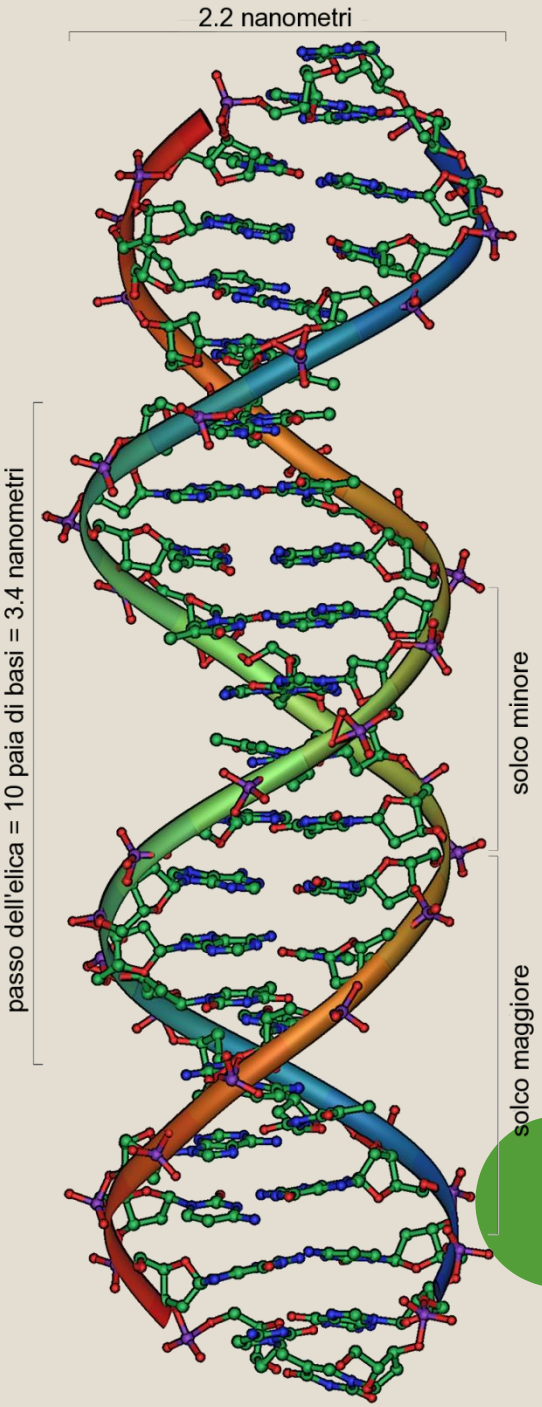
ZASTOSOWANIA TEORII WĘZŁÓW W BIOLOGII MOLEKULARNEJ

Anna Spytek

10B2

DNA

- Budowa DNA została odkryta przez Jamesa Watsona i Francisa Cricka w 1953 roku
- Jest nośnikiem informacji genetycznej u wszystkich żywych organizmów
- Jednostką budującą DNA jest nukleotyd (cząsteczka złożona z cukru - deoksyrybozy, zasady azotowej i reszty kwasu fosforowego)



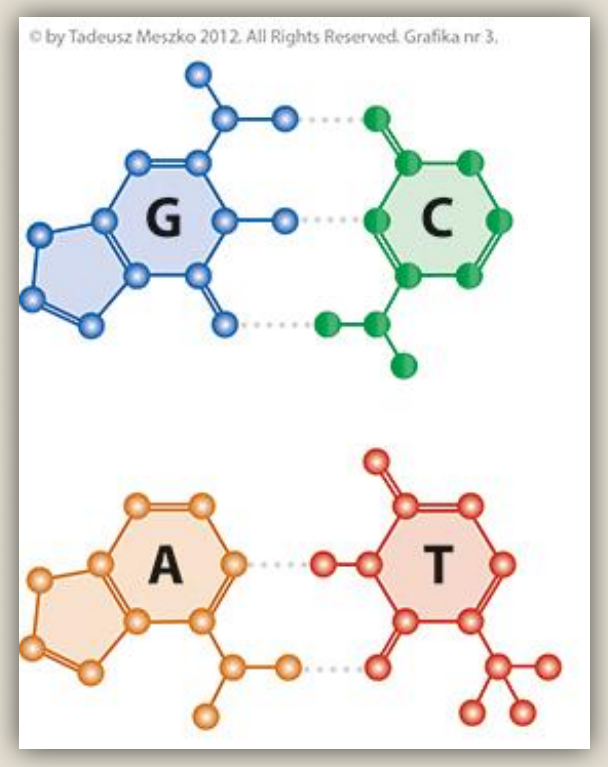
Deoksyryboza

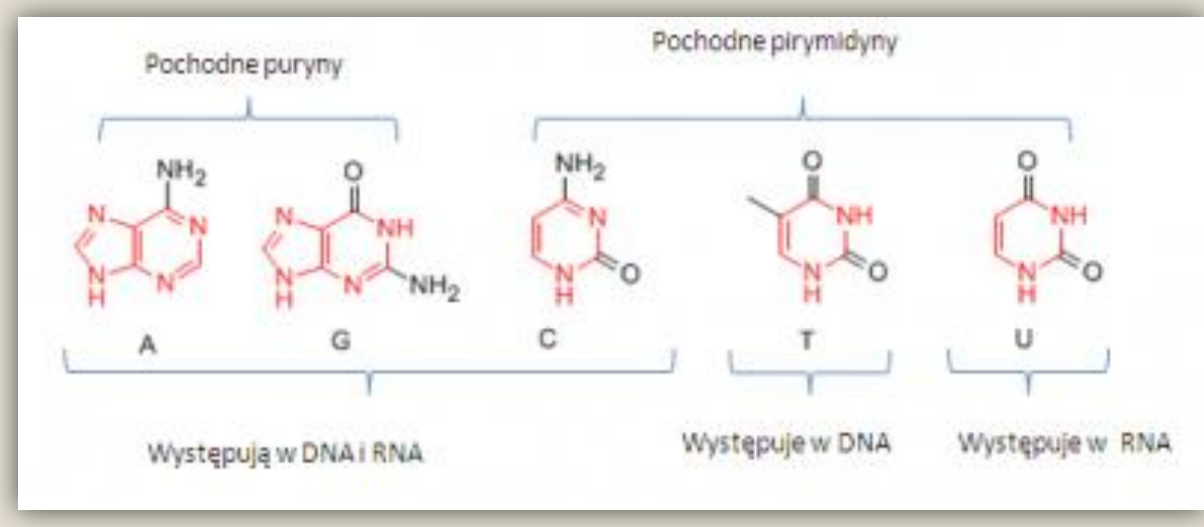
Deoksyryboza, dezoksyryboza, $C_5H_{10}O_4$, monosacharyd (pentoza), różniący się od rybozy brakiem jednego atomu tlenu. Ma postać białych kryształów o temperaturze topnienia 87°C, rozpuszczalnych w wodzie. Jest składnikiem kwasów deoksyrybonukleinowych (kwasy nukleinowe).

Zasady azotowe

Dwie dwupierścieniowe zasady, które nazwano purynami, są strukturami większymi. To adenina i guanina. Dwie mniejsze, jednopierścieniowe zasady nazwano pirymidynami. Są to cytozyna i tymina. Dla uproszczenia nukleotydom tym przypisano pierwsze litery ich nazwy zasadowej. I tak kod DNA zyskał znaną nam postać alfabetu:

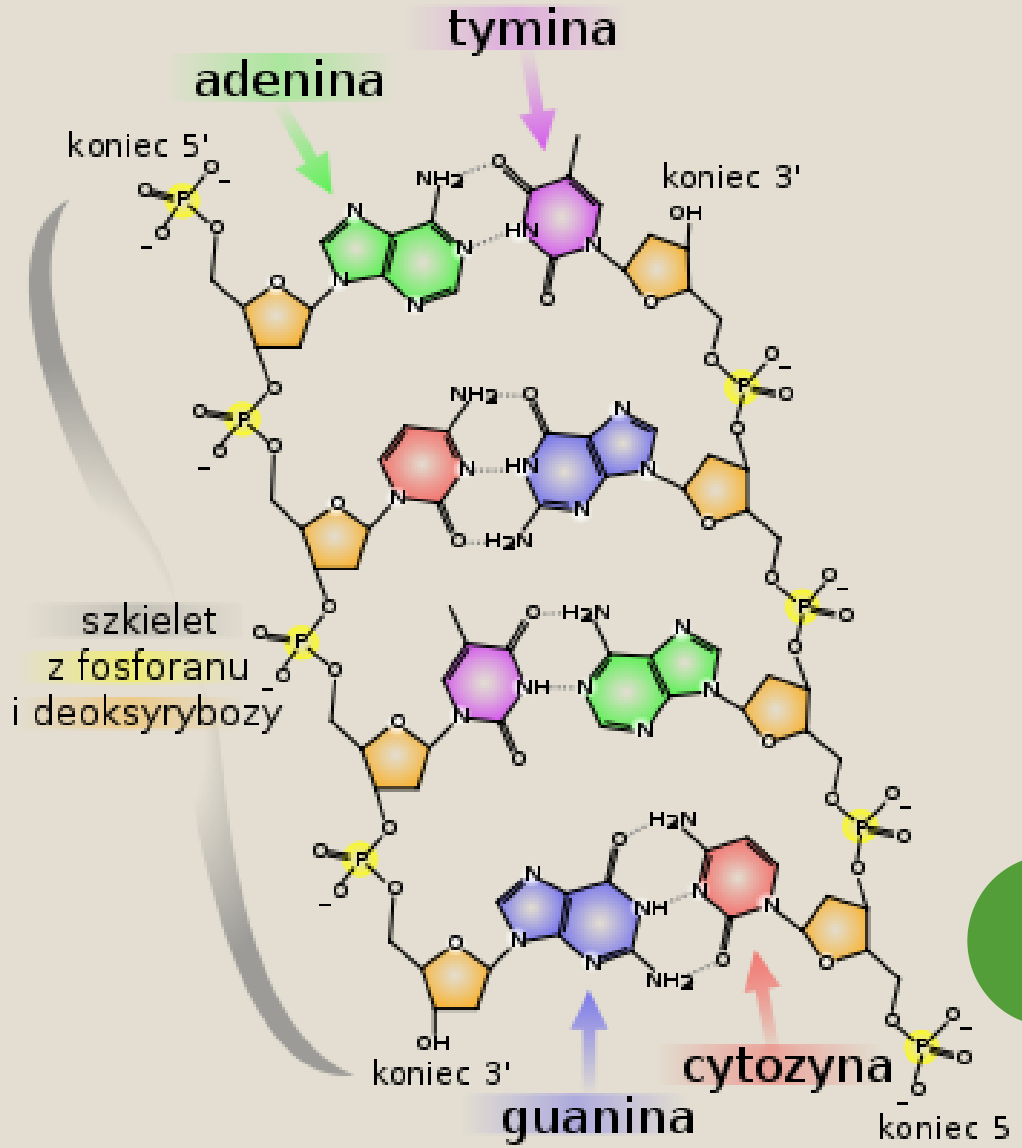
A – od puryny adeniny
G – od puryny guaniny
C – od pirymidyny cytozyny
T – od pirymidyny tyminy



