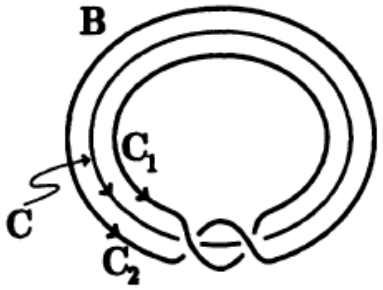
DNA i węzły

Najnowsze badania ukazały, że typ węzła cząsteczki DNA ma ważny wpływ na aktualne funkcje cząsteczki DNA.

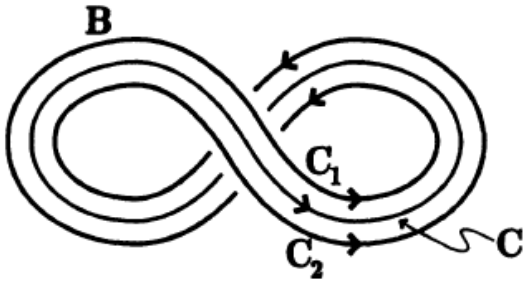
Matematyczny model cząsteczki DNA.

- Matematyczny model cząsteczki DNA to zwykle cienka, długa, zorientowana, skręcona wstążka.
- Na tym rysunku, wstążka jest homeomorficzna z $S^1 \times [-1, 1]$, ale nie z wstęgą Möbiusa.



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathrm{Wr}(B) = 0,\ \mathrm{Tw}(B) = 1$

(a)

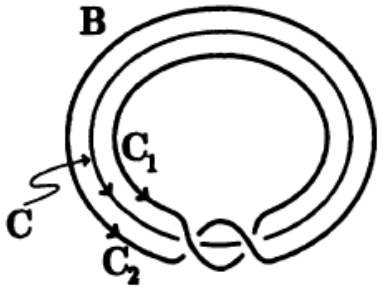


$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathrm{Wr}(B) = -1,\ \mathrm{Tw}(B) = 0$

(b)

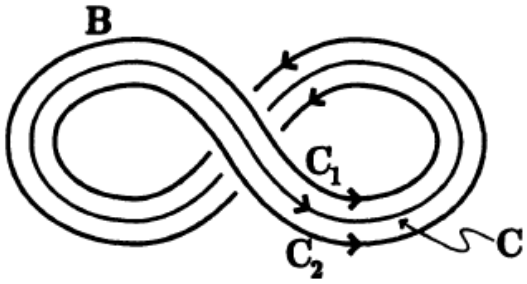
Matematyczny model cząsteczki DNA.

- Obie krzywe C_1 oraz C_2, które stanowią brzegi wstęgi B reprezentują zamknięte nici DNA.
- Możemy ustalić orientację na krzywej C, która stanowi oś dla B (tj. centralnej krzywej $S^1 \times \{0\}$).
- Orientacja na C idukuje orientacje na C_1 i C_2.
- Indeks zaczepienia $lk(C_1, C_2)$ jest niezmiennikiem, i jego zmiana ma bardzo istotny wpływ na strukturę cząsteczki DNA.
- Jeśli zredukujemy indeks zaczepienia podwójnej nici cząsteczki DNA, wtedy efektem jest skręcenie lub zwinięcie, znane jako superskręcenie (supercoiling).



$\mathbf{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathbf{Wr}(B) = 0$, $\mathbf{Tw}(B) = 1$

(a)

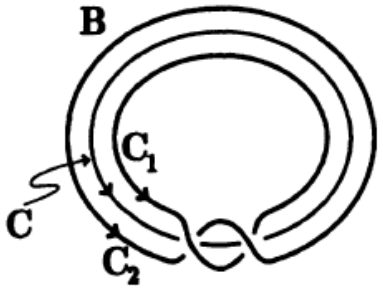


$\mathbf{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathbf{Wr}(B) = -1$, $\mathbf{Tw}(B) = 0$

(b)

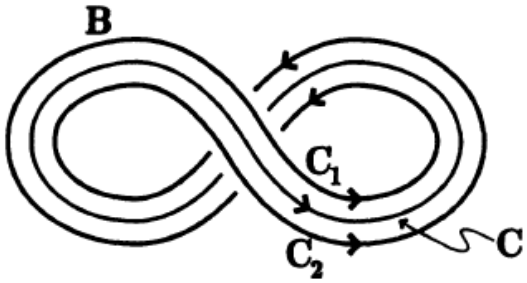
Matematyczny model cząsteczki DNA.

- Obniżenie indeksu zaczepienia cząsteczki DNA, może powodować enzym topoizomeraza.
- Topoizomerazy katalizują przekształcanie DNA do formy superhelikalnej oraz jego relaksację, tnąc i ponownie łącząc nici helisy.
- Dla przykładu, wiadomo, że jeśli zredukujemy indeks zaczepienia dwuniciowej cząsteczki DNA, wtedy rezultatem jest powstanie form superhelikalnych.



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathrm{Wr}(B) = 0,\ \mathrm{Tw}(B) = 1$

(a)

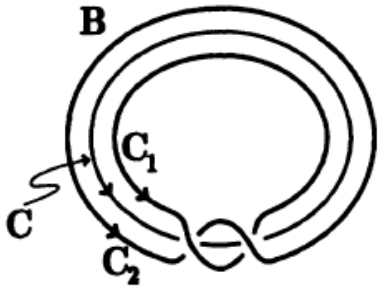


$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathrm{Wr}(B) = -1,\ \mathrm{Tw}(B) = 0$

(b)

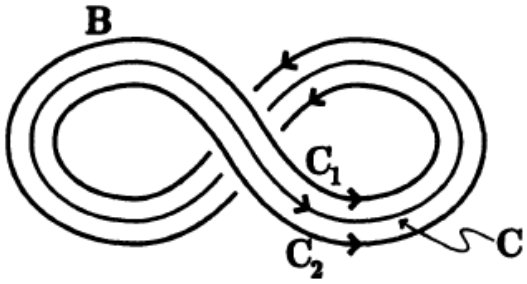
Matematyczny model cząsteczki DNA.

- W rzeczywistości, orientacja cząsteczki DNA nie jest dokładnie jak wyżej.
- Orientacje, w rzeczywistości, na dwóch niciach DNA są wzajemnie przeciwne, dlatego może powinniśmy przypisać wzajemnie orientacje dla krzywych C_1 i C_2.
- Jednak w przypadku supła stworzonego przez C_1 i C_2, indeks zaczepienia zdefiniowany na cząsteczce DNA w biologii i indeks zaczepienia wyznaczony z modelu matematycznego zgadzają się. Z obliczeniowego punktu widzenia nie ma więc błędu.



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathrm{Wr}(B) = 0,\ \mathrm{Tw}(B) = 1$

(a)



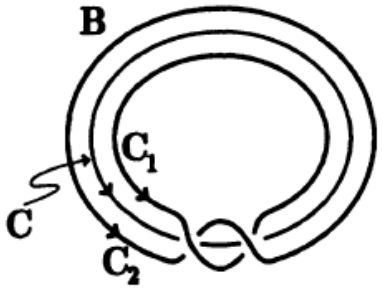
$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathrm{Wr}(B) = -1,\ \mathrm{Tw}(B) = 0$

(b)

Matematyczny model cząsteczki DNA.

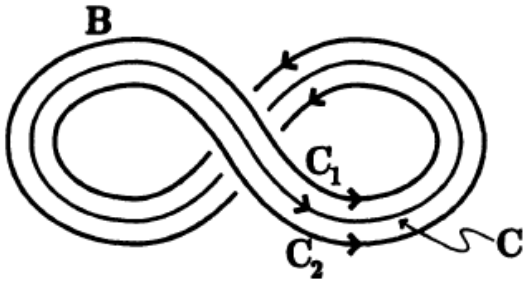
Skręcenia, a zwoje.

- Liczba skręceń wstążki B wokół osi C, nazwa się skręceniem B (twisting number) i jest oznaczana przez $Tw(B)$.
- Skrutowo, liczba zwojów (Writhe) $Wr(B)$ jest określona w zależności od osi C, którą traktujemy tu jako krzywą w przestrzeni. Jeśli C to krzywa na płaszczyźnie, to $Wr(B) = 0$, zatem $Wr(B)$ może być miarą tego jak bardzo B nie jest płaska.
- Liczby $Tw(B)$, $Wr(B)$ są niezmiennikami, ale nie węzła otrzymanego z DNA, ale niezmiennikami geometrii różniczkowej wstążki B, jako powierzchni w przestrzeni.



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathrm{Wr}(B) = 0$, $\mathrm{Tw}(B) = 1$

(a)



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathrm{Wr}(B) = -1$, $\mathrm{Tw}(B) = 0$

(b)

Matematyczny model cząsteczki DNA.

