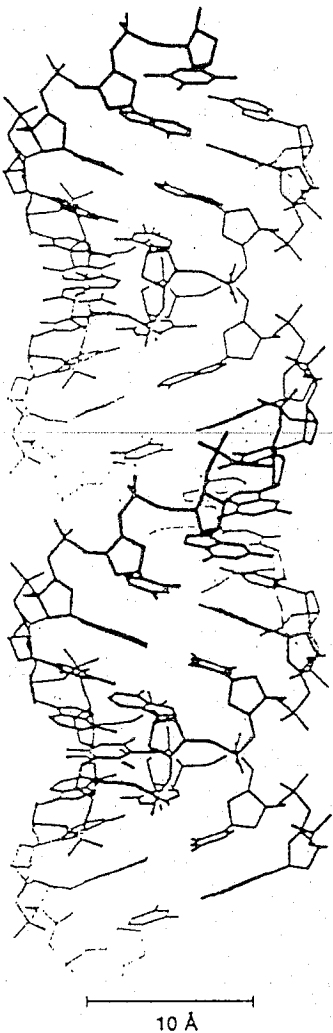


Rys. 31-5. Pary A-T i G-C DNA mają atomy, które mogą tworzyć dodatkowe wiązania wodorowe. Duży i mały rowek są wyścielone atomami, stanowiącymi potencjalne donory i akceptory wodoru (zaznaczone kolorem żółtym)

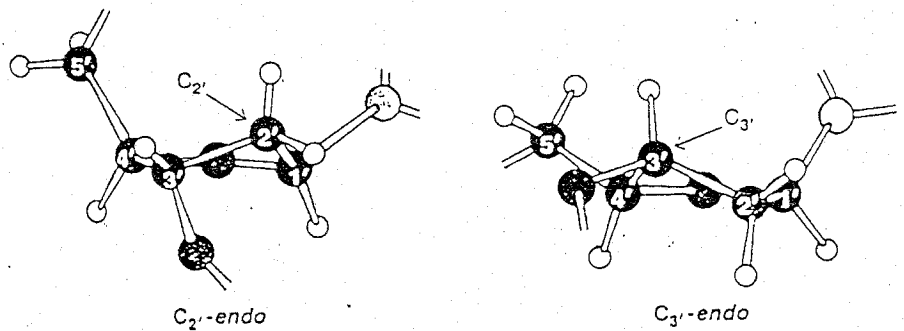
zaniach wodorowych). W dużym rowku N-3 adeniny i guaniny oraz O-2 tyminy i cytozyny mogą być akceptorami wodoru, natomiast związana z C-2 grupa aminowa guaniny może służyć jako donor wodoru. Oznaczmy N-3 jako *n*, O-2 jako *o*, a wodór grupy aminowej jako *h*. Możliwe układy donorów i akceptorów w małym rowku DNA można opisać jako *no* (AT), *on* (TA), *nho* (GC), *ohn* (CG). W dużym rowku potencjalnymi akceptorami wodoru są N-7 guaniny lub adeniny oraz O-4 tyminy i O-6 cytozyny. Grupy aminowe związane z C-6 adeniny i C-4 cytozyny mogą być donorami wodoru. Możliwe układy donorów i akceptorów wodoru prezentowane w dużym rowku można zatem opisać jako *nho* (AT), *ohn* (TA), *noh* (GC) oraz *hon* (CG), gdzie jako *n* określimy N-7, a O-6 lub O-4 przedstawione jest jako *o*. Warto zauważyć, że duży rowek prezentuje bardziej charakterystyczne układy donorów i akceptorów wodoru niż mały rowek. Podobnie fakt, iż jest on większy sprawia, że staje się on bardziej dostępny dla oddziaływań z białkami, które rozpoznają DNA.

### Grupa 2'-OH RNA pasuje do A-DNA, którego zasady są nachylone względem osi helisy, nie pasuje natomiast do helisy typu B-DNA

Badania dyfrakcji promieni rentgenowskich na odwodnionych włóknach DNA ujawniły istnienie odmiennej formy DNA, zwanej A-DNA, która pojawia się, gdy względna wilgotność cząsteczki wynosi poniżej 75%. A-DNA, podobnie jak B-DNA, jest dwuniciową prawoskrętną helisą, zbudowaną z dwóch przeciwnoległych nici, utrzymywanych oddziaływaniami między komplementarnymi parami zasad. Helisa typu A jest szersza i krótsza niż helisa typu B, a pary zasad ulegają przeważnie odchyleniu od



Rys. 31-6. Model szkieletowy wyidealizowanej helisy DNA typu A. [Narysowano na podstawie współrzędnych przedstawionych w pracy: S. Arnott, D.W.L. Hukins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47(1972):150-4]



Rys. 31-7. Konformacja reszty cukrowej wpływa znacznie na orientację mostków fosfodiestrowych i wiązań glikozydowych.  $C_{2'}-endo$  (występujące w B-DNA) oraz  $C_{3'}-endo$  (występujące w A-DNA) wskazuje, który z atomów pierścienia rybozowego leży powyżej płaszczyzny tworzonej przez pozostałe atomy węgla (w położeniu pokazanym na tym rysunku)

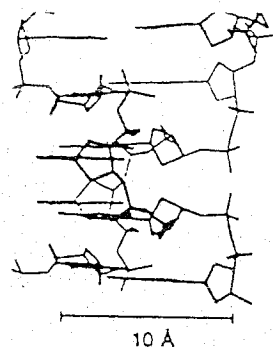
położenia prostopadłego względem osi cząsteczki (rys. 31-6). Powodem wielu różnic strukturalnych pomiędzy helisami typu A i B jest różna konformacja reszt rybozowych (rys. 31-7). C-3 rybozy budującej A-DNA znajduje się poza płaszczyzną, tworzoną przez cztery pozostałe atomy pierścienia furanozowego (konformacja  $C_3'$ -endo). W przypadku rybozy pochodzącej z B-DNA poza płaszczyzną jest C-2 (konformacja  $C_2'$ -endo). Występowanie rybozy o konformacji  $C_3'$ -endo w helisie typu A prowadzi do odchylenia par zasad od położenia prostopadłego względem osi cząsteczki o 19 stopni. Powoduje to niemalże całkowity zanik małego rowka. Grupy fosforanowe helisy typu A wiążą o kilka cząsteczek wody mniej niż w helisie B-DNA. Odwodnienie prowadzi zatem do powstawania formy A.

Występowanie struktur typu A nie ogranicza się wyłącznie do odwodnionego DNA. *Dwuniciowe rejonry RNA* (jak struktury spinki do włosów, s. 103) i *hybrydowe cząsteczki RNA-DNA* przyjmują formę dwuniciową, która strukturalnie przypomina helisę typu A. Grupa 2'-OH rybozy stanowi zawadę przestrzenną, nie pozwalającą na przybieranie przez cząsteczkę RNA klasycznej struktury B-DNA. W przypadku takiej struktury O-2' zbliżałby się zbyt mocno do trzech atomów sąsiadującej grupy fosforanowej oraz do jednego atomu kolejnej zasady. W helisie typu A atom O-2' znajduje się na zewnątrz helisy, z daleka od innych atomów.