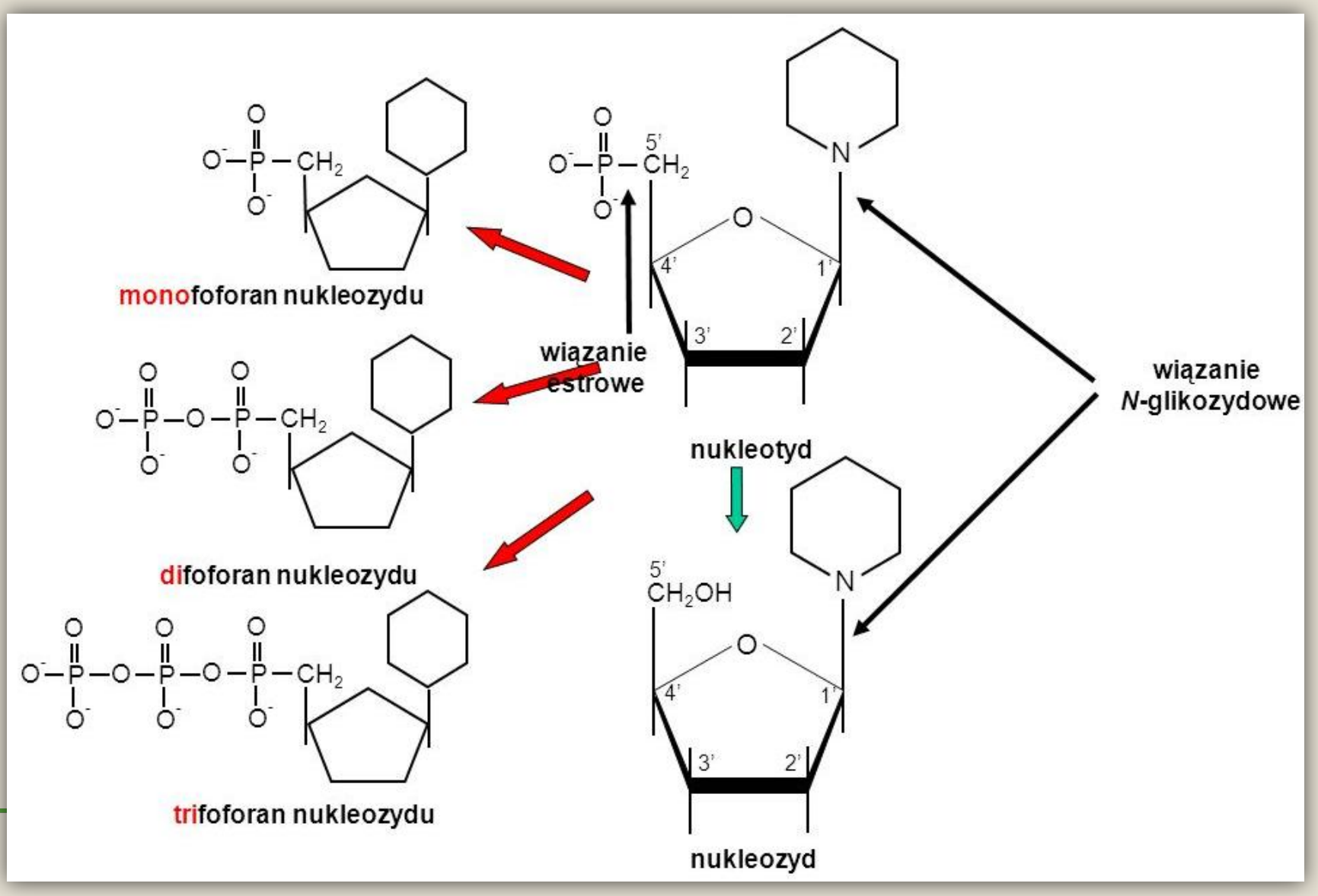


Reguła parowania zasad

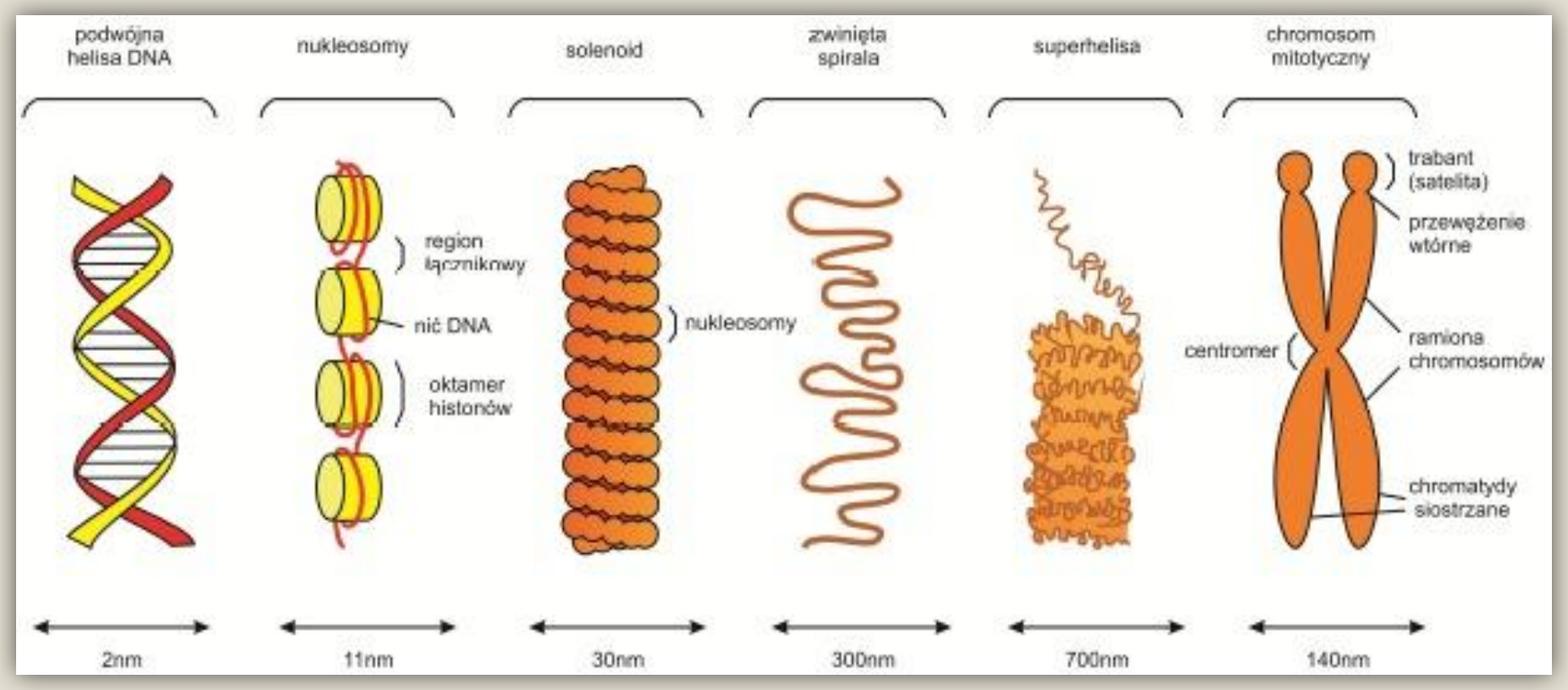
Zasady azotowe łączą się wiązaniami wodorowymi według reguły parowania zasad: adenina łączy się z tyminą (dwoma wiązaniami wodorowymi), a cytozyna z guaniną (trzema wiązaniami wodorowymi).



Reszta kwasu fosforowego

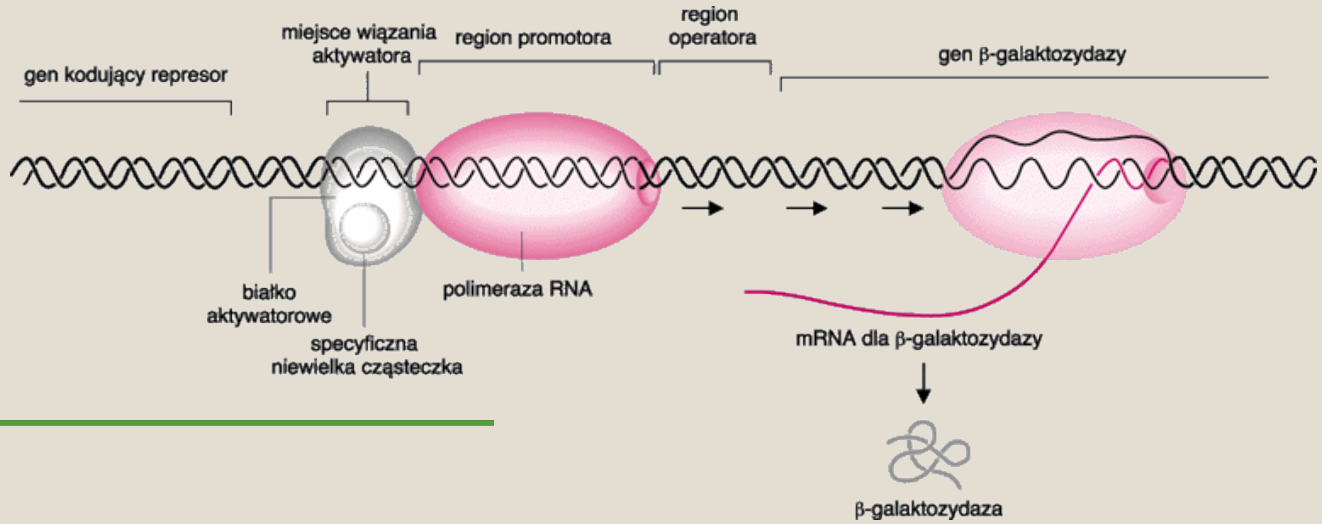


Upakowanie DNA



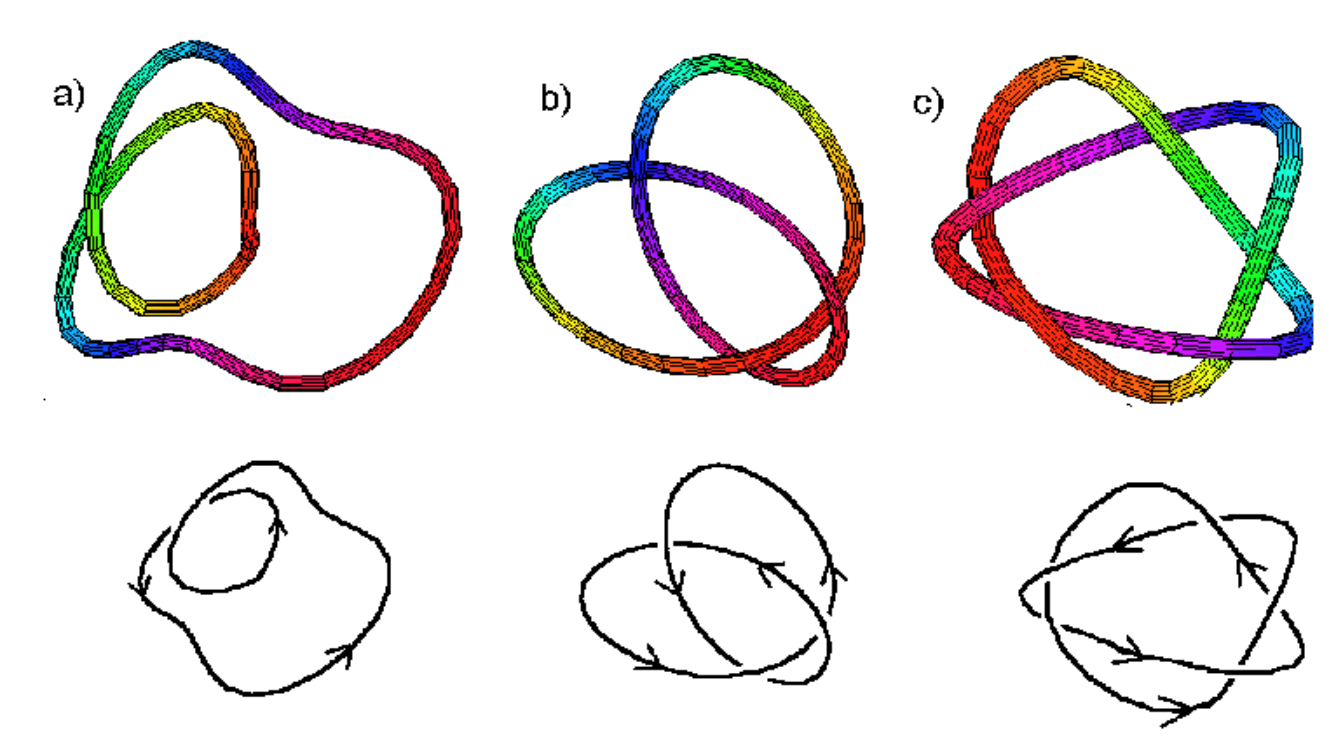
DNA a węzły

- Upakowanie DNA może być wizualizowane w postaci długich pasm, które zostały wielokrotnie zaplecione i związane tworząc węzeł, który również poddano zwijaniu.
- Jednakże proces replikacji czy transkrypcji zachodzi łatwiej jeśli DNA nie jest splątane. I tutaj ważną funkcję pełnią enzymy zdolne do rozplątania DNA.