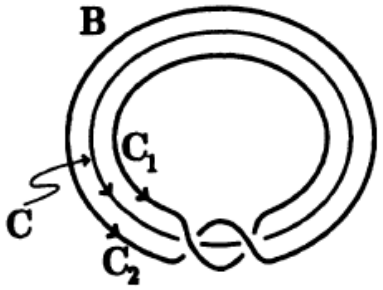
Skręcenia, a zwoje.

- *Tw* odzwierciedla holikalne skręcenie nici DNA wzgledem siebie nawzajem.
- Natomiast *Wr* jest miarą zwinięcia osi dwuniciowej helisy.

$$Lk(C_1, C_2) = Tw(B) + Wr(B). \tag{1.1}$$

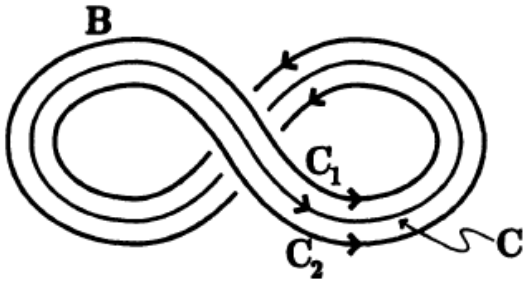
Uwaga

Kiedy odplątywujemy jedną nić podwójnej helisy, wtedy oś DNA skręca się w helisę.
Równość 1.1 opisuje tę cechę.



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = 1$
$\mathrm{Wr}(B) = 0,\ \mathrm{Tw}(B) = 1$

(a)



$\mathrm{lk}(C_1, C_2) = -1$
$\mathrm{Wr}(B) = -1,\ \mathrm{Tw}(B) = 0$

(b)

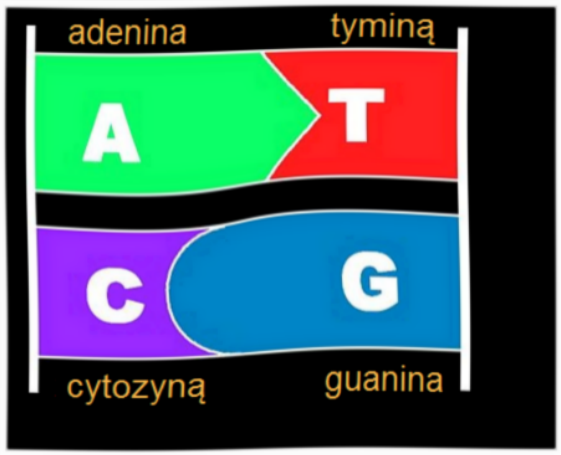
Para zasad (base pair), notacja pz lub bz

Para zasad: kompementarne (rysunek obok), połączone wiązaniami wodorowymi zasady azotowe nukleotydów dwóch różnych nici kwasu nukleinowego.

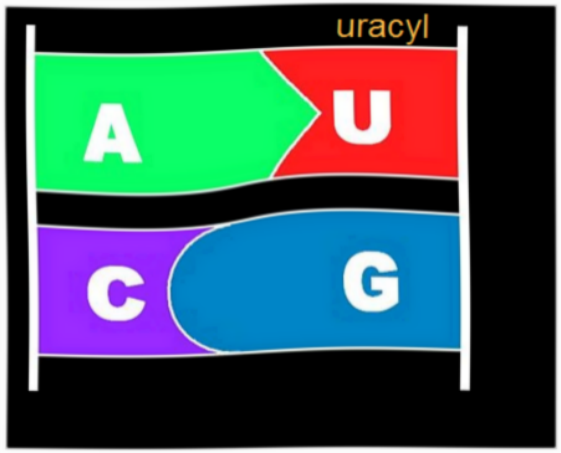
W parach zasad podaje się długość cząsteczki DNA.

Komplementarność zasad w przykładowym łańcuchu DNA:

CTAGTAGCTA
GATCATCGAT
Fragment DNA o długości 10 pz.



Komplementarność zasad w DNA



Komplementarność zasad w RNA

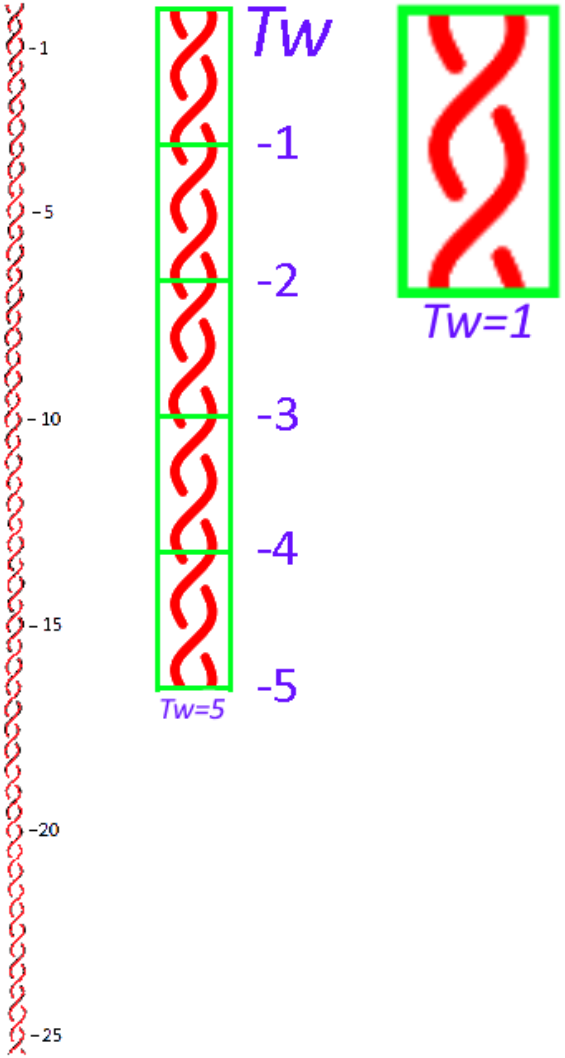
Para zasad (base pair), notacja pz lub bz

Przykład

Długość helisy DNA chromosomu X człowieka wynosi $152,6$ milionów pz, chromosonu Y 51 milionów par zasad. Długość całego ludzkiego genomu to około 3000000000 pz.

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

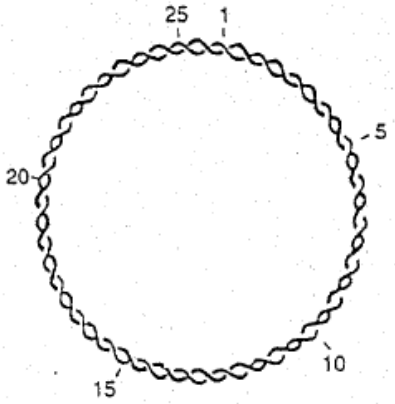
- Jak zaobserwował Jerome Vinograd w roku 1963, kolisty DNA wirusa *polio* w czasie wirowania rozdzielał się na dwa pasma. Podczas rozwiązywania tej zagadki odkrył on ważną własność kolistego DNA, jakiej nie mają cząsteczki liniowe.
- Rozważmy odcinek o długości 260 pz i konformacji helisy B - DNA.
- Ponieważ ilość par zasad przypadających na jeden skręt w cząsteczce DNA wynosi $10,4$ pz, ta liniowa cząsteczka tworzy $25 = \frac{260}{10,4}$ skrętów.



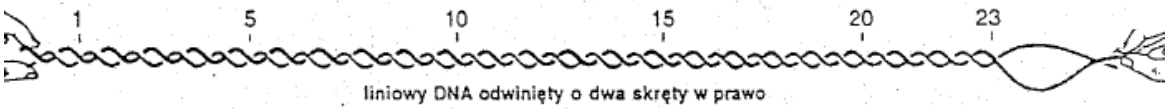
Liczba opleceń DNA jest cechą topologiczną, determinującą stopień skręcenia superhelikalnego.

Teraz połączmy końce tej helisy, tworząc *zrelaksowany* kolisty DNA.

Zupełnie inny kolisty DNA może powstać, kiedy odwiniemy liniową cząsteczkę DNA o dwa skręty przed połączeniem jej w strukturę kolistą.