### Z-DNA jest lewoskrętną dwuniciową helisą, której szkielet fosforanowy przypomina zygzak

Trzeci typ helisy DNA odkryli Alexander Rich i współpracownicy podczas prac nad strukturą odcinka o sekwencji CCCGCG. Stwierdzili oni, że zgodnie z oczekiwaniami 6-nukleotyd ten tworzy helisę o niciach ułożonych antyrównolegle, utrzymywanych przez oddziaływania między komplementarnymi zasadami. Jednakże helisa ta była ku ich zdumieniu *lewoskrętna*, w przeciwieństwie do *prawoskrętnych* cząsteczek typu A i B. *Szkielet fosforanowy cząsteczki przypominał budowę literę Z*, nazwano więc ją *formą Z-DNA*. Struktura taka powstaje dlatego, że jednostką powtarzalności dla

KONFORMACJA  
RESZT RYBOZY  
CO TO?



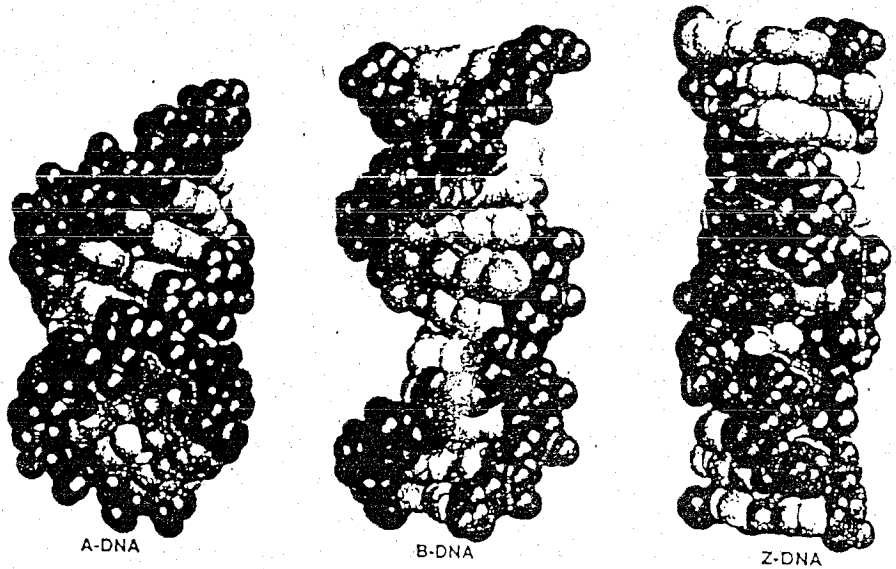
Rys. 31-8. Model szkieletowy Z-DNA — lewoskrętnej formy helikalnej DNA. Szkielet fosforanowo-cukrowy tworzy zygzak, ponieważ jednostką powtarzalności w tej helisie jest dinukleotyd. [Narysowano według 3zna.pdb. A.H.-J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, G. Van der Marel, J.H. Van Boom, A. Rich. *Science* 211(1981):171]

Tabela 31-1. Porównanie form A, B, i Z DNA

	Typ helisy		
	A	B	Z
Kształt	najszerza	średnia	najwęższa
Wzrost długości helisy na parę zasad	0,23 nm	0,34 nm	0,38 nm
Średnica helisy	2,55 nm	2,1 nm	1,84 nm
Kierunek skręcenia	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna
Wiązanie glikozydowe	anty	anty	anty dla C, T syn dla G
Liczba par zasad na skręt helisy	11	10	12
Skok helisy	2,53 nm	3,51 nm	4,56 nm
Odchylenie pary zasad od położenia prostopadłego do osi helisy	19°	1°	9°
Duży rowek	wąski i bardzo głęboki	szerszy i dość głęboki	płaski
Mały rowek	bardzo szeroki i płytki	wąski i dość głęboki	bardzo wąski i głęboki

helisy typu Z jest dinukleotyd, a nie mononukleotyd. Z-DNA różni się od A i B także tym, że ma tylko jeden, głęboki rowek.

Strukturę Z-DNA przybierają krótkie fragmenty oligonukleotydowe, których sekwencja składa się z następujących po sobie na przemian reszt purynowych i pirymidynowych. Do jej powstania potrzebne są także duże stężenia soli, aby zminimalizować oddziaływania elektrostatyczne między fosforanami szkieletu, które w cząsteczkach o takiej strukturze znajdują się bliżej siebie niż w cząsteczkach typu A- i B-DNA. W warunkach fizjologicznych większość DNA genomowego w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych znajduje się w formie B-DNA. Mimo że rola biologiczna Z-DNA nie jest znana, sama obecność takiej konformacji dowodzi, iż DNA jest cząsteczką giętą i dynamiczną. A-, B- i Z-DNA porównano w tab. 31-1 oraz na rys. 31-9.



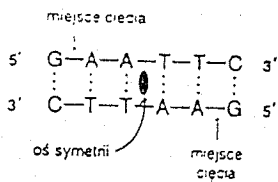
Rys. 31-9. Modele przestrzenne odcinków o długości 12 par zasad wyidealizowanych form A-DNA, B-DNA oraz Z-DNA. Zauważmy, że helisa Z-DNA jest lewoskrętna, natomiast helisy A-DNA i B-DNA są prawoskrętne. Niemal cały DNA w warunkach fizjologicznych występuje w formie B-DNA

### Endonukleaza restrykcyjna EcoRV znajduje sekwencję docelową przeglądając duży rowek DNA

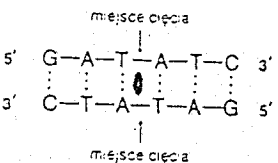
Bakterie mogą wykryć i zniszczyć cząsteczki DNA należące do infekujących je wirusów. Mają one *endonukleazy restrykcyjne* (*enzymy restrykcyjne*), które trawią obcy DNA, pozostawiające nietknięty ich własny, ulegający metylacji w miejscach potencjalnego rozpoznawania przez te białka. Endonukleazy restrykcyjne muszą działać szybko i dokładnie: infekcyjny DNA musi zostać szybko zdegradowany, natomiast genomowy DNA bakterii nie może zostać przecięty ani razu. Badania mechanizmu działania oraz struktury endonukleazy EcoRV pokazały, jak wielką specyficzność procesu można osiągnąć z zachowaniem pełnej aktywności katalitycznej. Ten enzym restrykcyjny rozpoznaje 6-nukleotydową sekwencję docelową, która jest *palindromowa* — ma *dwukrotną symetrię obrotową* (s. 122). W istocie większość sekwencji docelowych dla enzymów restrykcyjnych to sekwencje palindromowe. Obie nici przecinane są w identycznych miejscach, umieszczonych symetrycznie względem osi symetrii. Znana pojedynczego nukleotydu w sekwencji rozpoznawanej zmniejsza efektywność cięcia DNA o więcej niż milion razy. Dało to podstawę, by przypuszczać, że enzym — podobnie jak rozpoznawana przez niego sekwencja — jest symetryczny. Rzeczywiście EcoRV jest dimerem dwóch identycznych podjednostek i wiąże DNA w taki sposób, że oś dwukrotnej symetrii sekwencji rozpoznawanej zgadza się z osią dwukrotnej symetrii enzymu (rys. 31-10). Tak więc *symetria endonukleazy pokrywa się z symetrią jej sekwencji docelowej*.