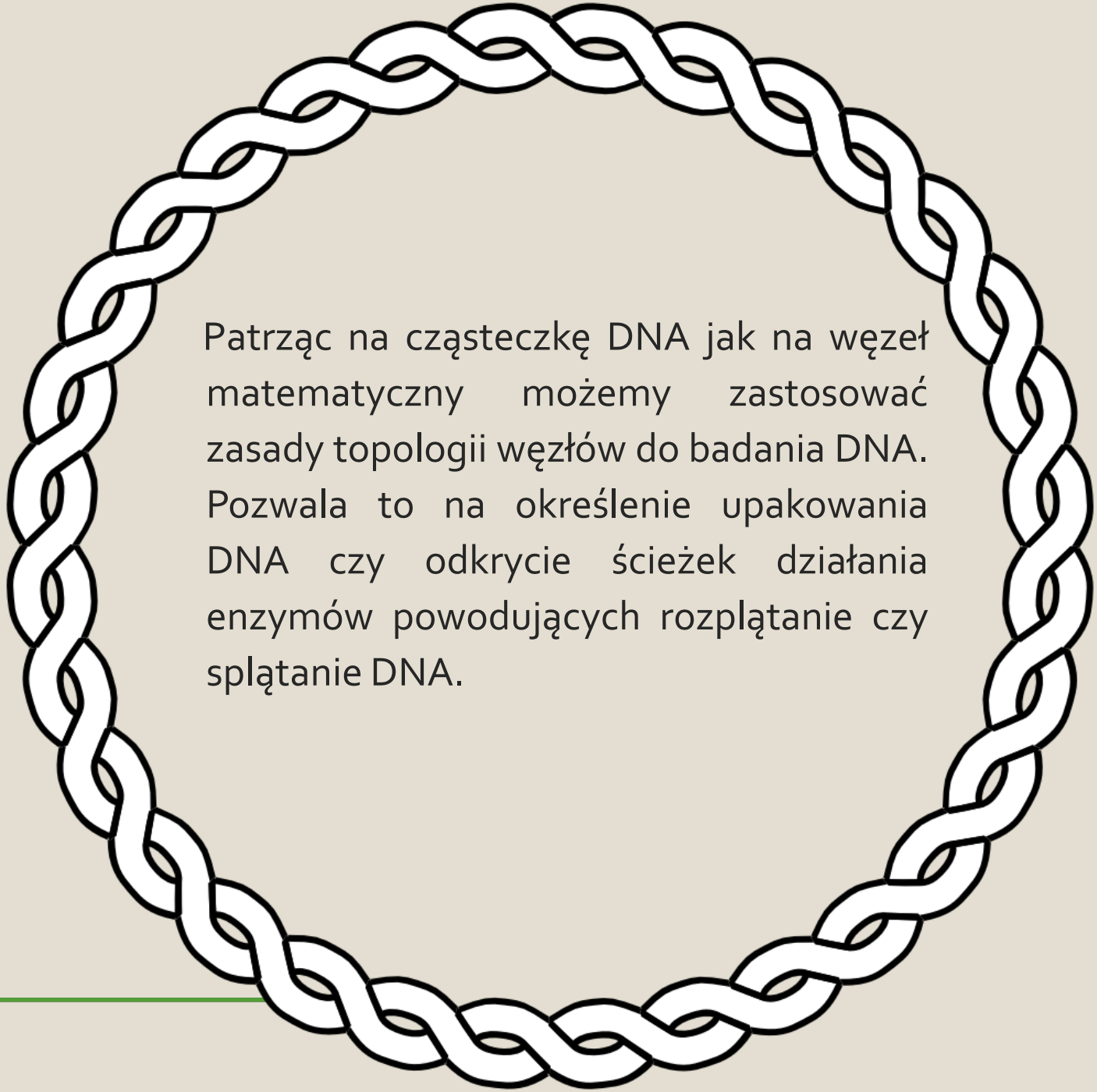


DNA a węzeł

- Myśląc o DNA jako o matematycznym węźle, możliwe jest użycie teorii węzłów, aby zrozumieć jak trudnym procesem jest rozplątanie węzła oraz określenie właściwości enzymów zdolnych do rozplątania węzła czyli splątanej cząsteczki DNA.
- Matematyczny węzeł jest zamkniętą pętlą:



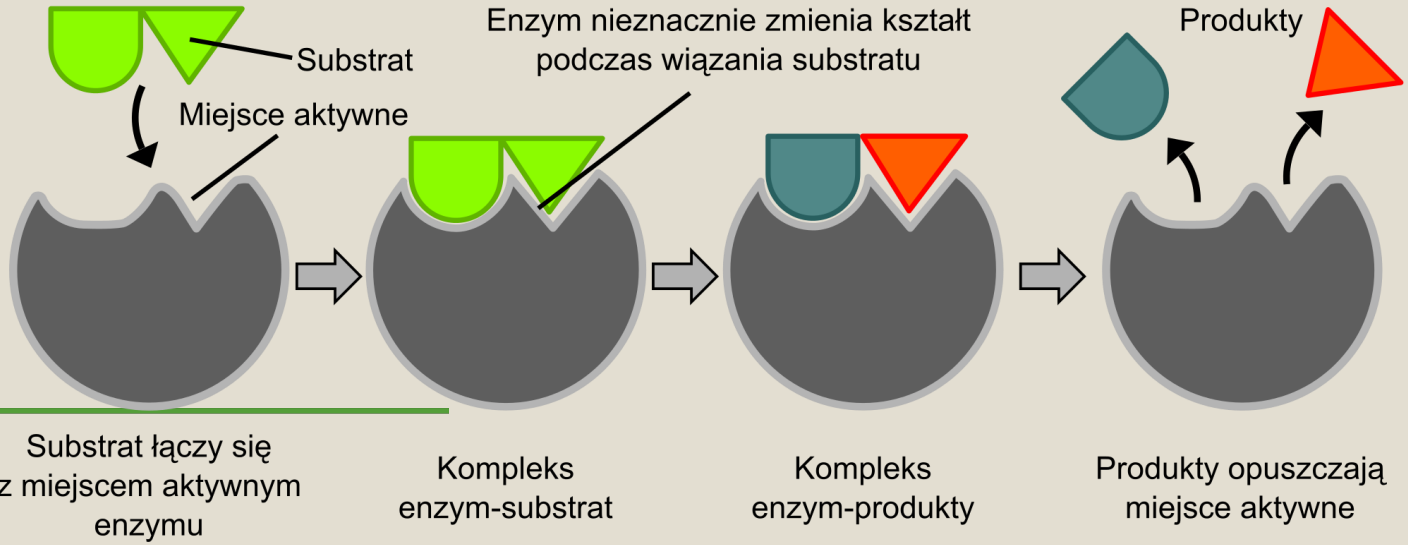
Jedynym sposobem rozplątania matematycznego węzła jest jego przecięcie i zamiana nitek, ta która leżała ponad idzie pod spód i na odwrót. Tak właśnie działają enzymy.



Patrząc na cząsteczkę DNA jak na węzeł matematyczny możemy zastosować zasady topologii węzłów do badania DNA. Pozwala to na określenie upakowania DNA czy odkrycie ścieżek działania enzymów powodujących rozplątanie czy splątanie DNA.

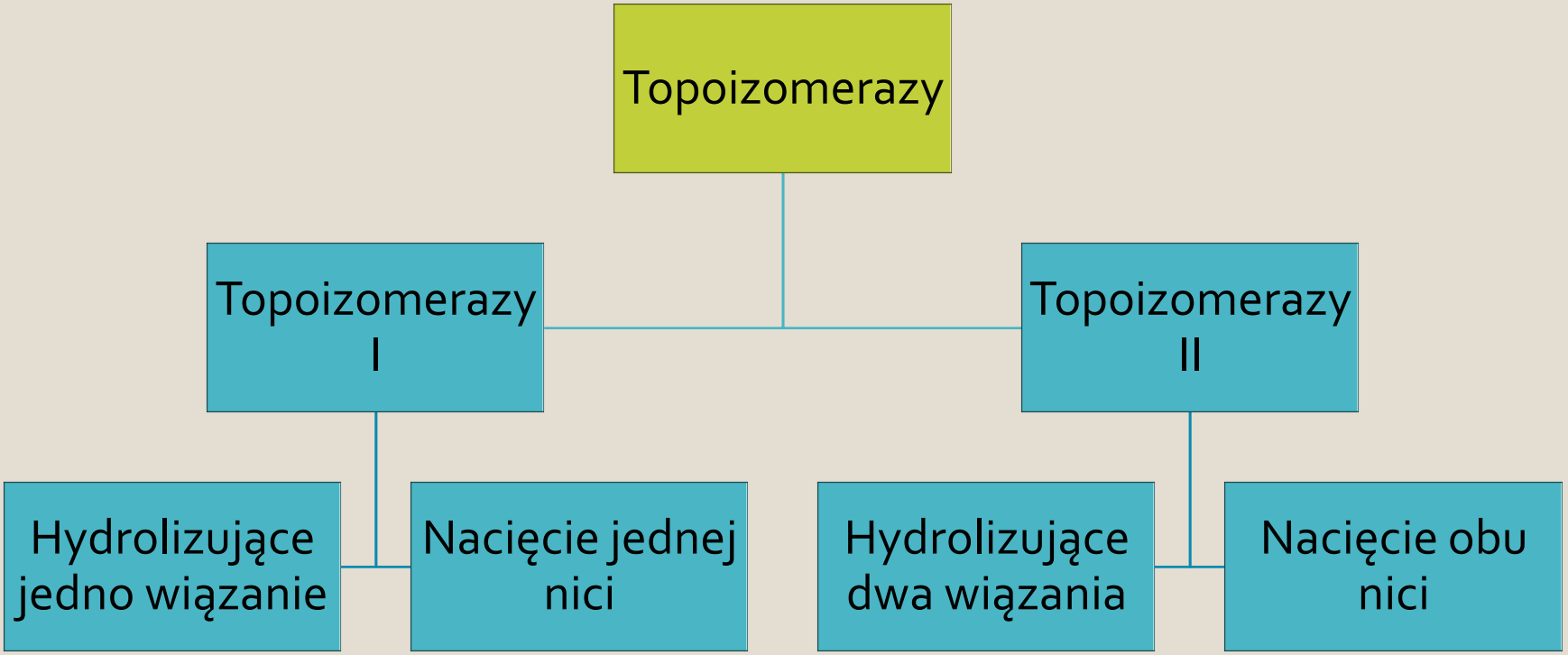
Enzymy

- To biokatalizatory umożliwiające lub ułatwiające zachodzenie reakcji chemicznych w organizmie. Występują w każdej komórce ale mogą działać również poza nią.
- Enzymy są białkami prostymi lub złożonymi (z części białkowej oraz kofaktora). W części białkowej enzymu znajduje się centrum aktywne – miejsce do którego przyłącza się substrat.