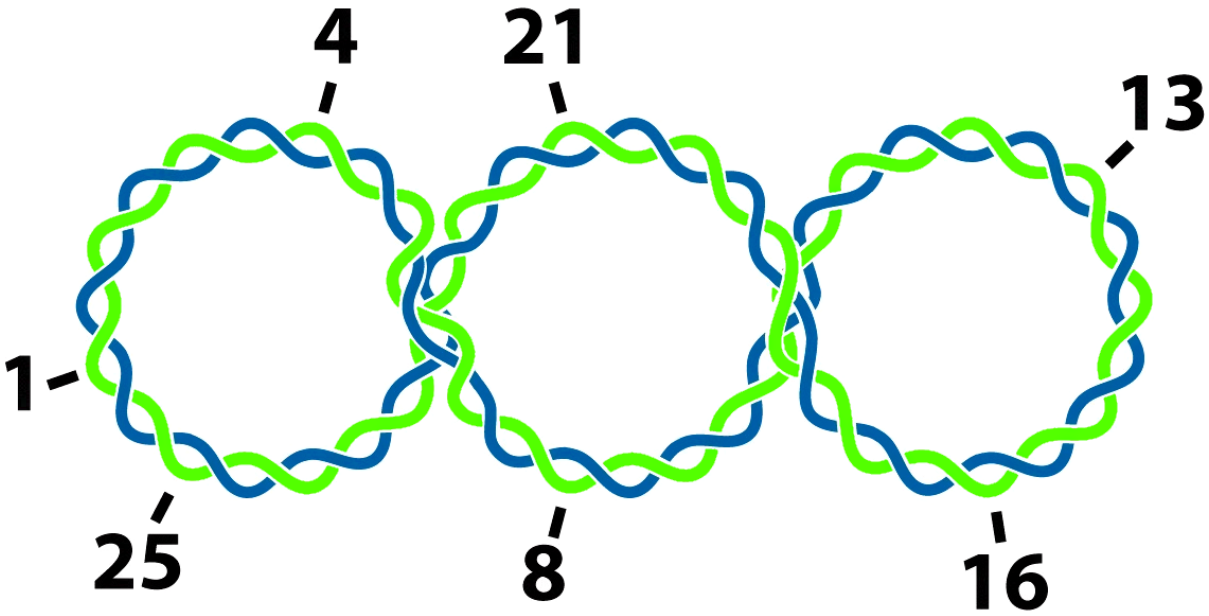


rozluźniona cząsteczka kolista



liniowy DNA odwinięty o dwa skręty w prawo

Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu



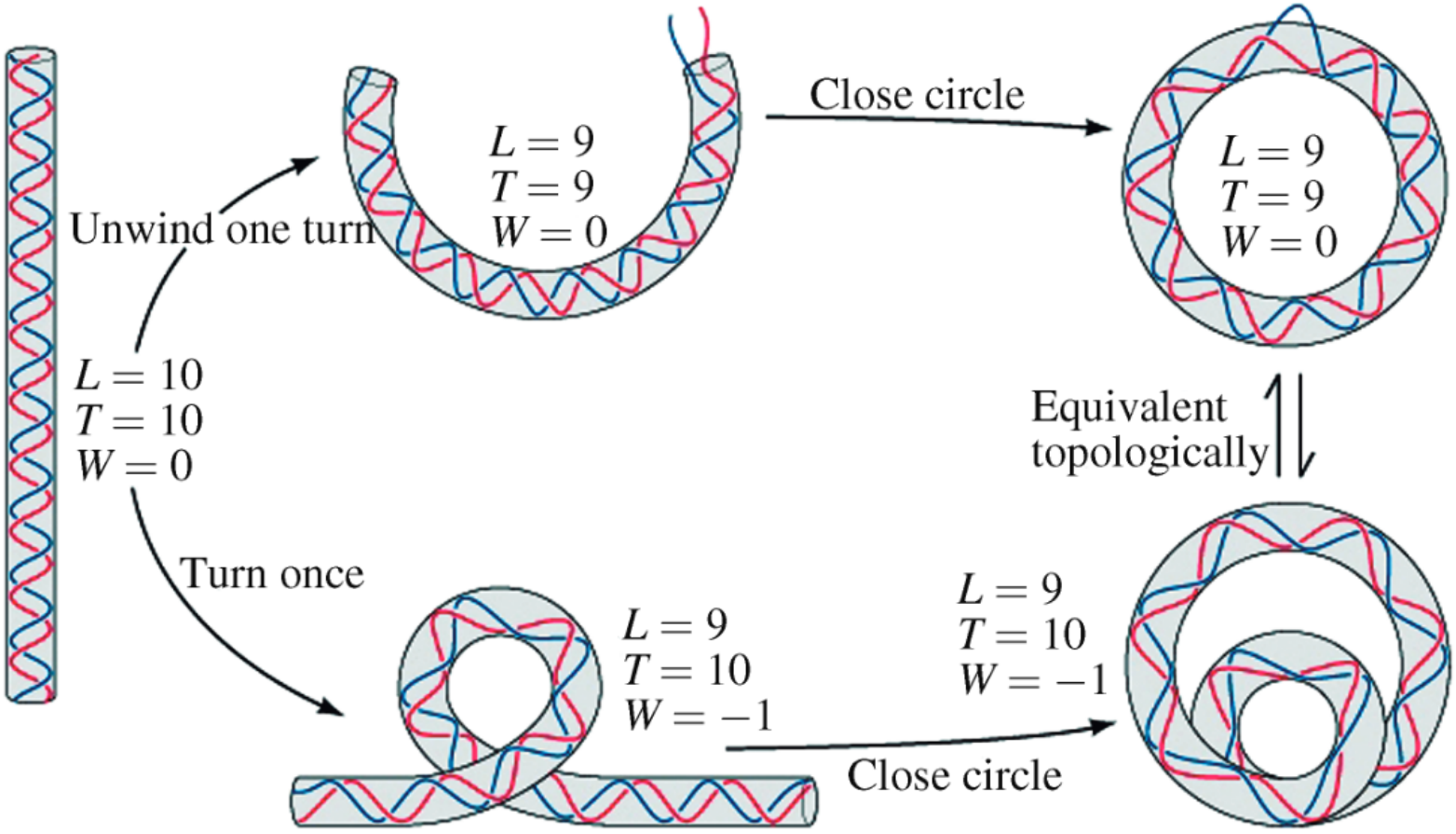
***Lk* = 23, *Tw* ~ 25, *Wr* ~ -2**

Negative superhelix

(right-handed)

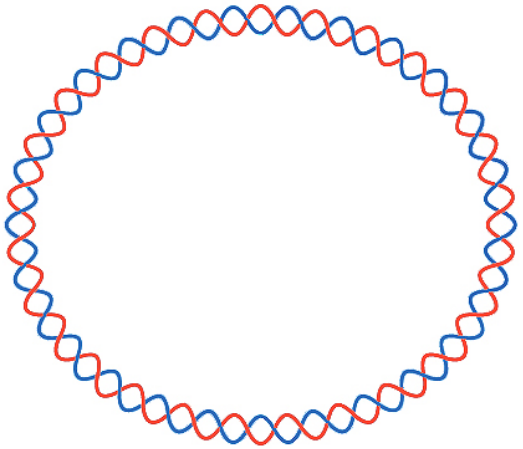
Figure 28.14e
***Biochemistry*, Seventh Edition**
© 2012 W. H. Freeman and Company

Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu

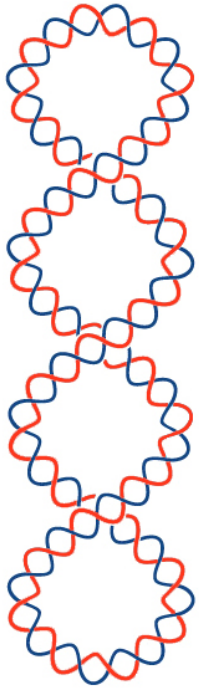


Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu



"relaxed" double-helical segment of DNA



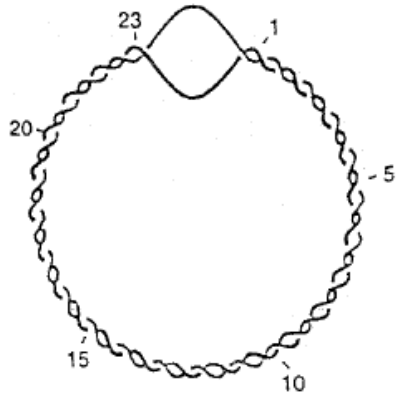
negative supercoiling

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

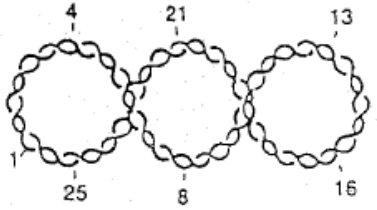
- Jakie są następstwa odwinięcia DNA przed połączeniem końców?
- Możliwe jest przybranie przez nią dwóch konformacji.:

  DNA może przybrać strukturę tworzącą 23 skręty helisy oraz odwiniętą pętle nie tworzącą dodatkowych splotów.

  DNA może takrze przybrać strukturę superchelikalną, gdzie helisa tworzy 25 skrętów oraz 2 skręty lewoskrętnej (określonej jako ujemna) struktury superhelikalnej.