#### ΠΡΟΝΑ ΝΟΜΗΜΑΤΑ ΜΗΜΟΝΑΝΟΡΕΠ

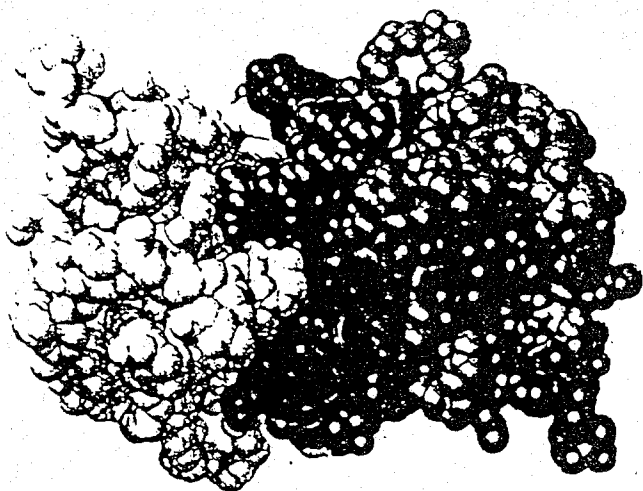
Palindromowa inskrypcja zapisana w języku greckim na chrzcielnicy, znajdującej się na dziedzińcu Hagia Sofia w Istambule (Konstantynopolu), mówi:  
„Obinij swoje grzechy, nie tylko swoją twarz.”



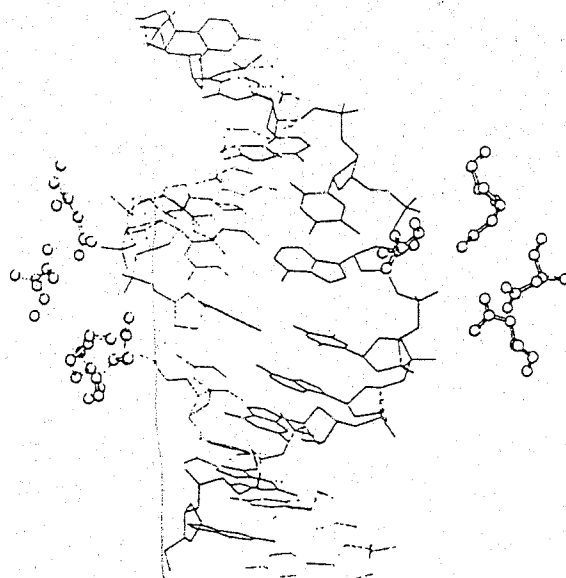
sekwencja docelowa EcoRI



sekwencja docelowa EcoRV



Rys. 31-10. Dwustronna symetria endonukleazy EcoRV pokrywa się z dwustronną symetrią rozpoznawanej przez nią sekwencji DNA. Dwie identyczne podjednostki endonukleazy — kolor niebieski i żółty, dwie identyczne nici sekwencji palindromowej — czerwony i zielony. [Narysowano według: 4rve.pdb. F.K. Winkler, D.W. Banner, C. Oefner, D. Tsemoglou, R.S. Brown, S.P. Heathman, R.K. Bryan, P.D. Martin, K. Petratos, K.S. Wilson. *EMBO J.* 12(1993):1781]



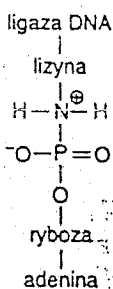
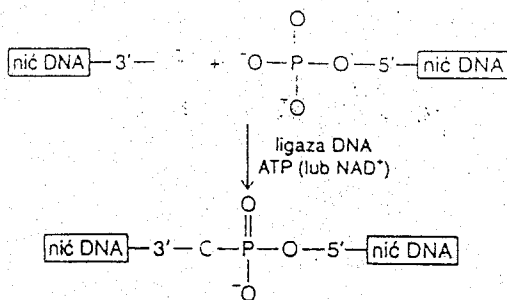
Rys. 31-11. Kiedy endonukleaza EcoRV osiągnie sześci nukleotydy docelową, dochodzi do wygięcia helisy DNA w obrębie tej sekwencji o około 50 stopni. Jedna z nici DNA — kolor czerwony, druga — zielony. Cztery reszty aminokwasowe kluczowe dla katalizy w jednej z podjednostek — kolor niebieski, a w drugiej podjednostce — żółty. [Narysowano według: 4rve.pdb. F.K. Winkler, D.W. Banner, C. Oefner, D. Tsemoglou, R.S. Brown, S.P. Heathman, R.K. Bryan, P.D. Martin, K. Petratos, K.S. Wilson. *EMBO J.* 12(1993):1781]

Endonukleaza EcoRV sprawdza nic DNA w poszukiwaniu sekwencji docelowej GATATC, dyfundując wzdłuż dużego rowka. Ścisłej mówiąc, pętla powierzchniowa utworzona ze struktury  $\beta$  każdej podjednostki enzymu kontaktuje się z większym rowkiem. Odnalezienie przez enzym specyficznej sekwencji prowadzi do dużych zmian strukturalnych zarówno w cząsteczce enzymu, jak i w docelowej sekwencji DNA (rys. 31-11). Podczas tego indukowanego dopasowania DNA ulega skręceniu o 50 stopni w połowie 6-nukleotydu sekwencji rozpoznawanej. Każda rozpoznająca pętla białkowa tworzy sześć wiązań wodorowych — wszystkie w dużym rowku — z dwoma skrajnymi parami zasad sekwencji GAT. Istotne jest, że jony  $Mg^{2+}$ , niezbędne do przeprowadzenia reakcji hydrolizy, dostają się do miejsca katalitycznego i ulegają koordynacyjnemu związaniu dopiero wtedy, gdy enzym odnajdzie sekwencję docelową. Widzimy tutaj wielką dynamiczność reakcji rozpoznawania DNA przez białko. Działanie EcoRV pokazuje, jak białko przeszukujące duży rowek DNA dzięki swej zdolności rozpoznawczej szybko i bardzo precyzyjnie odczytuje sekwencję nukleotydową.