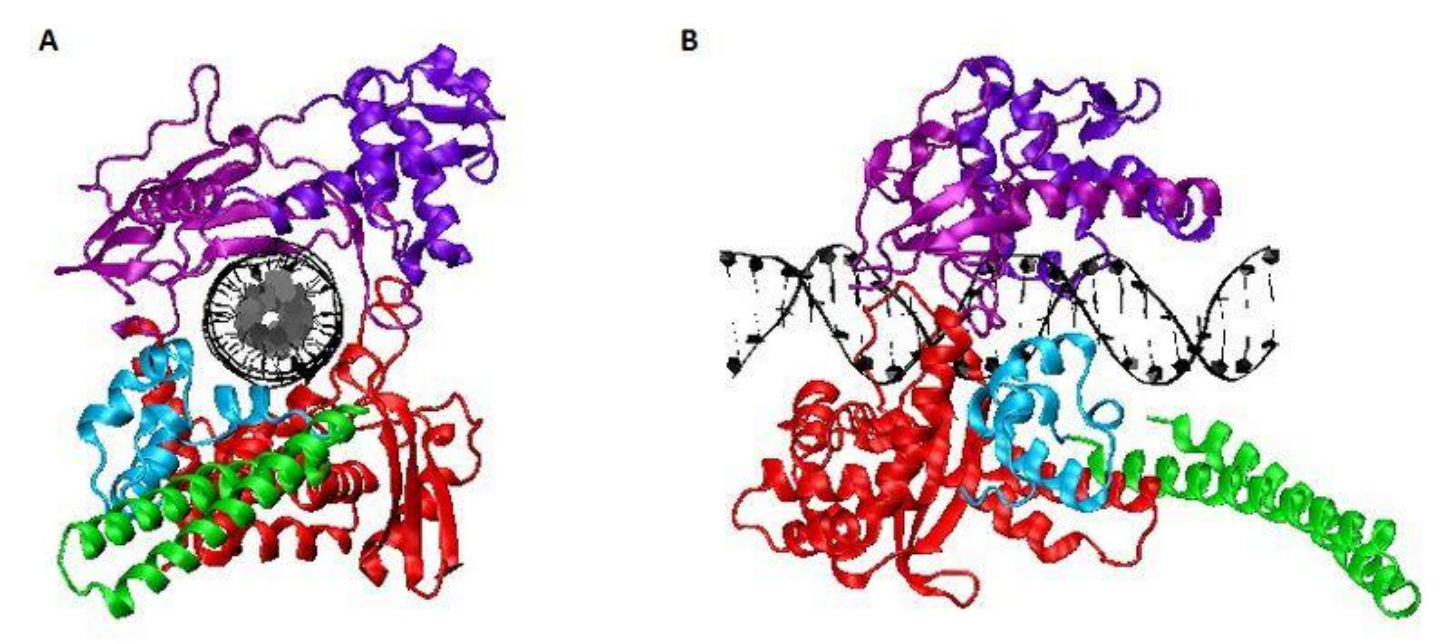
Topoizomerazy

Topoizomerazy – grupa enzymów biorących udział w replikacji, gdzie odpowiadają za stopień skręcenia podwójnej helisy. topoizomerazy rozplatają podwójną helisę DNA, udostępniając w ten sposób matrycę dla enzymów replikacyjnych lub transkrypcyjnych.



Topoizomeraza typu I

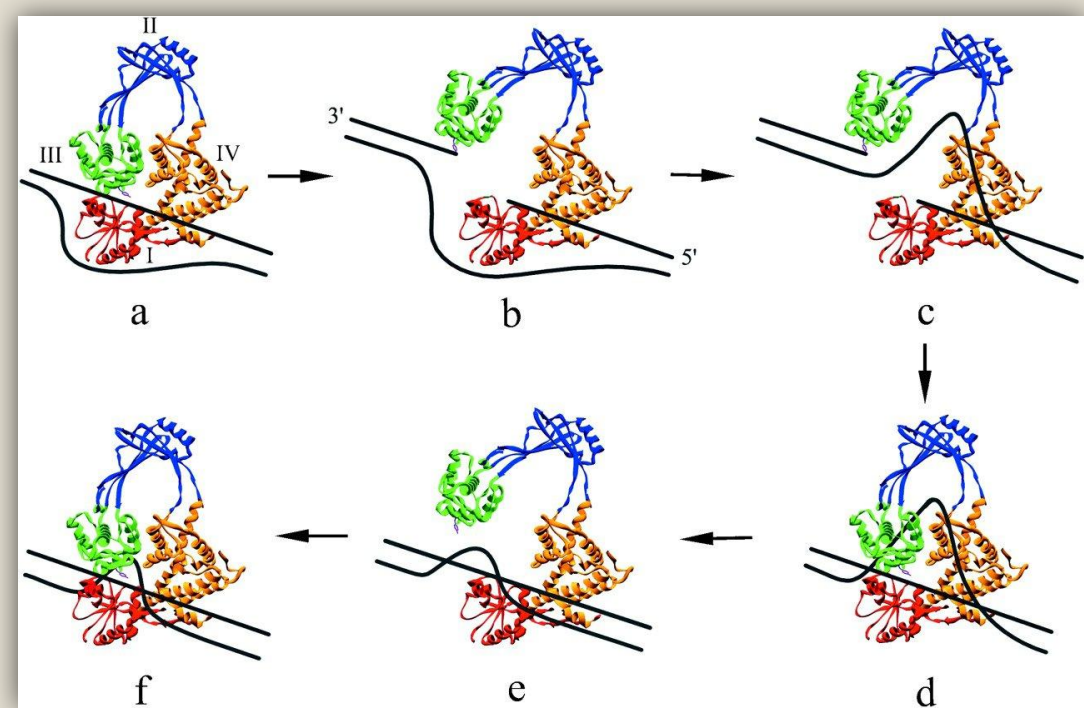
- Topoizomerazy typu I w procesie relaksacji DNA nacinają jedną nić i nie wymagają do tego hydrolizy ATP. W zależności od budowy, występowania i mechanizmu działania możemy podzielić je na trzy podgrupy: A, B i C. Typ IA usuwa tylko ujemne superskręcenia. Typ IB usuwają zarówno dodatnie, jak i ujemne superskręcenia oraz ma nieco odmienny mechanizm relaksacji niż typ IA. Typ IC działa w sposób podobny do topoizomerazy IB, ale różni się od niej strukturą.



Topoizomeraza I w kompleksie z DNA. A) widok wzdłuż helisy DNA. B) Układ odwrócony o 900 względem A.

- Cząsteczka DNA wiąże się z centrum aktywnym topoizomerazy I; grupa hydroksylowa -OH tyrozyny 723 wchodzi w reakcję z grupą fosforanową jednej z nici DNA, tworzy się wiązanie fosfodiestrowe między enzymem i DNA – następuje rozerwanie (rozcięcie) jednej z nici helisy.
- Cząsteczka DNA odwraca się wokół nieprzeciętej nici. Taka rotacja usuwa superhelikalne skręty w cząsteczce.
- Wolna grupa hydroksylowa -OH cząsteczki DNA wchodzi w reakcję z grupą fosfotyrozynową w skutek czego przerwana nić DNA zostaje połączona.
- Topoizomeraza I odłącza się od cząsteczki DNA.

Relaksacja DNA



Topoziomeraza typu II

Ludzka topoizomeraza typu II jest białkiem (homodimerem), które posiada zdolność przecinania obu nici DNA w miejscach znajdujących się naprzeciwko siebie, przemieszczenia przeciętych nici, a następnie odbudowy wiązań fosfodiestrowych.

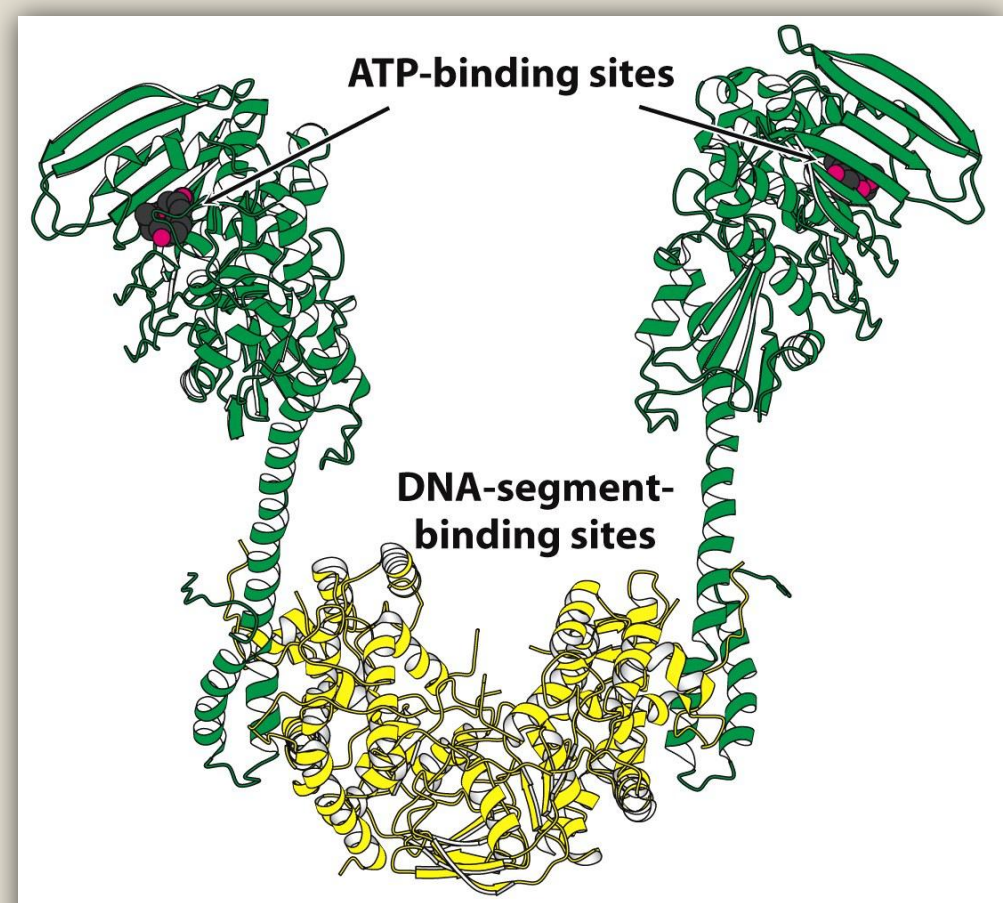
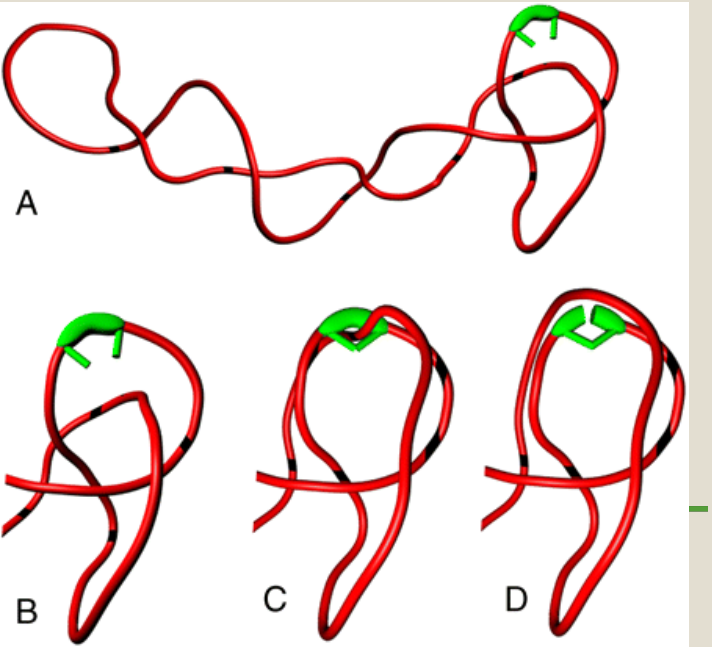
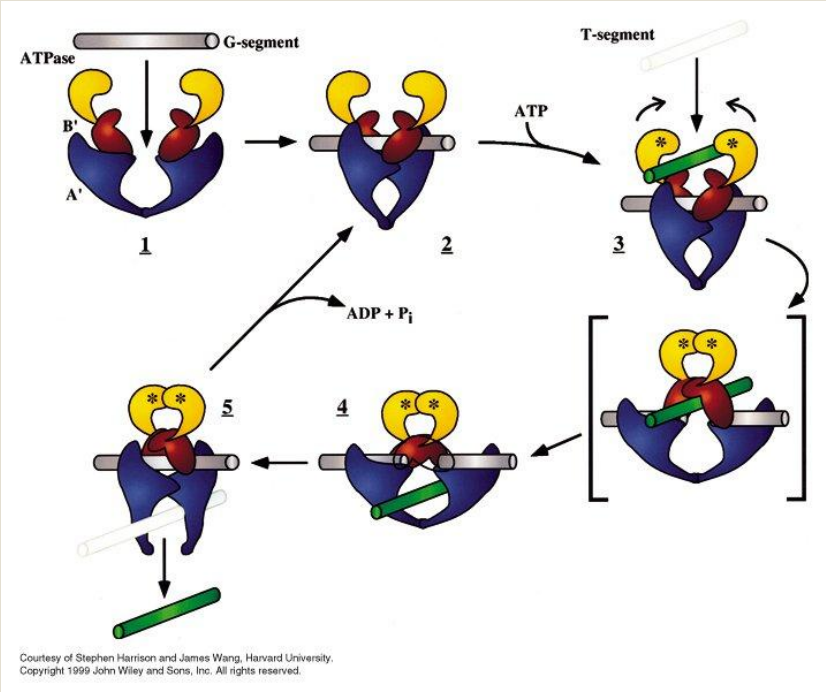