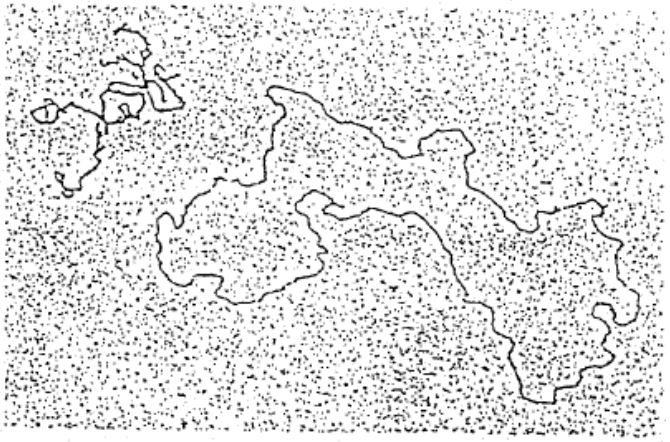
$Lk = 23$, $Tw \sim 23$, $Wr \sim 0$
odwinięta cząsteczka kolista



$Lk = 23$, $Tw \sim 25$, $Wr \sim -2$

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

- Przybranie konformacji superhelikalnej znacząco wpływa na ogólnką formę DNA.
- Cząsteczka superhelikalna DNA jest bardziej zwarta niż zrelaksowany (rozluźniony) DNA tej samej długości.
- Dlatego w czasie 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.

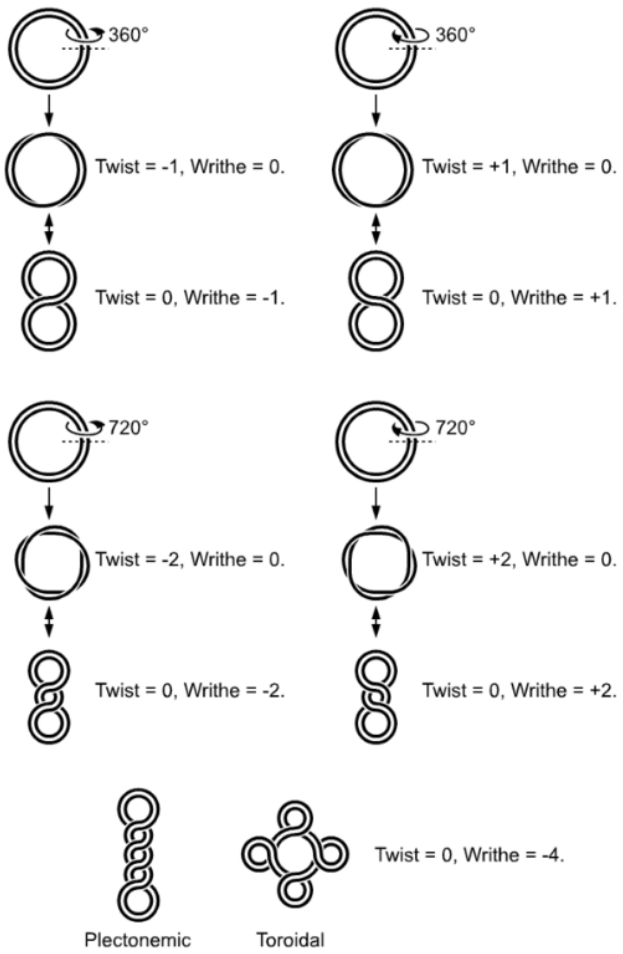


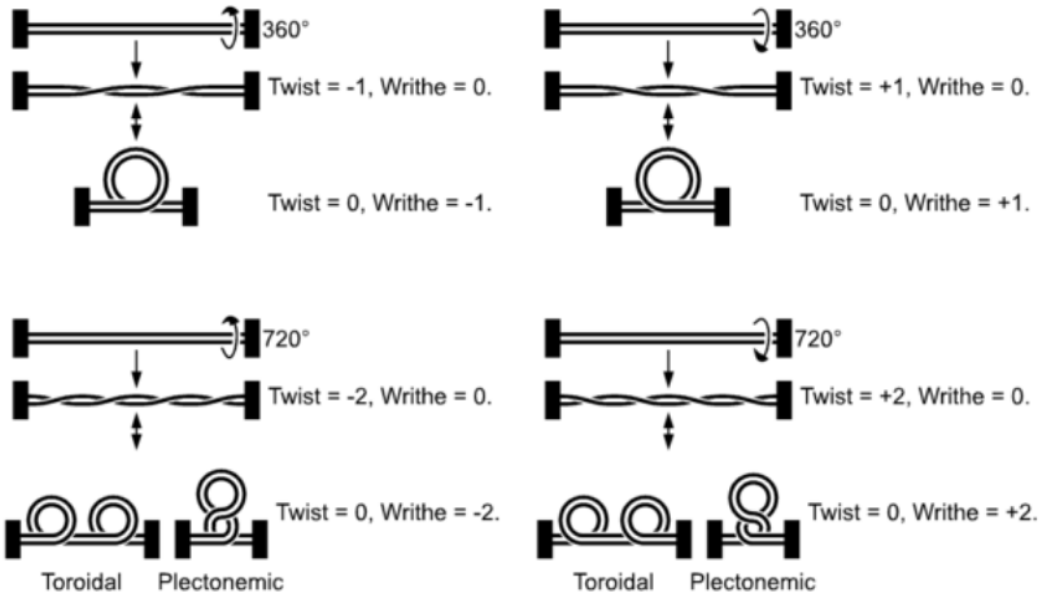
Mikrografia elektronowa rozluźnionej i ujemnie superhelikalnej formy DNA. [Dzięki uprzejmości: Dr. Jack Griffith]

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

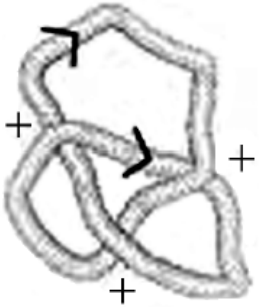
- Rozwinięty kolisty DNA ma Tw = 23 i Wr = O, natomiast superhelikalny DNA ma Tw = 25 i Wr = -2.
- Te formy mogą przechodzić jedna w drugą bez przerywania łańcucha DNA, ponieważ mają tą samą wartość Lk, mianowicie 23.
- Podział wartości Lk: (która musi być liczbą całkowitą) między wartości Tw i Wr (które nie muszą być liczbami całkowitymi) jest określony przez energetykę konformacji.
- Energia swobodna osiąga wartość minimalną wtedy, gdy 70% zmiany wyrażone jest przez Wr, a 30% - przez Tw.
- Tak wiec najbardziej stabilna forma będzie mieć wartości Tw = 24,4 oraz Wr = 1.4.
- A więc zmniejszenie Lk powoduje (ujemne) superhelikalne skręcenie osi DNA.

Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu



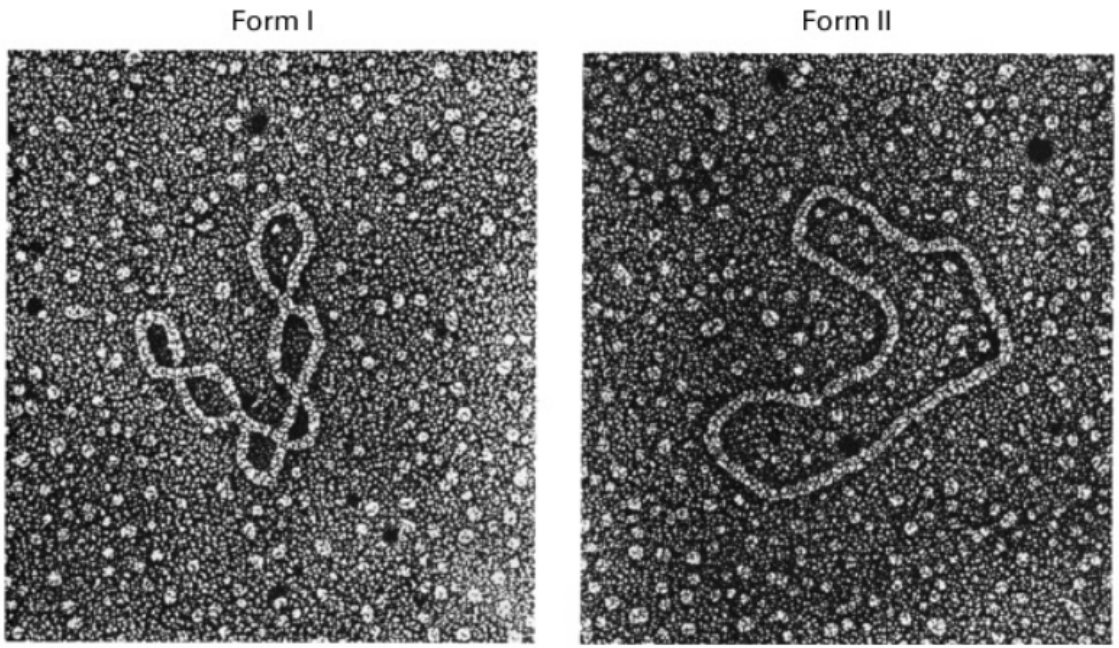


Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu



Electron microscope image of knotted DNA.