## Ligaza łączy końce DNA w rejonach dwuniciowych

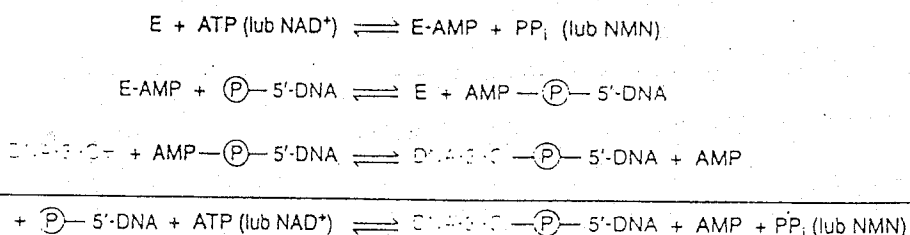
Odkrycie kołistego DNA (s. 89) wskazało na istnienie enzymu, który łączy końce łańcuchów DNA. W 1967 roku naukowcy w kilku laboratoriach jednocześnie odkryli ligazę DNA. Enzym ten katalizuje tworzenie się wiązania fosfodiesterowego między grupą 3'-OH jednego końca nici DNA i grupą 5'-fosforanową drugiego końca cząsteczki DNA (rys. 31-12). Do przeprowadzenia tej endoergicznej reakcji potrzebne jest źródło energii. W *Escherichia coli* i u innych bakterii tę rolę pełni  $NAD^+$ ; ligazy występujące w komórkach zwierzęcych oraz ligazy bakteriofagowe wykorzystują jako źródło energii ATP. Jak przedstawimy w dalszej części rozdziału, łączenie cząsteczek DNA jest kluczowym etapem takich procesów, jak normalna

Rys. 31-12. Ligaza DNA katalizuje łączenie nici DNA, które są częścią dwuniciowej cząsteczki helikalnej



Rys. 31-13. Produkt pośredni reakcji ligacji DNA, utworzony przez kowalencyjne związanie AMP z ligazą poprzez resztę lizyny enzymu. W ten sposób aktywowany jest AMP biorący udział w reakcji ligacji

Rys. 31-14. Mechanizm reakcji katalizowanej przez ligazę DNA



synteza DNA, naprawa uszkodzonego DNA oraz składanie łańcuchów DNA podczas rekombinacji genetycznej.

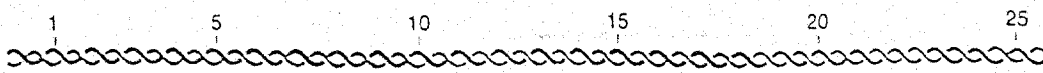
Ligaza DNA nie może łączyć lub zamykać w formę kolistą jednoniciowych cząsteczek DNA. Natomiast ligaza skleja pęknięcia w dwuniciowych cząsteczkach DNA. Enzym *E. coli* tworzy wiązania fosfodiesterowe zwykle tylko wtedy, gdy w pobliżu pęknięcia występuje przynajmniej kilka par zasad. Ligaza kodowana przez bakteriofaga T4 może łączyć dwie dwuniciowe helikalne cząsteczki DNA, zakończone tępymi końcami. Ta właściwość ligazy faga T4 zrewolucjonizowała rekombinacyjną technologię DNA.

Przyjrzyjmy się mechanizmowi łączenia DNA przez ligazę, który wyjaśnił I. Robert Lehman. ATP (lub w przypadku niektórych ligaz NAD<sup>+</sup>) dostarcza enzymowi aktywowanej reszty AMP, dzięki czemu tworzy się kompleks enzymu związanego kowalencyjnie z AMP (kompleks enzym-adenylan), w którym AMP połączony jest z enzymem wiązaniem fosfoamidowym poprzez resztę ε-aminową lizyny (rys. 31-13). Jednocześnie uwalniany jest pirofosforan (lub mononukleotyd nikotynoamidoadeninowy — NMN). Zaktywowana reszta AMP jest następnie przenoszona z reszty lizyny na koniec 5' łańcucha DNA i w ten sposób powstaje kompleks adenylan-DNA. Ostatnim etapem procesu jest nukleofilowy atak grupy 3'-OH na zaktywowany fosforanem koniec 5' DNA. Ten ciąg reakcji (rys. 31-14) napędzany jest hydrolizą pirofosforanu, uwolnionego podczas tworzenia kompleksu enzym-adenylan. Gdy zatem źródłem energii jest ATP, do wytworzenia wiązania fosfodiesterowego w cząsteczce DNA potrzebne są dwa wysokoenergetyczne wiązania fosforanowe. Gdy donorem adenylanu jest NAD<sup>+</sup>, także dwa wiązania bezwodnikowe zużywane są do odtworzenia cząsteczki NAD z NMN i ATP.

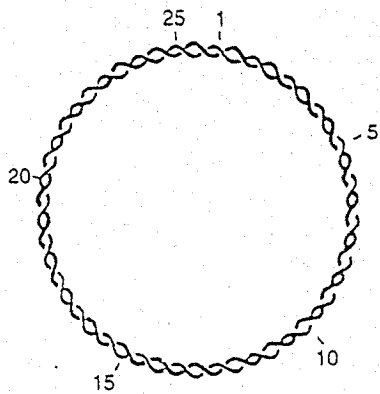
### Liczba opleceń DNA jest cechą topologiczną, determinującą stopień skręcenia superhelikalnego

Jak zaobserwował Jerome Vinograd w roku 1963, kolisty DNA wirusa *polio* w czasie wirowania rozdzielał się na dwa pasma. Podczas rozwiązywania tej zagadki odkrył on ważną właściwość kolistego DNA, jakiej nie mają cząsteczki liniowe. Rozważmy odcinek o długości 260 pz i konformacji helisy B-DNA (rys. 31-15A). Ponieważ ilość zasad przypadających na jeden skręt w cząsteczce DNA wynosi 10,4, ta liniowa cząsteczka tworzy 25