Figure 28.18
***Biochemistry*, Seventh Edition**
© 2012 W. H. Freeman and Company

Dodanie superskrętu

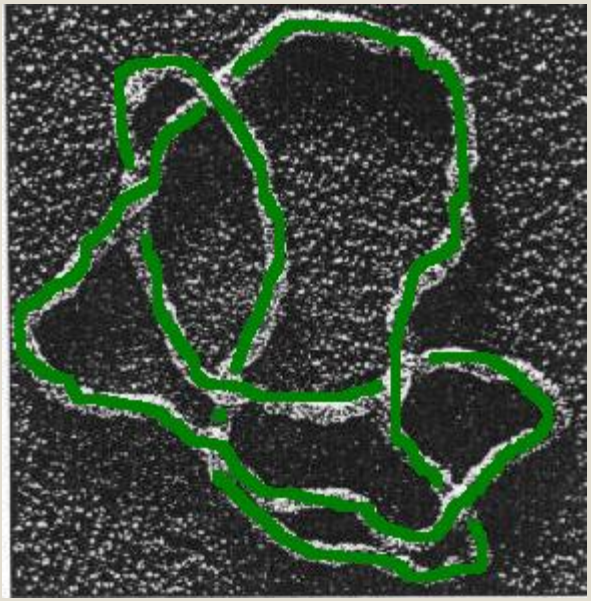
- Cząsteczka DNA wiąże się z centrum aktywnym topoizomerazy II, tworząc kompleks.
- Kompleks topoizomeraza II / cząsteczka DNA (segment G) wiąże się słabo z innym fragmentem DNA (segment T) za pomocą domen.
- Po dostarczeniu energii w postaci ATP następuje rozerwanie obu nici segmentu G.
- Segment T zostaje przemieszczony za pomocą domen (białek składowych cząsteczki) topoizomerazy II przez pęknięcie segmentu G.
- Pęknięte nici segmentu G zostają na nowo połączone.
- Topoizomeraza II otwiera domeny (segment G pozostaje związany z enzymem) i jest gotowa do związania kolejnego segmentu T.



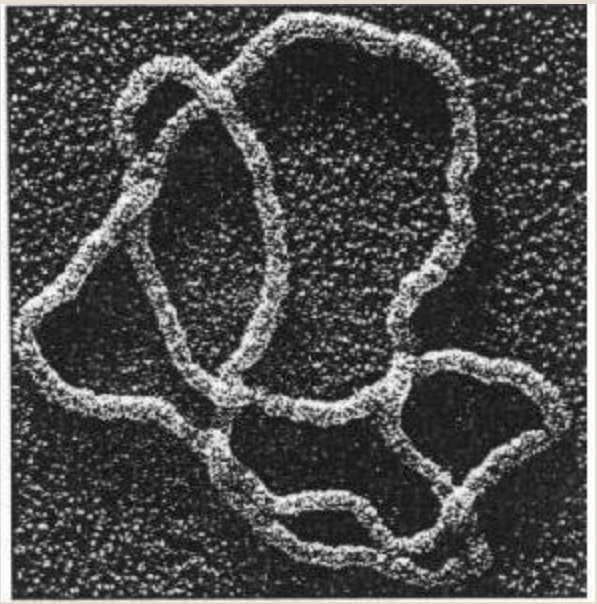


Biolodzy używają mikroskopu elektronowego do obserwowania struktur DNA. Fragmenty leżące pod oraz nad są rozróżniany przy pomocy powłoki białkowej, co umożliwia wizualizowanie spłaszczonej cząsteczki DNA jako węzeł.

Cząsteczka DNA otoczona powłoką białkową

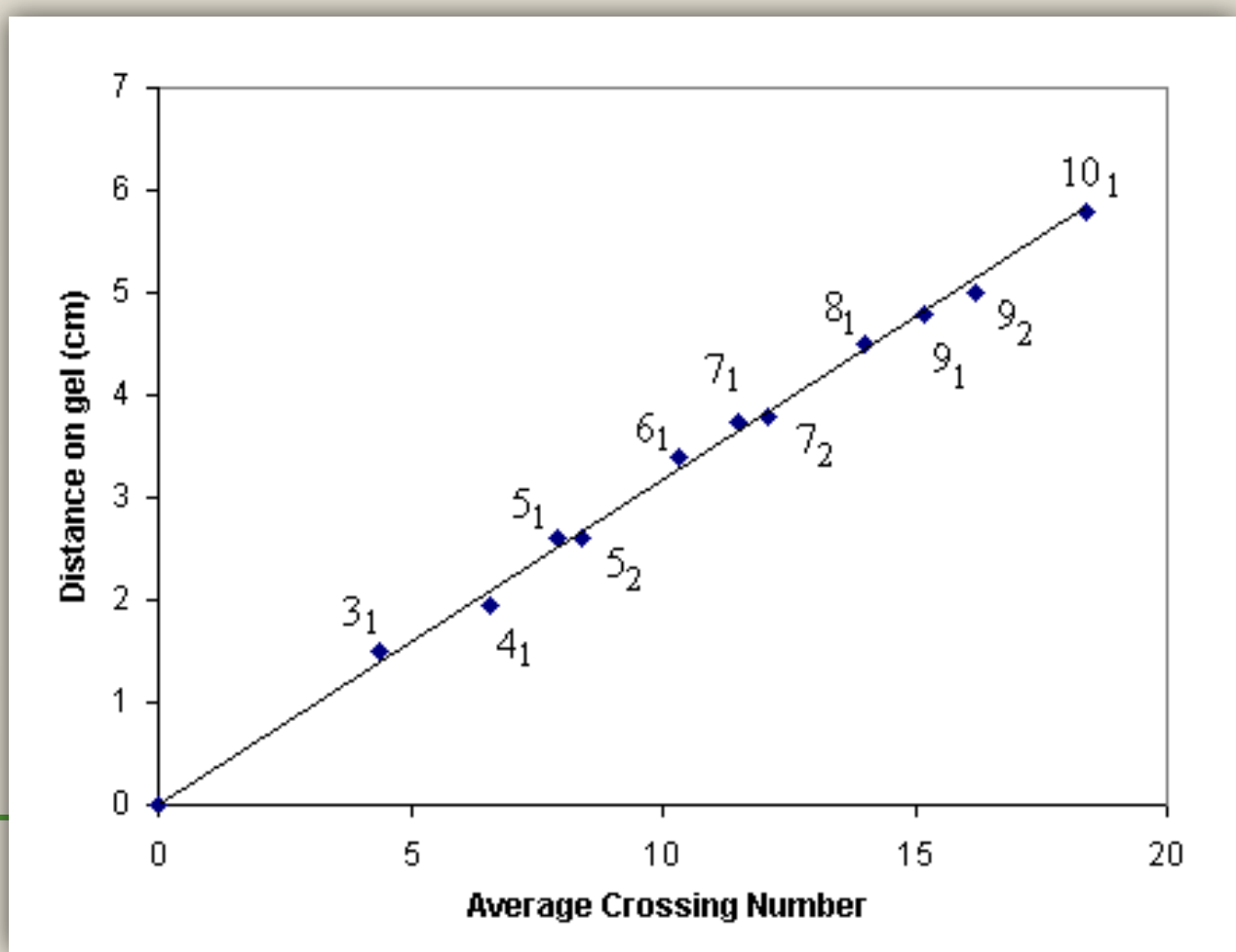


Zdjęcie cząsteczki DNA z mikroskopu elektronowego

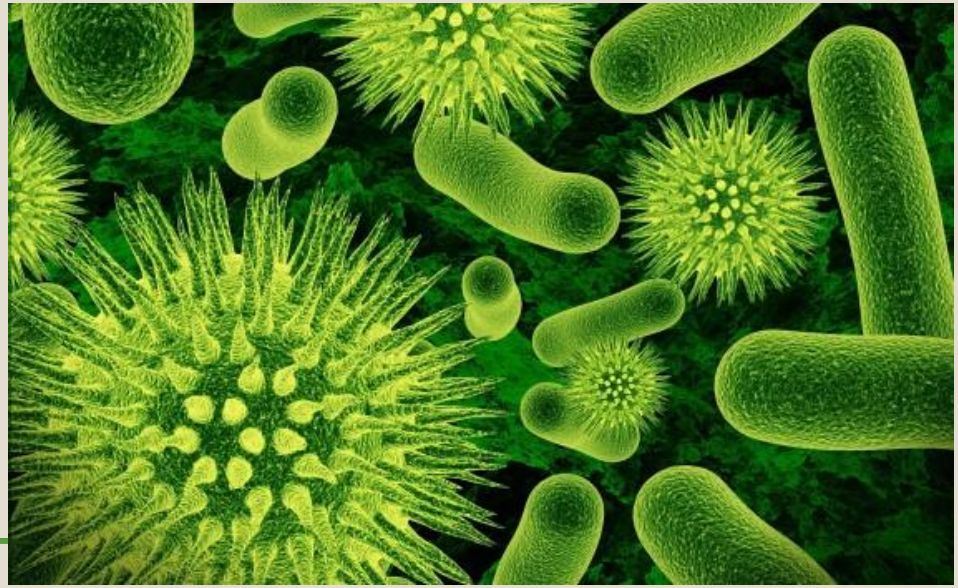


Określenie parametrów charakteryzujących węzeł pozwala na rozróżnianie struktur DNA jednakże może występować wiele różnych struktur DNA posiadających taką samą liczbę skrzyzowań czy splotów.

Dobrą metodą określania liczby skrzyżowań cząsteczki DNA jest elektroforeza żelowa. Dystans jaki pokonuje cząsteczka DNA w żelu jest proporcjonalny do liczby skrzyżowań co przedstawiono na wykresie:



Badanie właściwości DNA za pomocą modeli matematycznych jest możliwe dla struktur bakterii i wirusów które są koliste. Ludzkie DNA, które jest liniowe i niezwykle długie można w ten sposób badać używając okresowego wiązania tworząc topologicznie podobne formy do kulistych.