Rysunki, zdjęcia, obrazki z internetu



Topoizomeraza

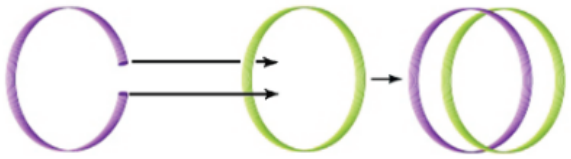
W latach 70-tych odkryto proces, który prowadzi od przerwania do rekombinacji DNA.
Był to rezultat działania pojedynczego enzymu, katalizatora nazwanego *topoizorerazą*.

Topoizomeraza

Wytłumaczenie pojęcia topoizomerazy.

Chemicznie, dwie cząsteczki o tym samym składzie chemicznym, ale różnej strukturze są nazwane *izomerami*. Zatem diwe cząsteczki DNA, o tym samym kodzie par bazowych, ale różniące się indeksem zaczepienia, są także izomerami.
Są one topologicznie nie równoważne. Nazywamy je topoizomerami.
Natomiast enzym, który zmienia indeks zaczepienia *topoizomerazą*.

Topoizomeraza



Działanie topoizomerazy.

Proces zmiany, który dokonuje topoizomeraza, można w uproszczeniu opisać następująco.
Najpierw nic DNa jest przecinana w jednym miejscu, następnie segment DNA, przechodzi przez to przecięcie, by ostatecznie DNA łączy się ponownie.

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved

Action of Topoisomerase I.

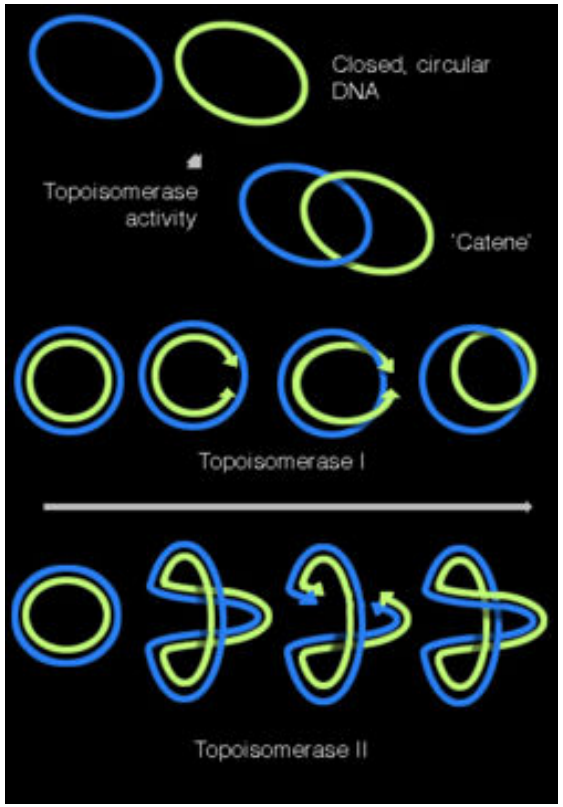
Topoizomeraza

Topoizomeraza II

Topoizomeraza przecina jedną nic DNA.

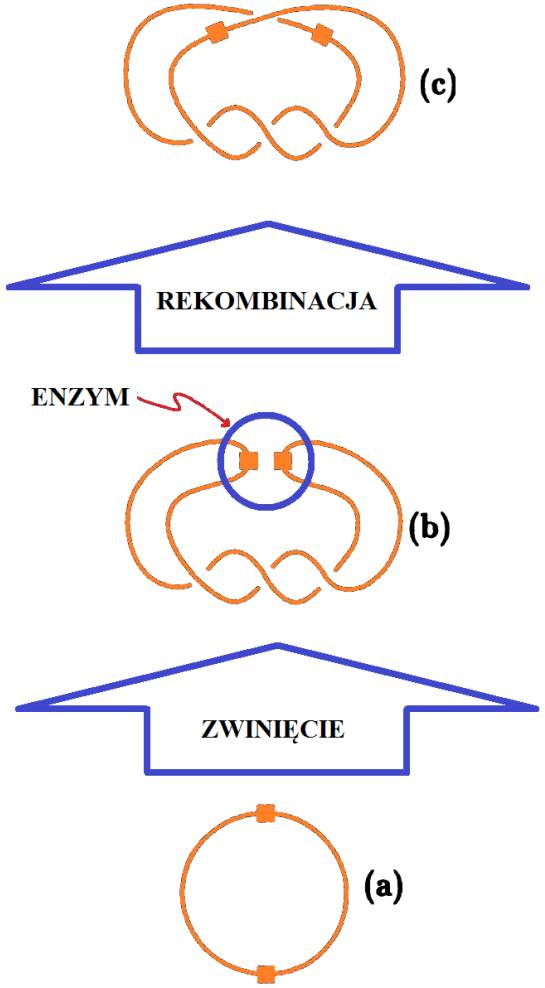
Topoizomeraza I

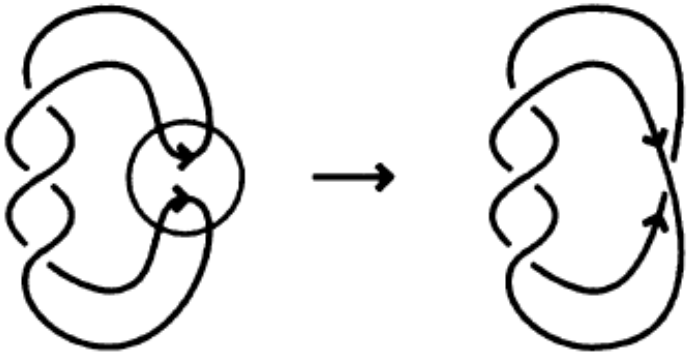
Topoizomeraza przecina obie nici DNA.



Rekombinacja konkretnego miejsca (lokalna)(site-specific recombination.)

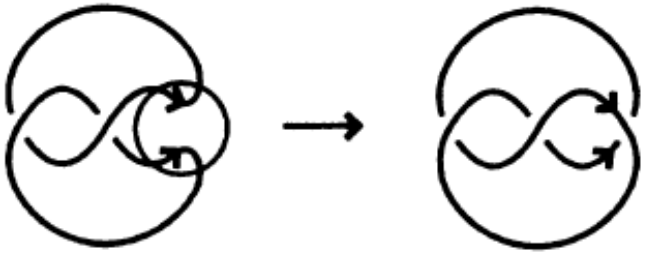
Jest to lokalna operacja, efektem jest albo przesunięcie kawałka DNA do innego położenia w sobie, lub importowania obcego fragmentu cząsteczki DNA. Zatem w rezultacie gen mutuje.



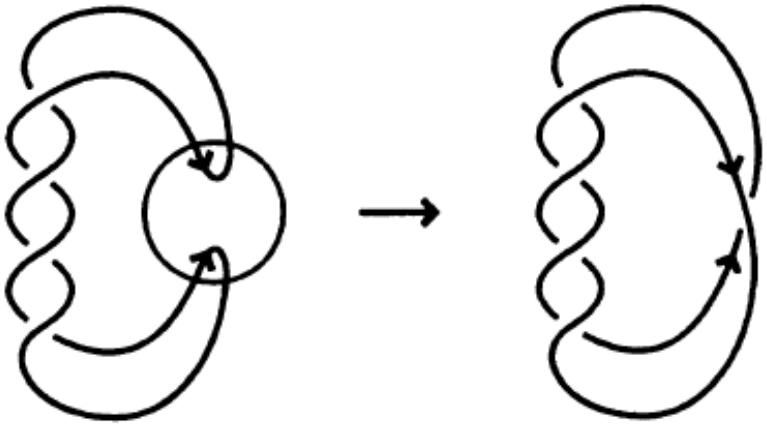


direct repeat
(bezpośrednie powtórzenie)

(a)



(b)