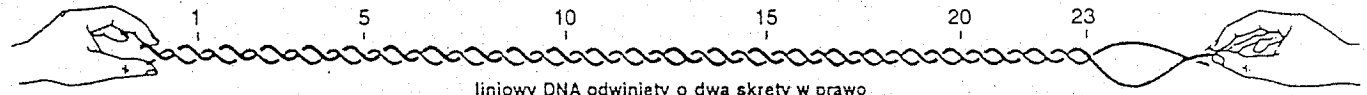
A



$Lk = 25, Tw = 25, Wr = 0$

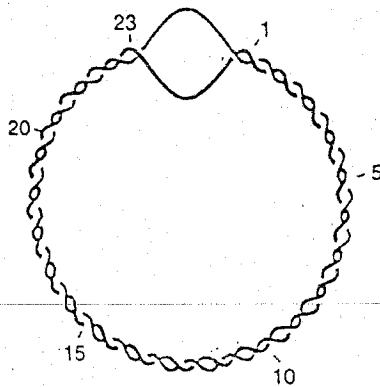
B

rozluźniona cząsteczka kolista



liniowy DNA odwinięty o dwa skręty w prawo

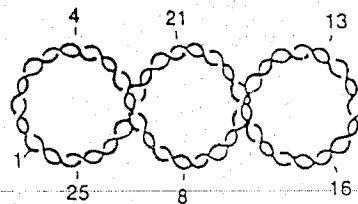
C



$Lk = 23, Tw = 23, Wr = 0$

D

odwinięta cząsteczka kolista



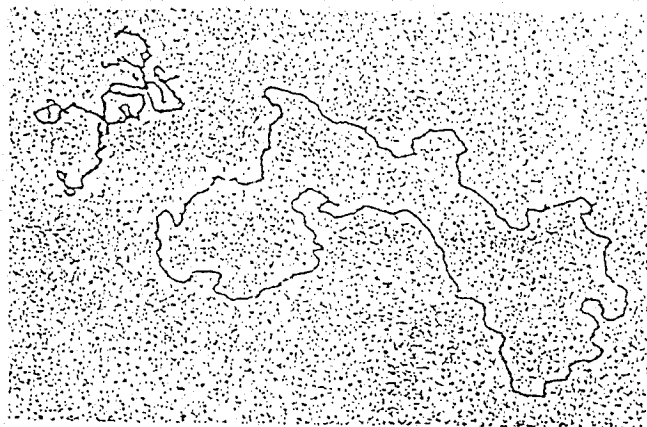
$Lk = 23, Tw = 25, Wr = -2$   
ujemnie superhelikalna cząsteczka  
(~~pr~~skretna)  
lewo

E

Rys. 31-15. Schematyczny rysunek ukazujący liczbę opleceń ( $Lk$ ), liczbę skrętów ( $Tw$ ) oraz liczbę zwojów ( $Wr$ ) kolistych cząsteczek DNA. [Według: W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure* (Springer-Verlag, 1984), p. 452]

(260/10,4) skrętów. Teraz połączmy końce tej helisy, tworząc *zrelaksowany* kolisty DNA (rys. 31-15B). Zupełnie inny kolisty DNA może powstać, kiedy odwinie my liniową cząsteczkę DNA o dwa skręty przed połączeniem jej w strukturę kolistą (rys. 31-15C). Jakie są następstwa odwinięcia DNA przed połączeniem końców? Możliwe jest przybranie przez nią dwóch konformacji. DNA może przybrać strukturę tworzącą 23 skręty helisy oraz odwiniętą pętlę nie tworzącą dodatkowych splotów (rys. 31-15D). DNA może także przybrać strukturę *superhelikalną*, gdzie helisa tworzy 25 skrętów oraz 2 skręty *lewo*skretną (określaną jako *ujemna*) struktury superhelikalnej (rys. 31-15E).

Przybranie konformacji superhelikalnej znacząco wpływa na ogólną formę DNA. *Cząsteczka superhelikalna DNA jest bardziej zwarta niż zrelaksowany (rozluźniony) DNA tej samej długości* (rys. 31-16). Dlatego też w czasie



Rys. 31-16. Mikrografia elektronowa rozluźnionej i ujemnie superhelikalnej formy DNA. [Dzięki uprzejmości: Dr. Jack Griffith]

wirowania lub elektroforezy superhelikalny DNA porusza się szybciej niż jego zrelaksowana forma. Podczas eksperymentu Vinograda szybciej sedymentował superhelikalny DNA, natomiast wolniej sedymentujący DNA był zrelaksowany, ponieważ jedna jego nić była pęknięta.

Nasze zrozumienie konformacji DNA wzbogacone jest o wiedzę dostarczaną przez topologię — gałąź matematyki zajmującą się właściwościami strukturalnymi cząsteczek, które nie ulegają zmianie podczas deformacji, takich jak rozciąganie czy zginanie. Kluczową właściwością topologiczną cząsteczki kolistej DNA jest *liczba opleceń* (ang. *linking number* —  $Lk$ ), która określa, ile razy jedna nić DNA owija się prawoskrętnie wokół osi helisy, sprowadzonej do prostej leżącej na płaszczyźnie. Dla zrelaksowanego DNA przedstawionego na rysunku 31-15B  $Lk = 25$ . Dla rozwiniętej cząsteczki (31-15D) oraz dla superhelikalnej (31-15E)  $Lk = 23$ , ponieważ helisa została odwinięta o całkowite dwa skręty przed połączeniem końców i wytworzeniem formy kolistej. Cząsteczki różniące się wyłącznie  $Lk$  są względem siebie *topologicznie izomeryczne* (*topoizomery*). Zmiana konformacji topoizomerów jest możliwa jedynie przez przecięcie jednej lub obydwu nici DNA i ponowne ich połączenie.

Rozpleciona i superhelikalna cząsteczka DNA pokazane na rysunku 31-15D i E, są topologicznie identyczne, lecz różne geometrycznie. Mają one tę samą wartość  $Lk$ , lecz różnią się wartościami  $Tw$ , czyli *liczbą skrętów* (ang. *twisting number*) oraz  $Wr$ , czyli *liczbą zwojów* (ang. *writhing number*).  $Tw$  odzwierciedla helikalne skrócenie nici DNA względem siebie nawzajem, natomiast  $Wr$  jest miarą zwinienia osi dwuniciowej helisy (ściśle definicje  $Tw$  i  $Wr$  są skomplikowane). Czy istnieje zależność między  $Tw$  i  $Wr$ ? Tak: topologia określa, że suma  $Tw$  i  $Wr$  jest po prostu równa  $Lk$ .

$$Lk = Tw + Wr$$

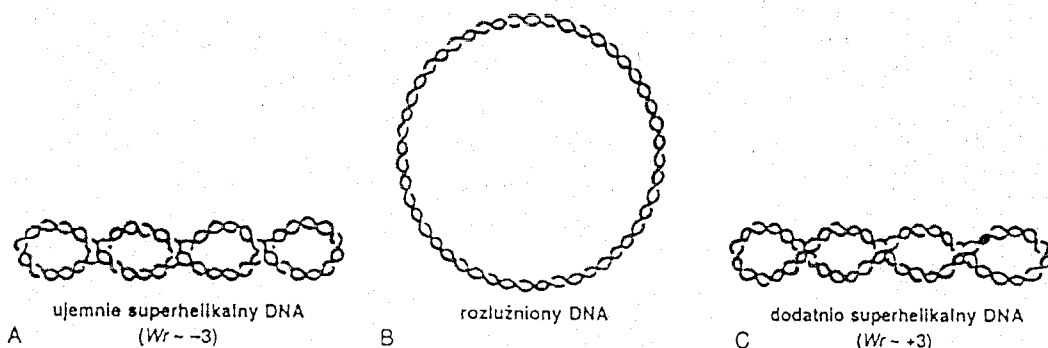
Na rysunku 31-15, rozwinięty kolisty DNA ma  $Tw \sim 23$  i  $Wr \sim 0$ , natomiast superhelikalny DNA ma  $Tw \sim 25$  i  $Wr \sim -2$ . Te formy mogą przechodzić jedna w drugą bez przerywania łańcucha DNA, ponieważ mają tę samą wartość  $Lk$ , mianowicie 23. Podział wartości  $Lk$  (która musi być liczbą całkowitą) między wartości  $Tw$  i  $Wr$  (które nie muszą być liczbami całkowitymi) jest określony przez energetykę konformacji. Energia swobodna osiąga wartość minimalną wtedy, gdy 70% zmiany  $Lk$  wyrażone jest przez  $Wr$ , a 30% — przez  $Tw$ . Tak więc najbardziej stabilna forma będzie mieć wartości  $Tw = 24,4$  oraz  $Wr = -1,4$ . A więc *zmniejszenie  $Lk$  powoduje zarówno prawostronne (ujemne) superhelikalne skrócenie osi DNA, jak i rozwinięcie helikalnej struktury Watsona-Cricka*. Topoizomery różniące się wartościami  $Lk$  zaledwie o 1, a co za tym idzie  $Wr$  o 0,7, mogą być łatwo rozdzielane podczas elektroforezy w żelu agarozowym, ponieważ ich objętości hydrodynamiczne są zupełnie różne — *superhelikalność powoduje „zagęszczenie” DNA*.