Badanie DNA za pomocą mapy Lorenza

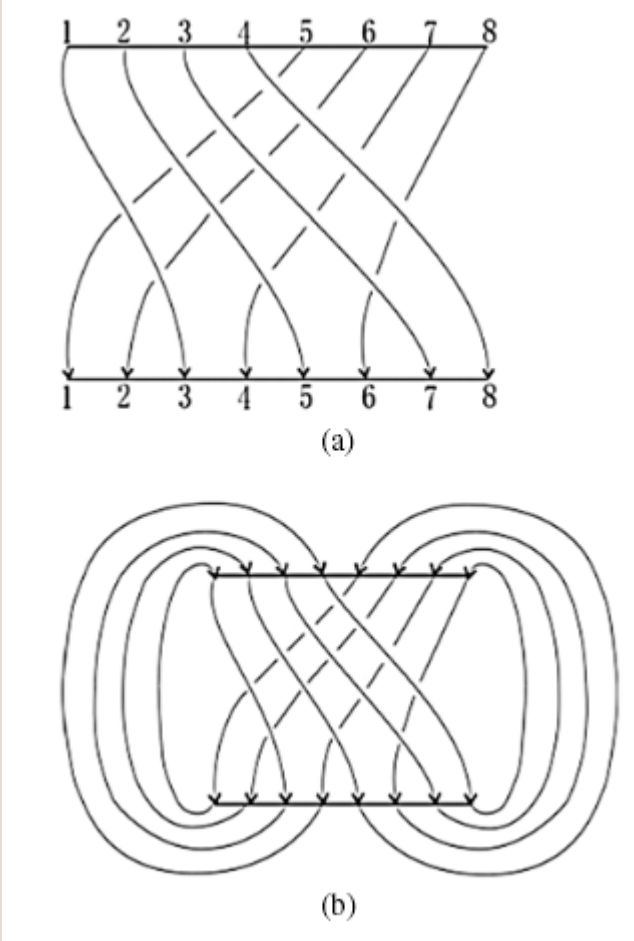
Mapa Lorenza to nowe spojrzenie na węzły, jest bardziej naturalną koncepcją użycia węzłów. Jest bardziej prawdopodobne, że taka okresowa orbita stanowi najbardziej oczywistą geometryczną charakterystykę węzła

Konstrukcja mapy Lorenza

a) Jeżeli skrzyżowanie wstęg powstaje zgodnie z porządkiem wewnątrz danego regionu to kolejna wstęga zawsze przebiega pod wcześniej utworzonymi.

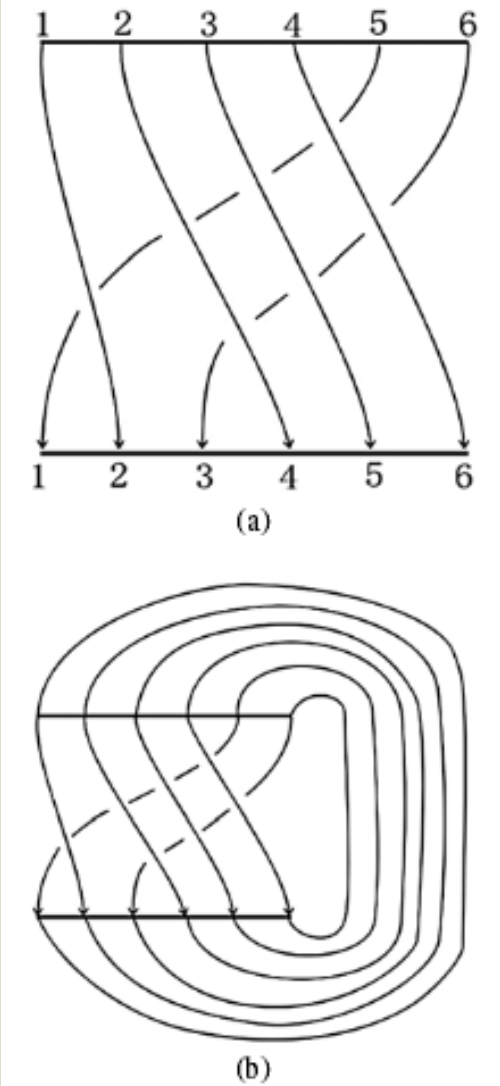
b) Dowolne dwie sąsiednie wstęgi mają nie więcej niż połowę skrętu (twist)

$$S_8 = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 & 7 & 8 \\ 3 & 5 & 7 & 8 & 1 & 2 & 4 & 6 \end{pmatrix}.$$



Mapa Lorenza pozwala na badanie topologicznych właściwości węzła, a co za tym idzie zrozumienie fizjologicznego zachowania struktury DNA czy białek.

$$S_6 = \begin{pmatrix} 1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 \\ 2 & 4 & 5 & 6 & 1 & 3 \end{pmatrix}.$$



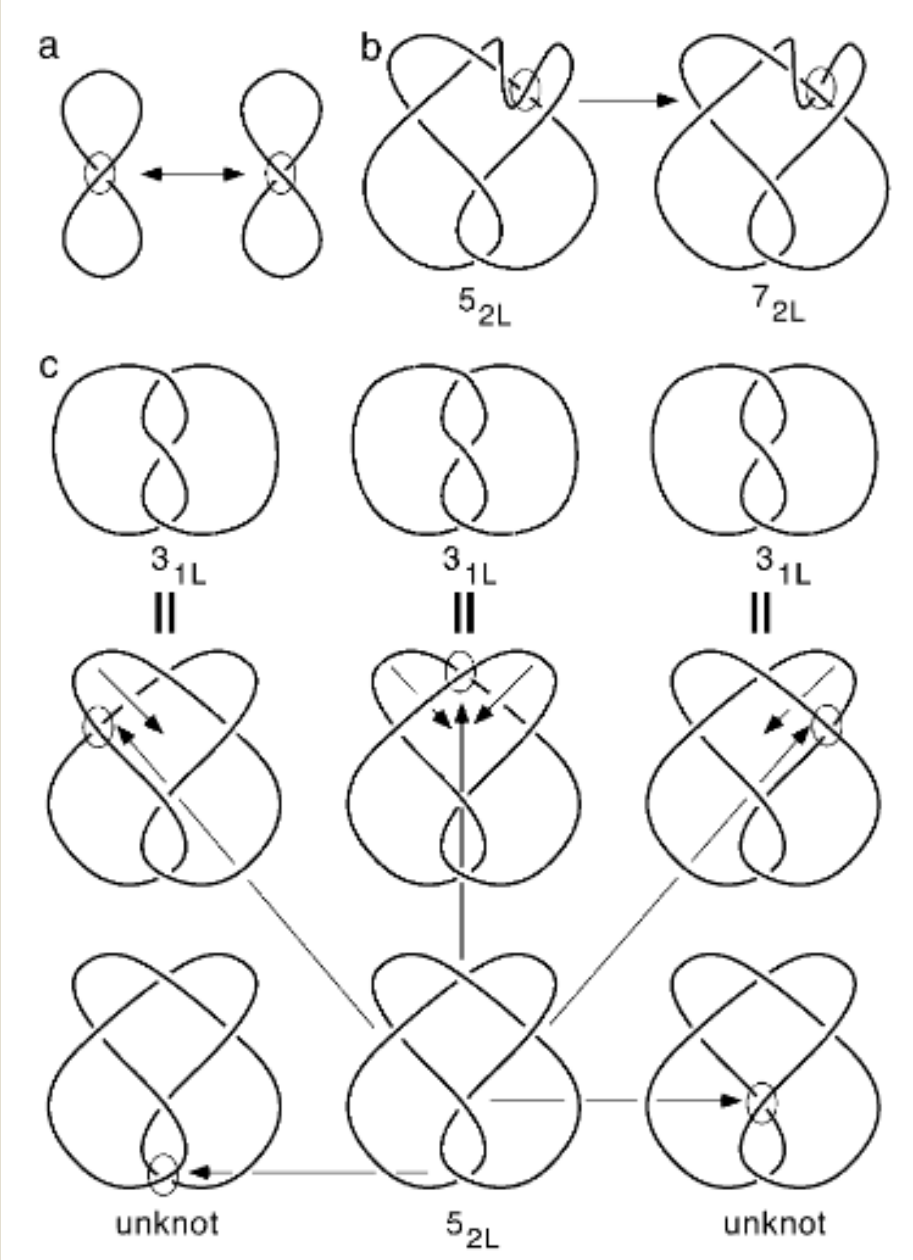
- W przypadku kolistych struktur DNA, enzymy miejscowo-specyficzne wywołują między strukturalne przejścia powodując, że struktury osiągają stan równowagi, nawet w przypadku gdy struktury topologicznie są takie same jak przed dodaniem enzymu.
- Obecnie wiadomo, że tylko podklasa tych enzymów: resolwazy miejscowo-specyficzne klasy IA, mogą doprowadzić cząsteczki do topologicznej równowagi na skutek energii gradientu.
- Tylko ta grupa enzymów potrafi wywołać zapętlenie lub rozplątanie zarówno jednoniciowego jaki i dwuniciowego DNA .

- Wykonano symulacje w których założony rodzaj struktury (w postaci węzła) ulegał relaksacji przechodząc w inny rodzaj węzła. Oczywiście były to obliczenia więc określano prawdopodobieństwo takiego przejścia mogącego zajść dla cząsteczki DNA.
- W rezultacie otrzymano wiele ścieżek prowadzących do otrzymania różnych węzłów

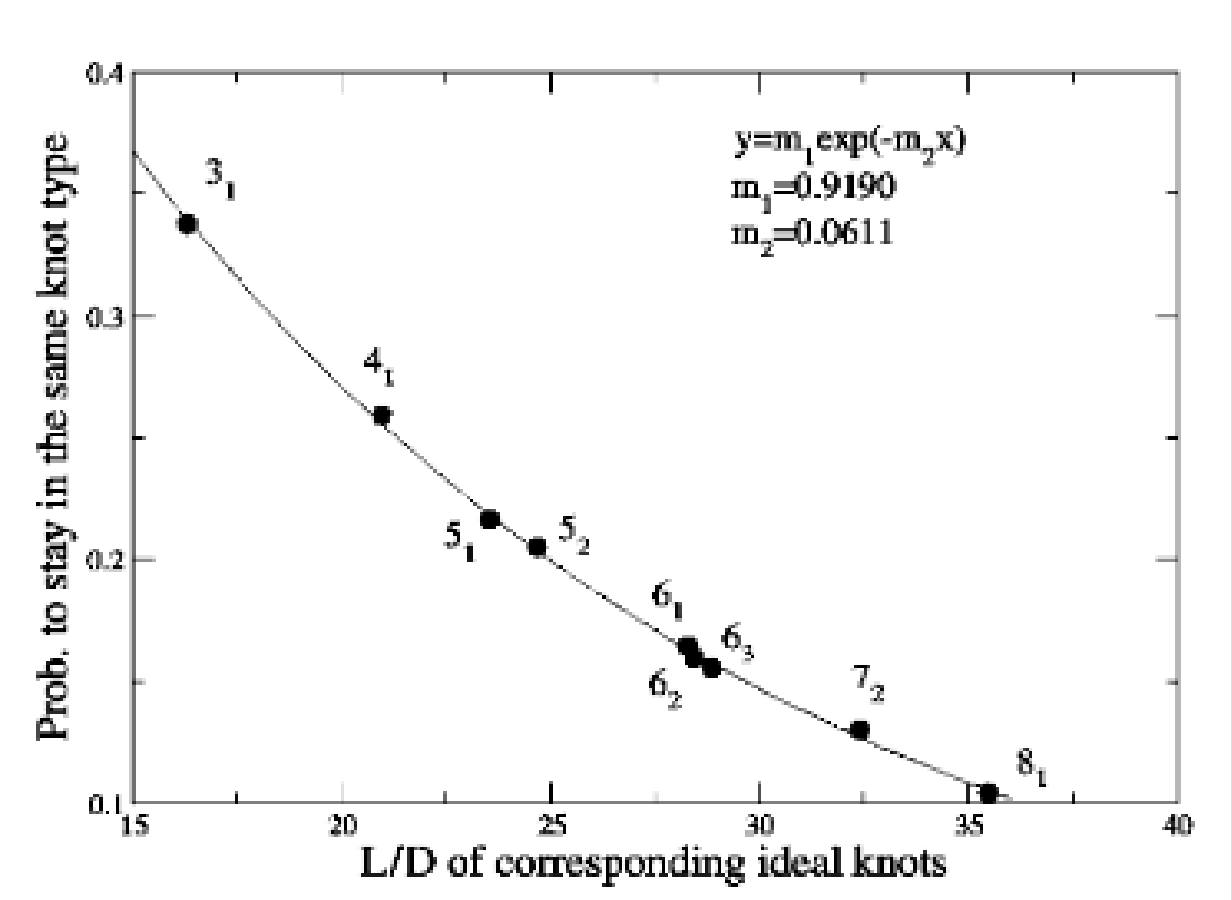
W tabeli umieszczono obliczone prawdopodobieństwo przejścia jednego typu węzła w inny:

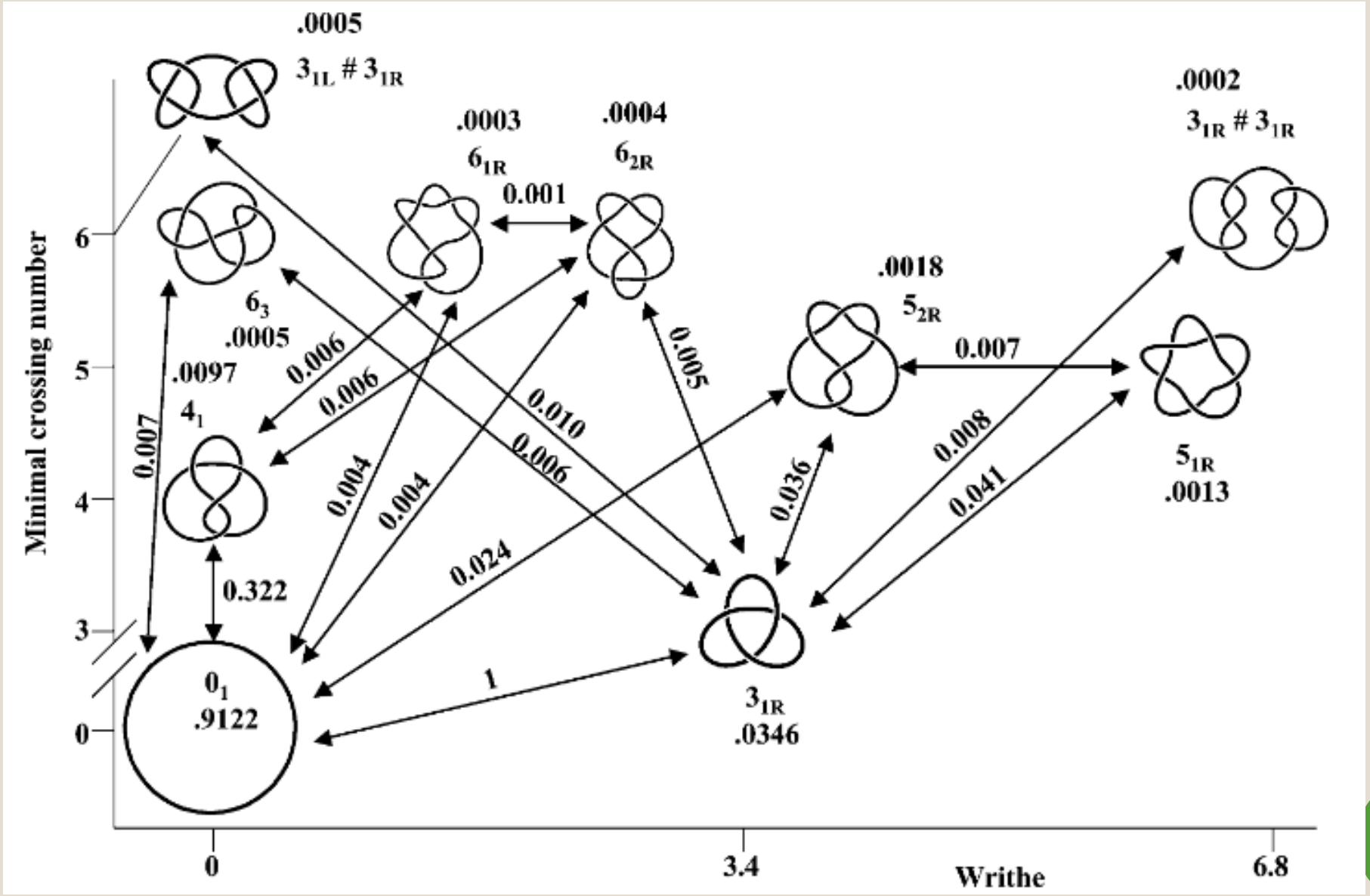
	Starting knot types									
Resulting knot types	0_1	3_{1R} or 3_{1L}	4_1	5_{1R} or 5_{1L}	5_{2R} or 5_{2L}	6_{1R} or 6_{1L}	6_{2R} or 6_{2L}	6_3	$3_{1R}\#3_{1L}$	$3_{1R}\#3_{1R}$ or $3_{1L}\#3_{1L}$
0_1	0.5988 **0.9457** 0.9038		0.6844 0.9276		0.2820 0.3610	0.2669 0.3246	0.1881 0.2281	0.2921 0.3528		
3_{1R} or 3_{1L}	0.0227 0.4180	**0.3374**		0.6534 0.8541	0.4182 0.5353		0.2717 0.3294	0.2679 0.3236	0.4129 0.5000	0.8304 1.0000
4_1	0.0073 0.1345		**0.2622**			0.4379 0.5325	0.3178 0.3852			
5_{1R} or 5_{1L}		0.0246 0.0372		**0.2350**	0.0811 0.1038					
5_{2R} or 5_{2L}	0.0006 0.0102	0.0217 0.0328		0.1116 0.1459	**0.2187**					
6_{1R} or 6_{1L}	0.0001 0.0016		0.0132 0.0179			0.0508 **0.1775** 0.0618	0.0473 0.0573			
6_{2R} or 6_{2L}	0.0001 0.0016	0.0033 0.0049	0.0136 0.0183			0.0668 0.0812	**0.1750**			
6_3	0.0002 0.0028	0.0036 0.0054						**0.1721**		
$3_{1R}\#3_{1L}$		0.0057 0.0086							**0.1742**	
$3_{1R}\#3_{1R}$ or $3_{1L}\#3_{1L}$		0.0049 0.0074								**0.1696**

Dla jednego rodzaju węzła, badano różne rodzaje przejść (opartych na zmianie różnych skrzyżowań) czego rezultatem były różne rodzaje węzłów (różnych typów, inne ilości skrzyżowań i ich rodzaj).



Obliczono również prawdopodobieństwo takiego przejścia którego wynikiem będzie węzeł takiego samego typu co wyjściowy




.0005
$3_{1L} \# 3_{1R}$
.0003
6_{1R}
.0004
6_{2R}
.0002
$3_{1R} \# 3_{1R}$
0.001
6_3
.0005
.0018
5_{2R}
.0097
4_1
0.006
0.006
0.007
0.005
0.010
0.006
0.004
0.004
0.036
0.008
0.041
0.024
0.322
1
5_{1R}
.0013
0_1
.9122
3_{1R}
.0346
Minimal crossing number
6
5
4
3
0
0
3.4
6.8
Writhe

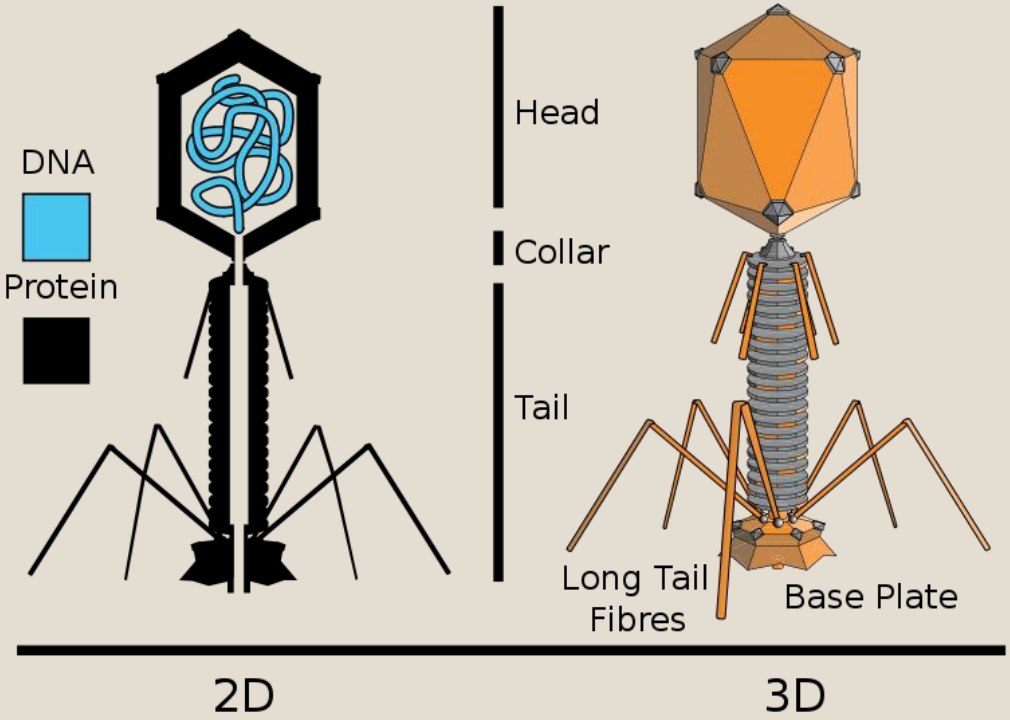
Biologiczne zastosowanie metody

- Metoda ta jest stosowana do określenia uprzywilejowanego energetycznie przekształcenia cząsteczki DNA przez topoizomerazę
- Niedawno odkryto, że topoizomeraza typu II preferuje przejścia domykające do zapętlonego węzła 5_2
- Przedstawiona metoda pozwala na odkrycie jaka była struktura wyjściowej cząsteczki na podstawie otrzymanego „zrelaksowanego” węzła

Biologiczne zastosowanie metody

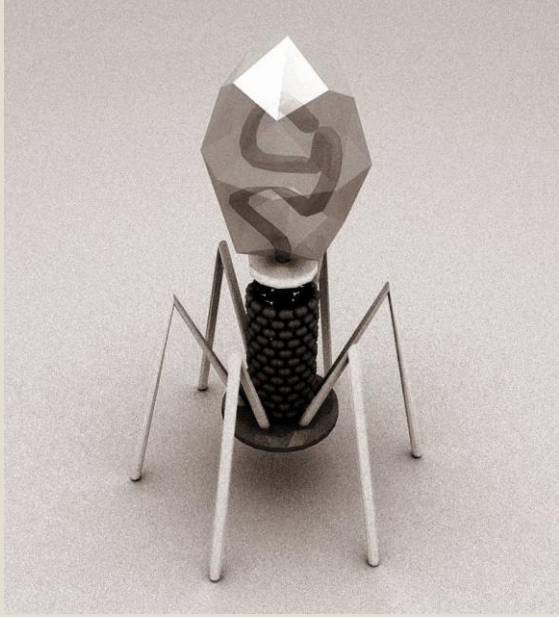
- Kolejne zastosowanie metody prawdopodobieństwa przejść w biologii polega na uzyskaniu biologicznie ważnych informacji o geometrii upakowania DNA w „głowie" bakteriofaga.
- Węzły DNA powstałe w obrębie „głowy" bakteriofaga mogą dostarczyć wskazówek na temat natury upakowania DNA. Jednakże otrzymane w mikroskopii elektronowej węzły są zbyt skomplikowane dla obliczeń.
- Jednak po częściowej relaksacji węzły stają się prostsze i mogą być poprawnie badane.