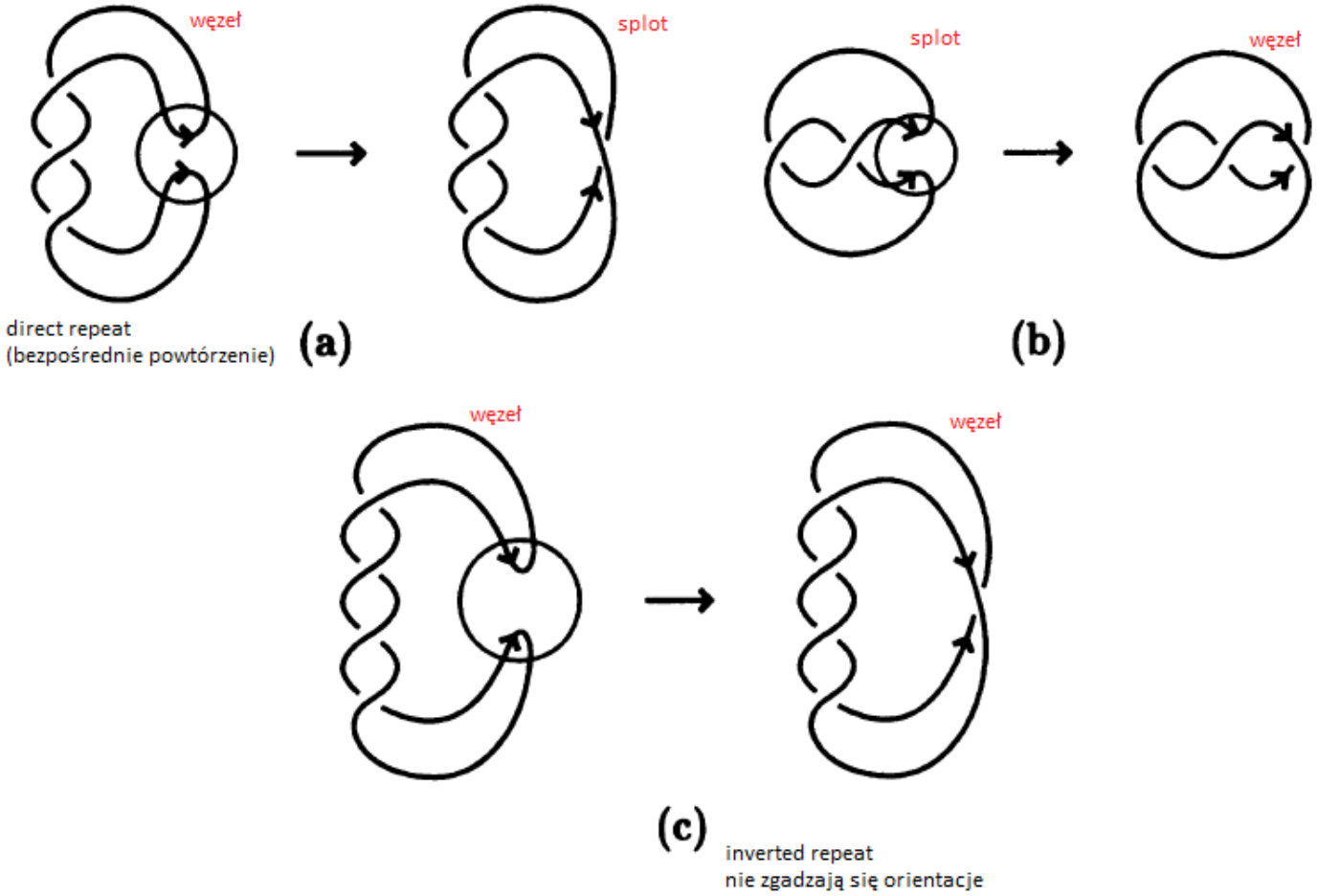
(c)

inverted repeat
nie zgadzają się orientacje

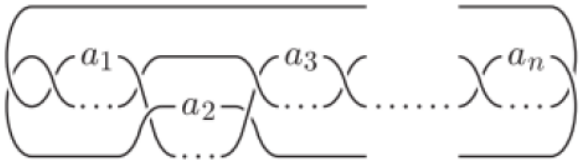
Jeśli substratem jest węzeł DNA, oraz układ jest direct repeat, wtedy produkt to dwu składowy splot DNA.

Jeśli substratem jest węzeł DNA, oraz układ jest inverted repeat, wtedy produkt to węzeł DNA.

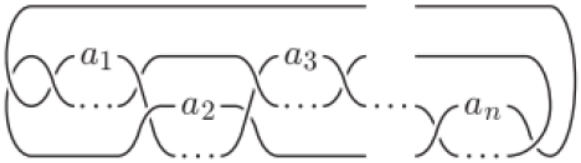
Jeśli substratem jest splot DNA, to po rekombinacji produkt to węzeł DNA.


węzeł
splot
splot
węzeł
direct repeat
(bezpośrednie powtórzenie)
(a)
(b)
węzeł
węzeł
(c)
inverted repeat
nie zgadzają się orientacje

Węzły i sploty otrzymane z supłów wymiernych należą do specjalnej rodziny splotów nazywanych splotami z dwoma mostami. Dokładniej węzeł (splot) z dwoma mostami jest to taki węzeł, którego diagram można przedstawić w postaci jak na rysunku poniżej.



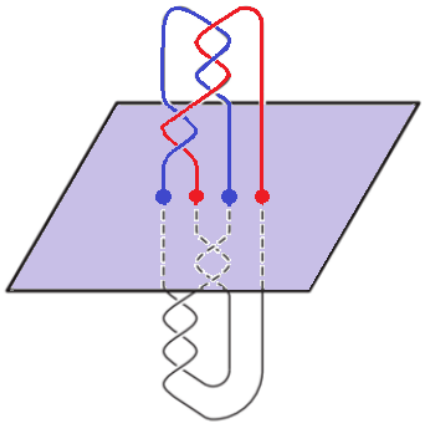
dla n parzystego



dla n nieparzystego

Liczby całkowite $a_1, \ldots, a_n$ oznaczają odpowiednie liczby skręceń na diagramie.

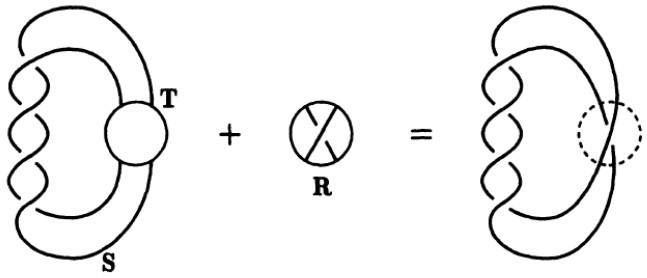
Jeśli diagram splotu z dwoma mostami przetniemy płaszczyzną prostopadłą do płaszczyzny diagramu, to przetnie ona ten diagram w czterech punktach, nad i pod płaszczyzną będą dwie linie splotu, jakby dwa mosty.



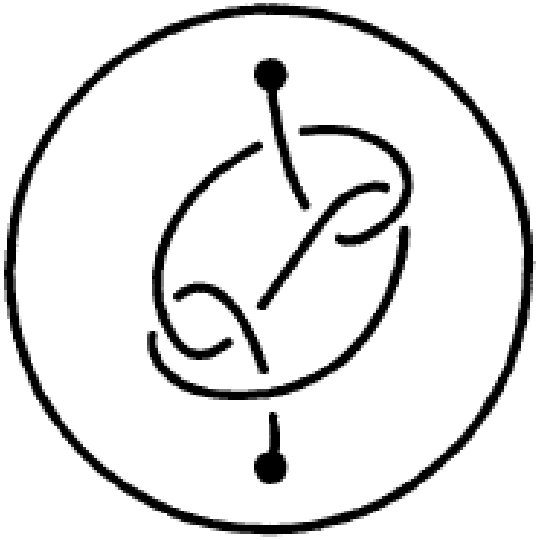
Model lokalnej rekombinacji

Następujące stwierdzenie wynika z obserwacji.

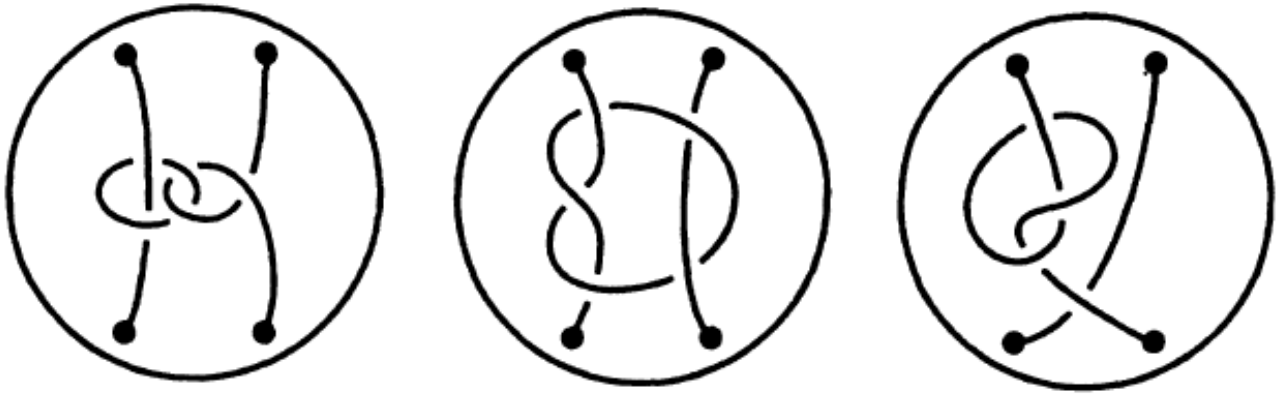
- 1. Prawie wszystkie produkty lokalnej rekombinacji o trywialnym węźle jako substracie, to węzły wymierne lub sploty wymierne, tzn. węzły lub sploty dwumostowe.
- 2. Część DNA na którą działał enzym, matematycznie w kuli trójwymiarowej, to (2,2)-supeł.