## Najczęściej występujące cząsteczki DNA są ujemnie superhelikalne

Stopień superhelikalności cząsteczki DNA może być wyrażony pojęciem *gęstości superhelikalnej*  $\sigma$ , która jest niezależna od długości tej cząsteczki.

$$\sigma = (Lk - Lk_0) / Lk_0$$

$Lk_0$  jest liczbą opleceń zrelaksowanych kolistych cząsteczek DNA. Dla superhelikalnego DNA przedstawionego na rys. 31-15E  $Lk = 23$ ,  $Lk_0 = 25$ , tak więc  $\sigma = -0,08$ . Gęstość superhelikalna większości naturalnych cząsteczek DNA wynosi około  $-0,06$ . Znak minus wskazuje, że występujący naturalnie superhelikalny DNA jest prawoskrętny (tak jak w przykładzie). Innymi słowy powstaje on przez zbyt małe skręcanie lub rozplatanie cząsteczek DNA. *Ujemna superhelikalność przygotowuje DNA do procesów wymagających rozdzielania nici: replikacji, rekombinacji i transkrypcji.* Dodatnia superhelikalność (rys. 31-17) pozwalałaby kondensować DNA z tą samą efektywnością jak ujemna, jednak rozdzielanie nici byłoby dużo trudniejsze. Widzimy tutaj wyraźną przyczynę powszechniejszego występowania w przyrodzie ujemnie superhelikalnego skrętu.

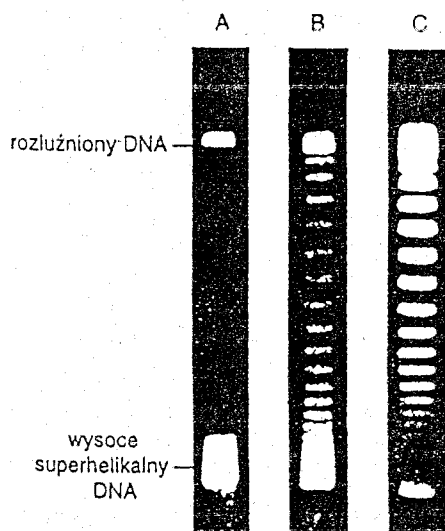


Rys. 31-17. Schematy cząsteczek DNA różniących się stopniem superhelikalności.

A — ujemnie superhelikalna ( $Wr \sim -3$ , prawoskrętna);  
 B — forma zrelaksowana ( $Wr = 0$ );  
 C — dodatnio superhelikalna ( $Wr \sim +3$ , lewoskrętna). Większość występującego naturalnie DNA jest ujemnie superhelikalna

## Topoizomeraza I katalizuje relaksację superhelikalnego DNA

Wzajemne przekształcenia topoizomerów DNA (rys. 31-18) są katalizowane przez enzymy *topoizomerazy*, których odkrywcami byli James Wang i Martin Gellert. Enzymy te zmieniają liczbę opleceń DNA, katalizując trzostopniowy proces: 1) *przecinanie* jednej lub obu nici DNA, 2) *przenoszenie* segmentu



Rys. 31-18. Obraz uzyskany z rozdziału elektroforetycznego superhelikalnych cząsteczek DNA wirusa SV40.

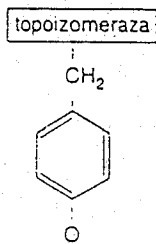
A — cząsteczka DNA o dużym stopniu superhelikalności. Inkubacja DNA w obecności topoizomerazy: B — przez 5 minut, C — przez 30 minut prowadzi do powstania szeregu cząsteczek o mniejszym stopniu superhelikalnego skręcenia. Różnica wartości  $Lk$  między poszczególnymi formami superhelikalnymi wynosi 1, różnica  $Wr$  — około 0,7. [Z. W. Keller. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72(1975):2553]

„Twym ostrym zębem rozwiąż splątany żywota węzeł”.

WILIAM SHAKESPEARE (1608)

„Antoniusz i Kleopatra” (V, ii)

tlum. J. Urbańskiego, wydane w 1875 r.  
 przez Warszawską Spółkę Księgarzy  
 pod redakcją J.I. Kraszewskiego)

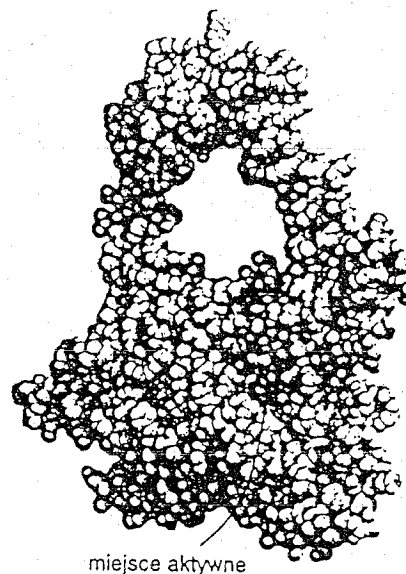


Rys. 31-19. Produkt pośredni reakcji katalizowanej przez topoizomerazę. Grupa 5'-fosforanowa znajdująca się na końcu przecinanej nici DNA jest połączona kowalencyjnie z grupą hydroksylową specyficznej reszty tyrozyny w cząsteczce enzymu

DNA przez wytworzoną w ten sposób przerwę. 3) *ponowne łączenie* przeciętego DNA. Topoizomerazy typu I ma tylko jedną nić DNA, natomiast typu II rozcinają obydwie nici.