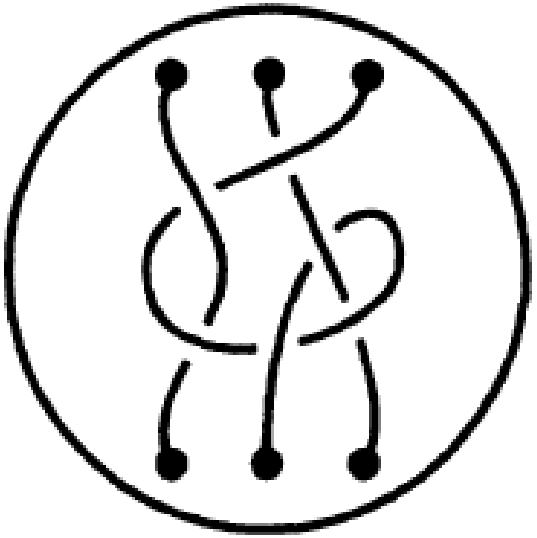
(1,1)-supeł



(2,2)-supły

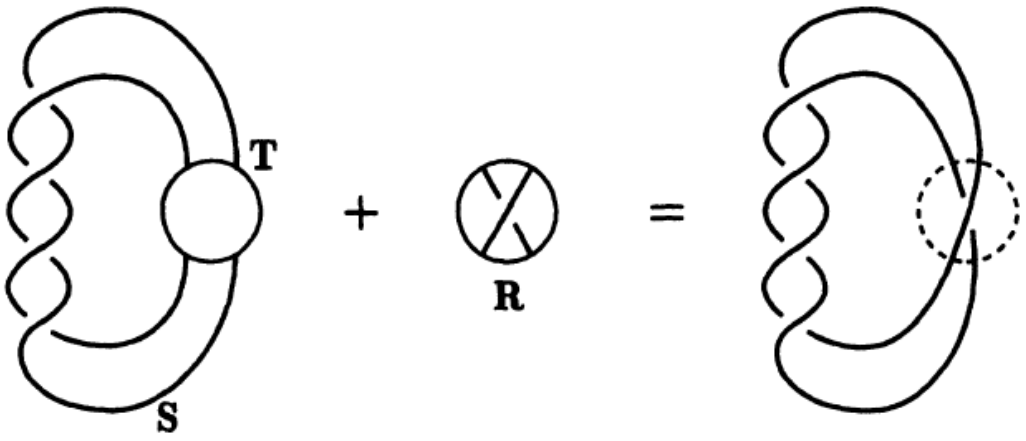


(3,3)-supeł



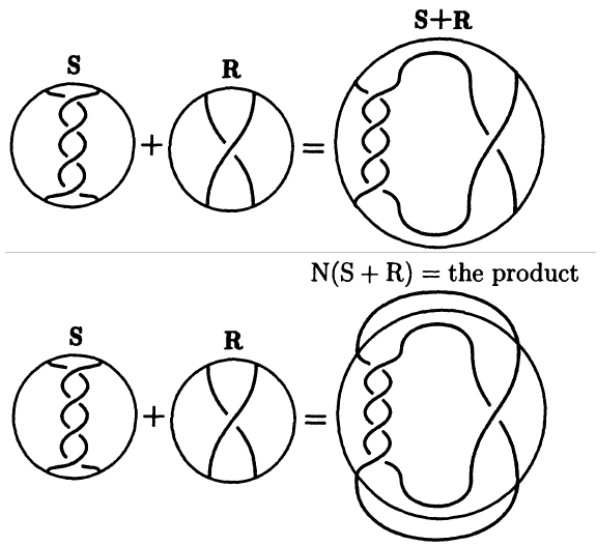
zamiana lokalna

Na rysunku produkt powstaje ze substratu poprzez zastąpienie (2,2)-supła T innym (2,2)-supłem. Dobrą rzeczą w matematyce, jest to, że wewnątrz może byc na zewnątrz, a na zewnątrz wewnatrz. Matematycznie jest zasadne stwierdzić, że to (2,2)-supeł S jest wewnątrz T.



Numerator sumy supłów, produkt

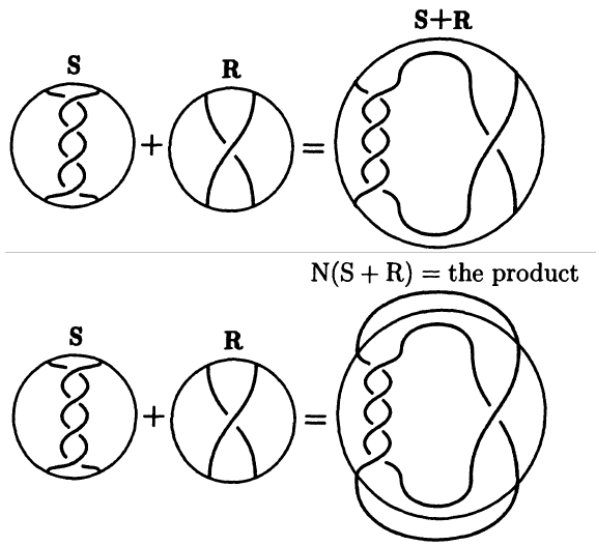
Można na sytuacje popatrzeć, jako na sumę supłów, do której została zastosowana operacja numeratora.



Równanie supsowe

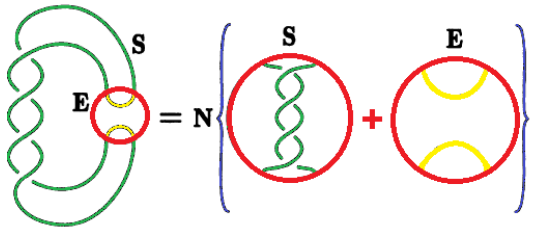
Otrzymaliśmy zatem równanie supłowe.

$$N(S + R) = \text{produkt}.$$



Rozłożenie substratu

Ponadto, możemy rozdzielić substrat na zewnętrzny supeł S i wewnętrzny supeł E. Wtedy substrat to numerator sumy S oraz E.



Jeśli jest możliwe aby obserwować produkt i substrat, wtedy w idealnej sytuacji można by było wyznaczyć S, E, R z równań

$$N(S + E) = substrat,$$

$$N(S + R) = produkt.$$

Mamy zatem dwa równania i trzy niewiadome, potrzebujemy dodatkowych empirycznych danych.

Stwierdzenie dane z obserwacji

Efekt działania enzymu - zmiana supła E na supeł R - zależy tylko od orginalnego enzymu, zatem proces zmiany jest niezależny od kształtu, pozycji, i rozmiaru substratu DNA.

Oznacza to, że dla każdej lokalnej rekombinacji otrzymamy równanie jak wyżej. Ze stwierdzenia wynika, że żadne nowe zmienne nie są wprowadzane, a niewiadomą jest zawsze R w produkcie. Zatem możemy tworzyć kolejne równania (przez działanie enzymu), a liczba niewiadomych pozostaje stała. Rozwiązując układ równań znajdujemy S, E, R.

Stwierdzenie

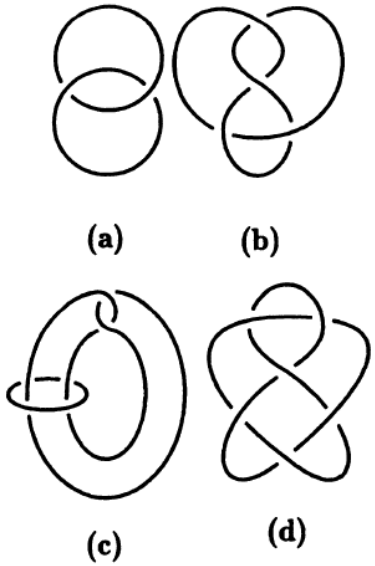
Efekt zastosowania serii lokalnych rekombinacji może być opisany jako numerator sumy supłów, czyli w postaci

$$N(S + R + R + \ldots + R).$$

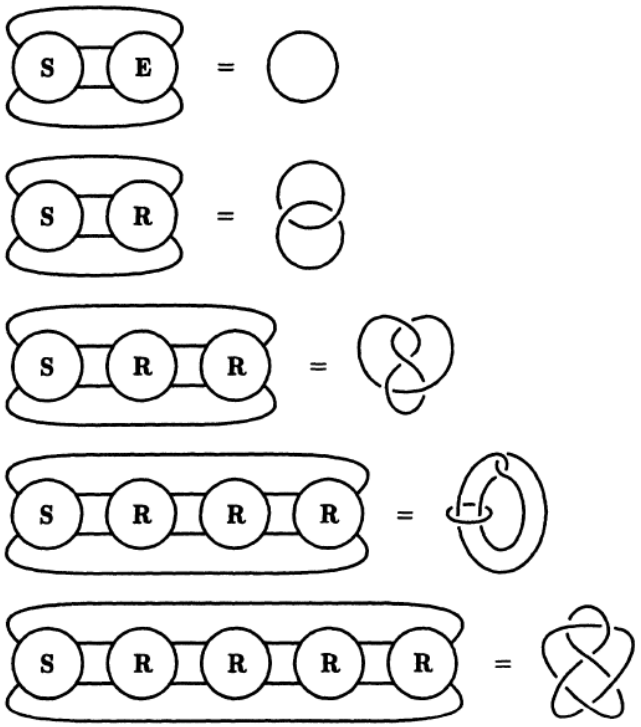
Tn3 resolwaza jest enzymem, który jest katalizatorem lokalnej rekombinacji na zamkniętym substracie DNA z directly repeated miejscami rekombinacji.

Kiedy resolwaza działa na zamkniętym DNA, które jest zwinięte (supercoiled) i nie zawęźlone (węzeł trywialny), wtedy produkt jest splotem.
W większości przypadków jest to splot Hopfa.
Jeśli dochodzi do kolejnej lokalnej rekombinacji wtedy następnym produktem jest węzeł ósemkowy.
Kontynując lokalną rekombinacje otrzymujemy splot Whiteheada.
Wyniki eksperymentu z resolwazą Tn3 pokrywają się z powyższym opisem.
Zaobserwowano, że produkt czterokrotnej lokalnej rekombinacji daje węzeł z rysunku (d).

Aby znaleźć S, E, R te cztery rekombinacje nie są wymagane, i służą jedynie do sprawdzenia.

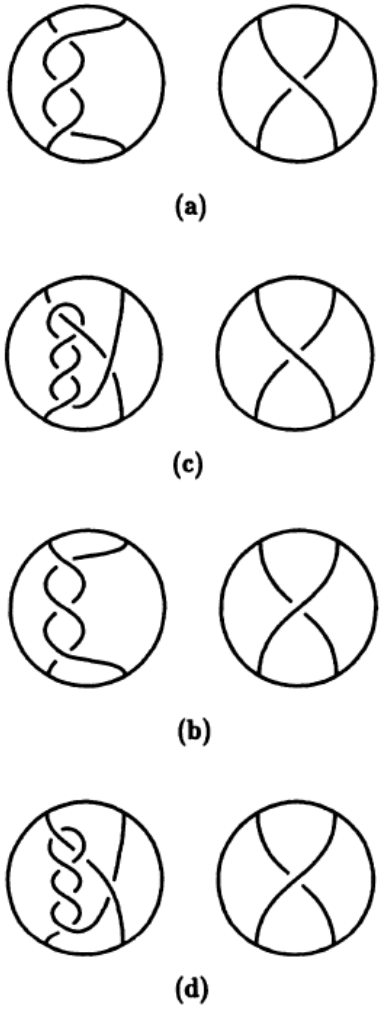


Biologia molekularna, wyjaśnić pojęcia.



Twierdzenie

Możliwości dla supłów S oraz R, które spełniają równania (1),(2),(3), są ograniczone do czterech par supłów z rysunku obok.
Jeśli spełnione jest także równanie (4), to jedyna możliwość na supły S i T znajduje się na rysunku obok podpunkt (a).



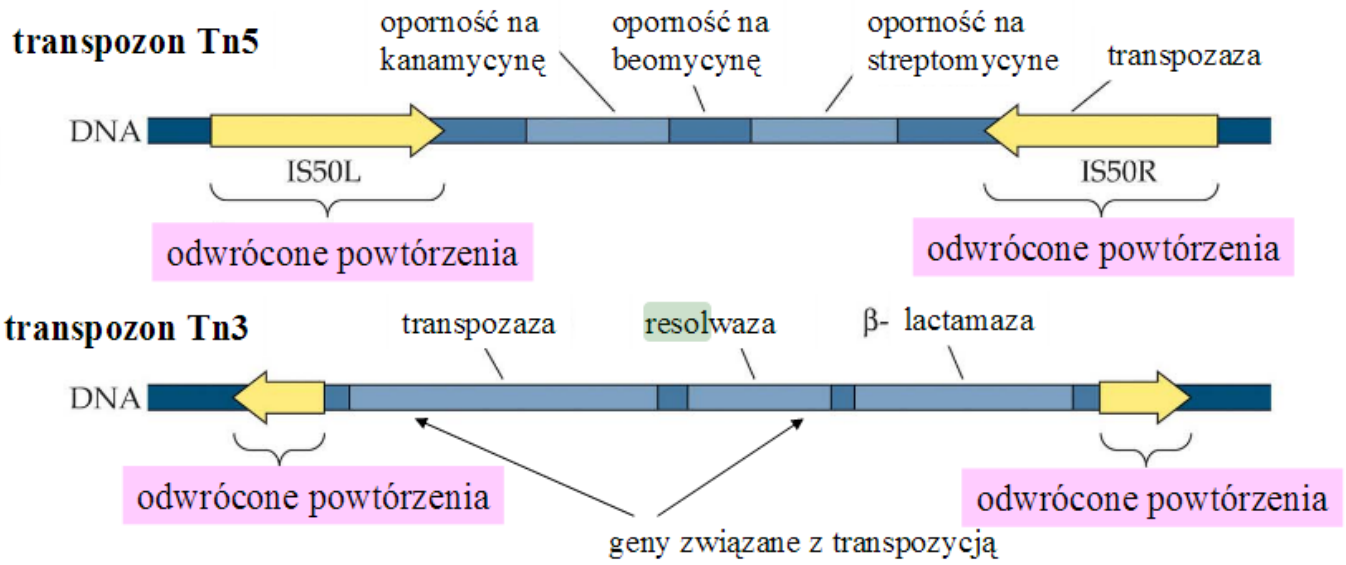
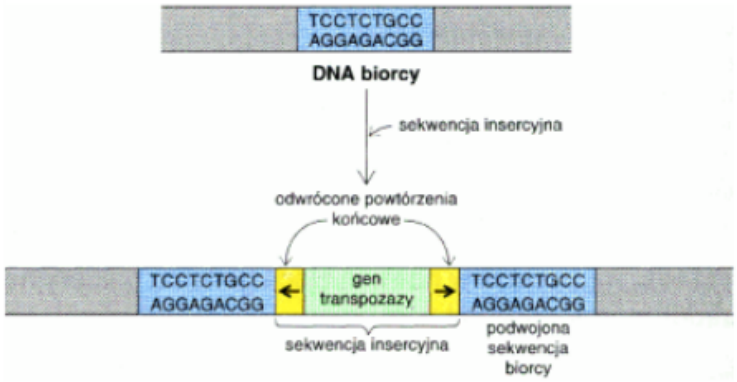
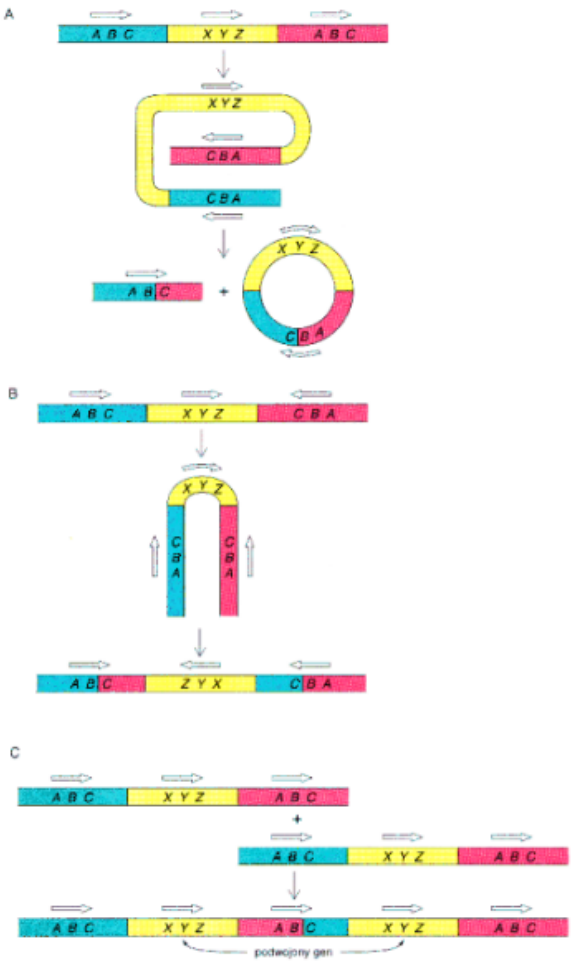
Ruchome elementy genetyczne i transpozony

przemieszczanie odcinków DNA pomiędzy komórkami – plazmidy, wirusy

przemieszczanie w obrębie tego samego chromosomu - transpozycja

sekwencje insercyjne IS = 700-5000bp zawierają odwrócone sekwencje flankowe oraz kody dla transpozazy (specyficzna mediacja rekombinacji)

złożone transpozony



Biologia molekularna, wyjaśnić pojęcia.