Topoizomeraza typu I z *E. coli* katalizuje *relaksację ujemnie superhelikalnego DNA*. *Przyjęty a priori* model działania enzymu zakładał, że w pierwszej fazie procesu wykazuje on aktywność nukleazową, a w następnej — aktywność ligazy. Stwierdzono jednak, że powstawanie kolistych cząsteczek zachodziło przy braku ATP, NAD<sup>+</sup> lub innych donorów energii. To odkrycie wykluczało możliwość zajścia reakcji hydrolizy DNA na początku procesu — tworzenie się wiązania fosfodiesterowego między wolną grupą hydroksylową i wolną grupą fosforanową DNA wymaga źródła energii. Sugerowało to w sposób oczywisty, że *jeden z końców przecinanej nici zostaje zaktywowany przez kowalencyjne związanie z enzymem*. I rzeczywiście — wyizolowano kompleks kowalencyjnie związanego enzymu i DNA z mieszaniny reakcyjnej, denaturując topoizomerazę siarczanem dodecylu sodu w czasie trwania jej cyklu katalitycznego. Stwierdzono, że 5'-fosforan nici DNA łączy się z grupą hydroksylową tyrozyny tego białka, którego masa cząsteczkowa równa jest 97 kDa (rys. 31-19). Grupa 3'-OH, znajdująca się na drugim końcu przeciętej nici, atakuje nukleofilowo aktywowany produkt pośredni, odtwarzając ciągłość nici kolistej cząsteczki. Warto zauważyć, że wiązania chemiczne substratu i produktu tej reakcji są identyczne. Jedyną rolą topoizomerazy jest stworzenie czasowego przerwania nici DNA, co umożliwia przeniesienie odcinka DNA. Liczba powizań negatywnie superhelikalnej cząsteczki wzrasta o +1 (relaksacja) na każdy cykl katalityczny. Interesującą właściwością strukturalną cząsteczki topoizomerazy jest otwór wystarczająco duży, by zmieścić dwuniciową helisę DNA.

Rys. 31-20. Struktura topoizomerazy I z *E. coli*. Ten monomeryczny enzym o masie cząsteczkowej 97 kDa ma domenę N-kończącą 67-kDa, która tworzy strukturę przypominającą obręcz o średnicy 2,75 nm, wystarczająco dużą, by w niej pomieścić dwuniciową helisę DNA. Reszta tyrozyny, która w czasie reakcji wiąże się z 5'-fosforanem przecinanej nici DNA — kolor czerwony, kilka reszt aminokwasowych tworzących miejsce aktywne — żółty. Enzym musi podlegać dużym zmianom strukturalnym, by okolicę dwuniciową helisę DNA i umożliwić mu przesunięcie się przez szczelinę między przeciętymi końcami jednej z nici DNA. [Narysowano na podstawie współrzędnych uprzejmie udostępnionych przez: Dr. A. Mondragón. C.D. Lima, J.C. Wang, A. Mondragón. *Nature* 367(1994):138]



### Gyraża DNA katalizuje wprowadzanie ujemnych skrętów superhelikalnych do DNA kosztem ATP

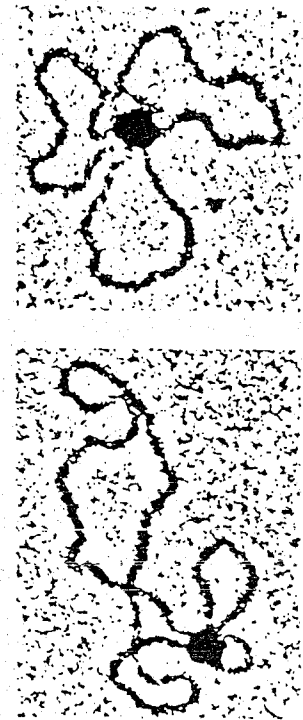
Reakcja katalizowana przez topoizomerazę I, relaksacja superhelikalnego DNA, jest termodynamicznie korzystna. A co z tworzeniem superhelis? Superhelikalność pochłania energię, ponieważ superhelikalna cząsteczka, w przeciwieństwie do swego zrelaksowanego partnera, jest torsyjnie napięta. Wprowadzenie dodatkowego superskrętu do cząsteczki DNA o  $\sigma = -0,06$  pochłania około 37,7 kJ/mol. Tak więc w postaci skrętów superhelikalnych

naturalnie występujących cząsteczek DNA przechowywana jest spora porcja energii.

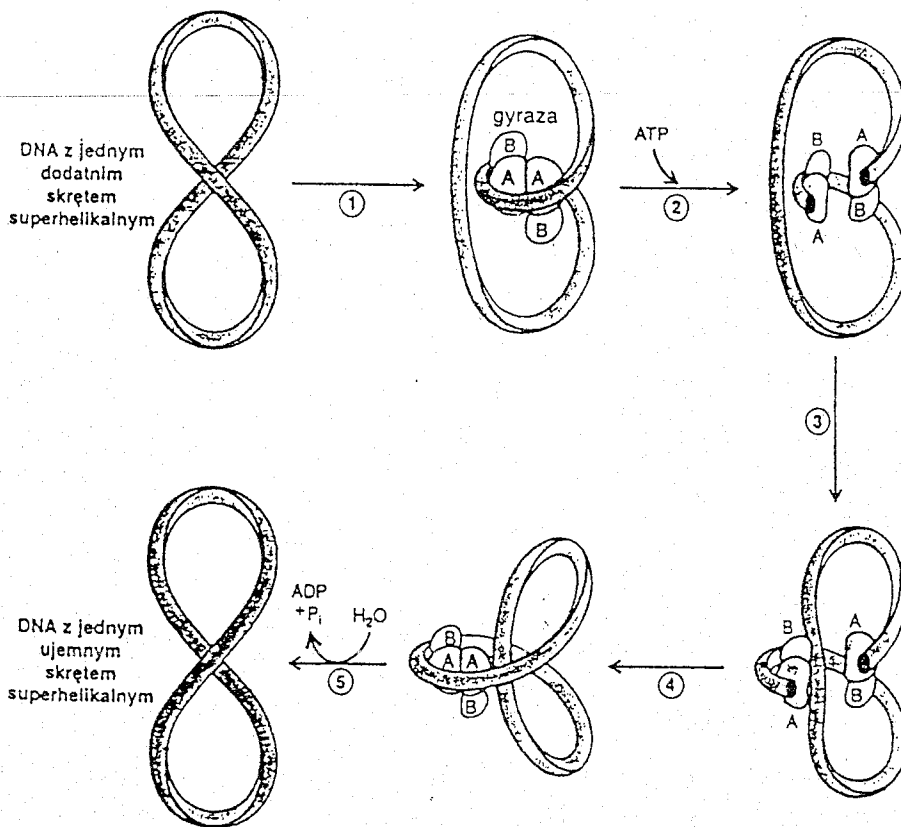
Tworzenie struktur superhelikalnych u *E. coli* katalizowane jest przez gyrazę, topoiizomerazę złożoną z dwóch łańcuchów białkowych o masie 105 kDa (A) i dwóch łańcuchów o masie 95 kDa (B). Gyraza DNA jest „urządzeniem przenoszącym energię”: przekształca energię swobodną ATP w energię torsyjnego napięcia cząsteczki superhelikalnej. Reakcja rozpoczyna się nawinięciem około 200 par zasad wokół enzymu (etap 1 na rys. 31-21). Związanie ATP powoduje przecięcie obydwu nici DNA (etap 2); miejsce cięcia na jednej nici przesunięte jest względem miejsca cięcia na drugiej nici o cztery nukleotydy. Ufosforylowany koniec 5' każdej z przeciętych nici jest wiązany ze specyficzną resztą tyrozyny podjednostki A enzymu. Zakotwiczenie obydwu końców przeciętego DNA jest istotnym zabezpieczeniem swobodnej rotacji cząsteczki, która prowadziłaby do utraty superhelikalności.

Następnie odcinek dwuniciowego DNA przechodzi przez przerwę między przeciętymi niemi. Przeniesienie jest wektorowe (ukierunkowane) — gyraza DNA pozwala tylko na przejście prowadzące do powstania ujemnie skreconej cząsteczki. Przecięte końce DNA są następnie łączone dla odtworzenia ciągłości obydwu nici dupleksu (etap 4). Hydroliza związanego ATP prowadzi w końcu do uwolnienia przeniesionego odcinka DNA, umożliwiając wejście enzymu w kolejny cykl katalityczny (etap 5). Gyraza DNA każdorazowo zmniejsza liczbę opleceń (*Lk*) swojego substratu o wartość 2, ponieważ dwuniciowy DNA przechodzi przez przerwę w obydwu niciach. Enzym może wykonywać około 2 ujemnych skręceń na sekundę. Gyraza DNA może również powtarzać kolejne cykle katalityczne, nie oddysocjując od cząsteczki DNA.

Stopień superhelikalnego skręcenia bakteryjnego DNA jest zatem określony działaniem dwóch enzymów. Ujemna superhelikalność wprowadzana jest przez gyrazę DNA i usuwana przez topoiizomerazę I. Ilość tych enzymów



Mikrografie elektronowe gyrazy DNA związanej z ujemnie superhelikalnymi cząsteczkami DNA



Rys. 31-21. Schemat działania gyrazy DNA, zmieniającej liczbę opleceń dwuniciowej cząsteczki DNA. Początkowo DNA ma jeden dodatni skręt superhelikalny. Po przecięciu i ponownym połączeniu obydwu nici DNA ma jeden ujemny skręt superhelikalny. Liczba opleceń maleje zatem o 2. [Według rysunku uprzejmie udostępnionego przez: Dr. Nicholas Cozzarelli]

jest regulowana przez komórkę do osiągnięcia właściwego ujemnego skręcenia superhelikalnego bakteryjnego DNA. Bakteryjna gyraza DNA ulega działaniu kilku antybiotyków, które hamują enzym prokariotyczny o wiele efektywniej niż eukariotyczny. *Novobiocyna* zapobiega wiązaniu ATP do gyrazy. *Kwas nalidyksowy* i *cyprofloksacyna* natomiast wpływają na proces rozcinania i ponownego łączenia łańcuchów DNA. Te dwa inhibitory gyrazy są często używane w leczeniu bakteryjnych zakażeń dróg moczowych i innych infekcji.

## Polimeraza DNA I była pierwszym odkrytym enzymem sterowanym przez matrycę

Powróćmy teraz do opisu replikacji DNA na poziomie molekularnym. Poszukiwania enzymu, który syntetyzuje DNA, rozpoczął Artur Kornberg wraz z współpracownikami w 1955 roku. Wkrótce okazały się owocne, głównie dzięki właściwemu określeniu celu poszczególnych eksperymentów:

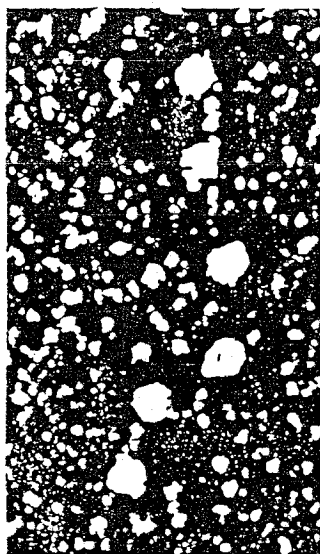
1. *Jakie są aktywowane prekursor DNA?* Badacze prawidłowo określili, że aktywowanymi substratami do syntezy DNA są *5'-trifosforany deoksyrybonukleozydów*. Ta konkluzja opierała się na dwóch wskazówkach. Po pierwsze, szlaki biosyntezy puryn i pirymidyn prowadzą do powstania *5'-fosforanów*, a nie do *3'-fosforanów* nukleozydów (s. 791). Po drugie, ATP jest aktywowanym substratem podczas syntezy wiązań fosforanowych w koenzymach, takich jak NAD<sup>+</sup>, FAD, czy CoA (s. 805)

2. *W jaki sposób powinno się badać syntezę DNA?* Przypuszczano, że ilość syntetyzowanego DNA może być bardzo mała, konieczne zatem było zastosowanie bardzo czułych metod wykrywania. Zamierzony efekt osiągnięto dzięki użyciu prekursorowych radioaktywnych nukleotydu. Włączanie prekursorów do syntetyzowanego łańcucha DNA badano przez pomiar radioaktywności w kwasowym osadzie mieszaniny reakcyjnej. (Dodanie kwasu trichlorooctowego do mieszaniny reakcyjnej powoduje wytrącenie DNA, natomiast prekursor syntezy DNA — trifosforany nukleozydów pozostają w roztworze.)

3. *Jaki rodzaj komórek powinno się badać?* Komórki bakteryjne użyto po uzyskaniu negatywnych rezultatów eksperymentów z zastosowaniem ekstraktów komórek zwierzęcych. Wybrano *E. coli*, ponieważ komórki te dzielą się co 20 minut, a bakterie można hodować w dużych ilościach. Zgodnie z oczekiwaniami bakteria ta okazała się dobrym źródłem enzymu, który syntetyzował DNA.

Ekstrakt *E. coli* inkubowano ze znakowaną radioaktywnie deoksytymidyną. Poziom radioaktywności <sup>14</sup>C tego prekursora wynosił około miliona zliczeń na minutę. Kwasowy precypitat z tej mieszaniny wykazał zaledwie pięćdziesiąt zliczeń na minutę. Zsyntetyzowanych zostało tylko kilka pikomoli DNA, ale to był dopiero początek. Kornberg napisał: „Choć ilość nukleotydu wbudowana do DNA była minimalna, niemniej jednak była ona większa niż w próbie odniesienia. W tę wąską szczelinę chcieliśmy wbić klin. Młotem była technika oczyszczania enzymu, którą opracowano podczas wyjaśniania procesu fermentacji alkoholowej”.

Nowy enzym nazwano *polimerazą DNA*. Obecnie nazywany jest *polimerazą DNA I*, ponieważ od tego czasu wyizolowano inne polimerazy DNA. Po dziesięciu latach od odkrycia dokonanego w laboratorium Kornberga polimerazę DNA I oczyszczono do stanu homogenności i szczegółowo scharakteryzowano. Ogrom zadania można najlepiej ocenić na podstawie informacji, że 500 mg czystego enzymu otrzymano ze 100 kg komórek *E. coli*. Jak wkrótce przedstawimy, polimeraza DNA I nie jest enzymem,



Rys. 31-22. Mikrografia elektronowa cząsteczek polimerazy DNA I związanych z syntetyczną matrycą DNA. [Dzięki uprzejmości: Dr. Jack Griffith]