Bakteriofag



Bakteriofagi są to wirusy bakteryjne zbudowane z materiału genetycznego otoczonego białkami strukturalnymi, które tworzą kapsyd. Materiał genetyczny bakteriofagów stanowi DNA lub rzadziej RNA; w postaci jednoniciowej lub dwuniciowej.

Bakteriofag T4



- **Bakteriofag T4** – zawierający dwuniciowy DNA bakteriofag o kapsydzie mającym kształt dwudziestościanu foremnego (ikosaedru), który infekuje komórki bakterii *Escherichia coli*. Przytwierdza się on za pomocą ogonka do bakterii, a następnie, kurcząc pochewkę ogonka, wstrzykuje swój materiał genetyczny do wnętrza komórki bakterii.
- Jest to jeden z najlepiej poznanych wirusów, który stał się swego rodzaju "prototypem" bakteriofaga czy też wirusa i został najszerzej wykorzystywany w badaniach naukowych z tej dziedziny. Powszechnie występuje we florze jelitowej ludzi i ssaków.

Zastosowanie bakteriofagów w biotechnologii

- Enzymy bakteriofagów są wykorzystywane w biotechnologii i inżynierii genetycznej. Charakteryzuje je wysoka wydajność katalizy reakcji w której biorą udział. Najczęściej wykorzystywane są enzymy fagów T – parzystych. Bakteriofag T4 dostarcza ligazy RNA, ligazy DNA, polimerazy DNA oraz kinazy polinukleotydowej.
- Enzymy dostarczane przez bakteriofagi są stosowane do:

– Łączenia cząsteczek RNA

– Znakowania RNA markerami florescencyjnymi lub radioaktywnymi

– Klonowania fragmentów DNA do odpowiednich wektorów

– Przyłączania fragmentów DNA do końca innej cząsteczki DNA

– Naprawie uszkodzonych sekwencji DNA

– Replikacji fagowego genomu

– I wiele innych zastosowań

Zastosowanie bakteriofagów w biotechnologii

- Genomy bakteriofagów są wykorzystywane do konstruowania wektorów przenoszących docelowe geny do komórek bakteryjnych i umożliwiających ich powielanie oraz ekspresję. W tym celu najczęściej stosuje się promotory pochodzące z bakteriofagów T3, T5, T7 oraz SP6
- Po raz pierwszy jako wektora do klonowania DNA wykorzystano bakteriofaga λ. Jego genom stanowi dwuniciowy DNA
- Z materiału genetycznego bakteriofaga λ można usunąć duże fragmenty DNA. Pomimo braku części DNA nie traci on zdolności do replikacji. Umożliwia to wstawienie obcego fragmentu DNA w zwolnione miejsce.

Zastosowanie bakteriofagów w terapii (fagoterapia)

- Rosnąca liczba gatunków bakterii opornych na większość antybiotyków zadecydowała o próbie wykorzystania bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Wirusy bakteryjne znalazły zastosowanie w terapii ropnych zakażeń bakteryjnych skóry, duru brzusznego i czerwonki
- W fagoterapii wykorzystuje się naturalną zdolność bakteriofagów do zakażania komórek bakterii oraz ich lizy podczas uwalniania cząstek potomnych wirusa.
- Istotne jest aby dobrać odpowiedni szczep bakteriofaga do zidentyfikowanego czynnika zakażającego (szczep bakterii). Stosuje się bakteriofagi o szerokim jak i wąskim spektrum działania

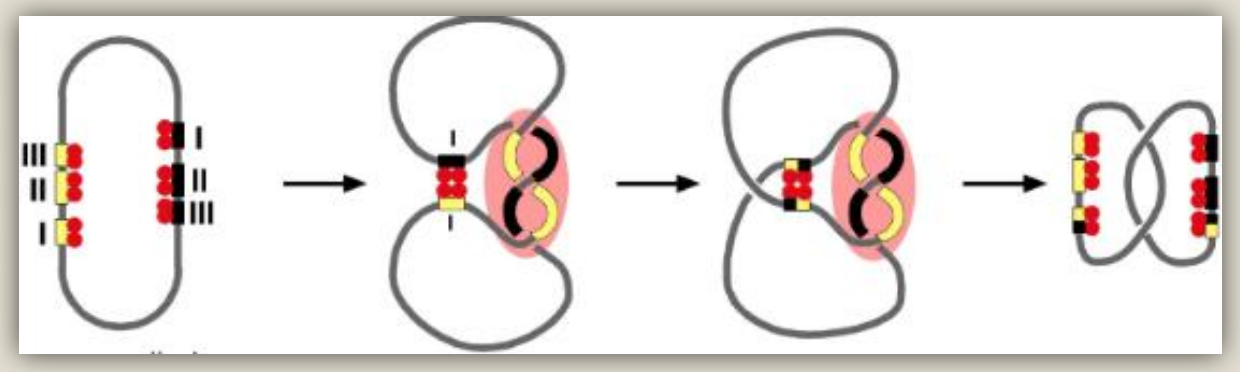
Zastosowanie bakteriofagów w terapii (fagoterapia)

- Próby zastosowania preparatów fagowych u ludzi wykazały, że są one całkowicie skuteczne i bezpieczne. Przeprowadzono badania nad wykorzystaniem bakteriofagów w leczeniu rożnych zakażeń bakteryjnych, takich jak ropne zakażenia skóry, płuc, opłucnej, nerek czy układu żołądkowo-jelitowego.
- Do pierwszych dostępnych w handlu preparatów fagowych o działaniu przeciwbakteryjnym należą: Bacte-coli-phage, Bacte-rhinophage, Bacte-intestiphage, Bactepuophage i Bacte-staphyphage oraz produkty fagowe stosowane u ludzi przeciw zakażeniom Staphylococci, Streptococci i Escherichia coli

Zastosowanie bakteriofagów w terapii (fagoterapia)

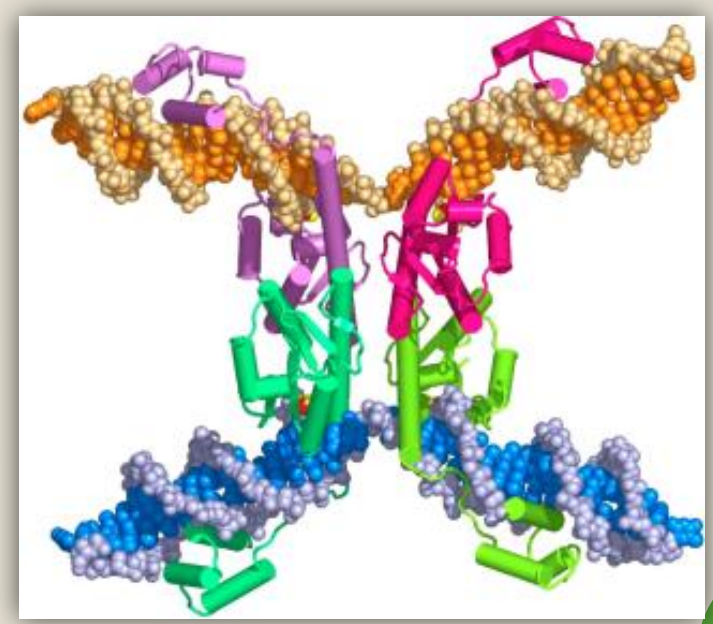
- W porównaniu z antybiotykami, bakteriofagi charakteryzują się wysoką swoistością względem gospodarza. Atakują one konkretny szczep bakterii, nie niszcząc przy tym naturalnej flory bakteryjnej. Zastosowanie bakteriofagów w terapii nie powoduje również silnych efektów ubocznych jak alergie.
- Zastosowanie bakteriofagów w terapii ma też swoje wady. Poważnym zagrożeniem jest udział fagów w horyzontalnym transferze genów co może doprowadzić do powstania nowych groźnych szczepów bakterii. Oprócz tego problem stanowi słaba penetracja cząstek fagowych do wielu tkanek pacjenta, immunogenność wirionów oraz trudne otrzymywanie dostatecznie oczyszczonych preparatów

Resolwaza Tn3

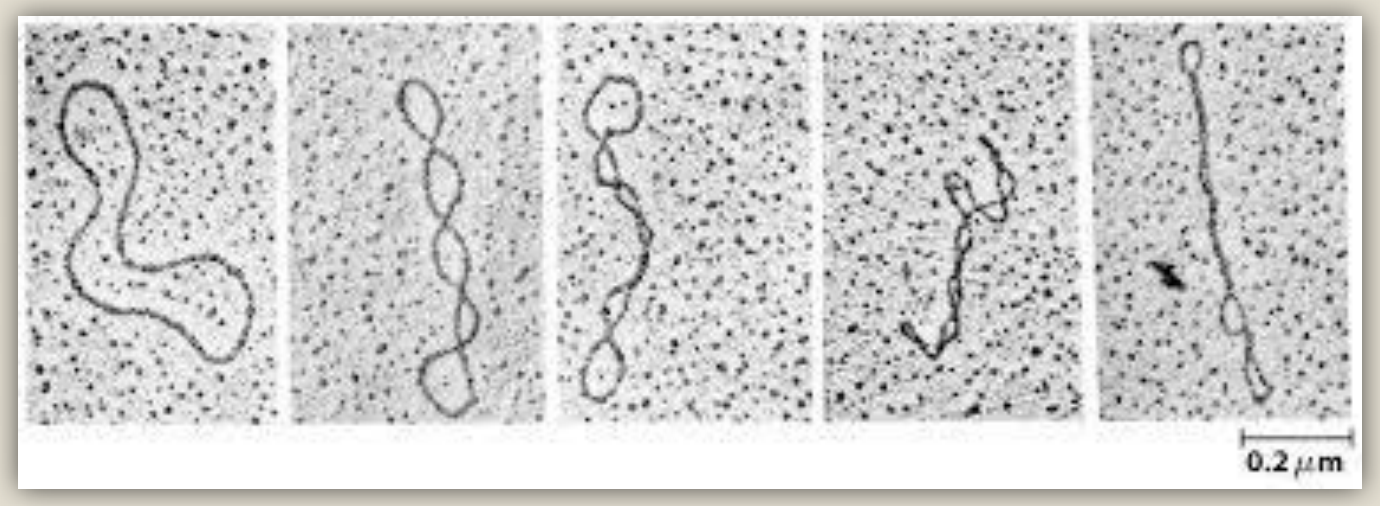


Resolwaza o działaniu miejscowym – rozcina łańcuchy DNA, łącząc je następnie w inny sposób

Wiele firm farmaceutycznych i biotechnologicznych korzysta z resolwazy miejscowo-specyficznej aby manipulować sekwencją DNA.



- W 1990 roku Ernest i Sumners użyli modelu supłowego do analizy resolwazy miejscowo-specyficznej Tn3 łączącej się do niezaplątanego substratu w formie superhelisy, po każdym obrocie resolwazy trzy ujemnie skręcenia zostały zamienione na jedno dodatnie skrzyżowanie.



Resolwaza miejscowo-specyficzna a teoria węzłów

Jeśli oś podwójnej helisy DNA jest okręgiem, resolwaza miejscowo – specyficzna może przekształcić tą okrągłą cząsteczkę na różnorodne nietrywialnie węzły i sploty.

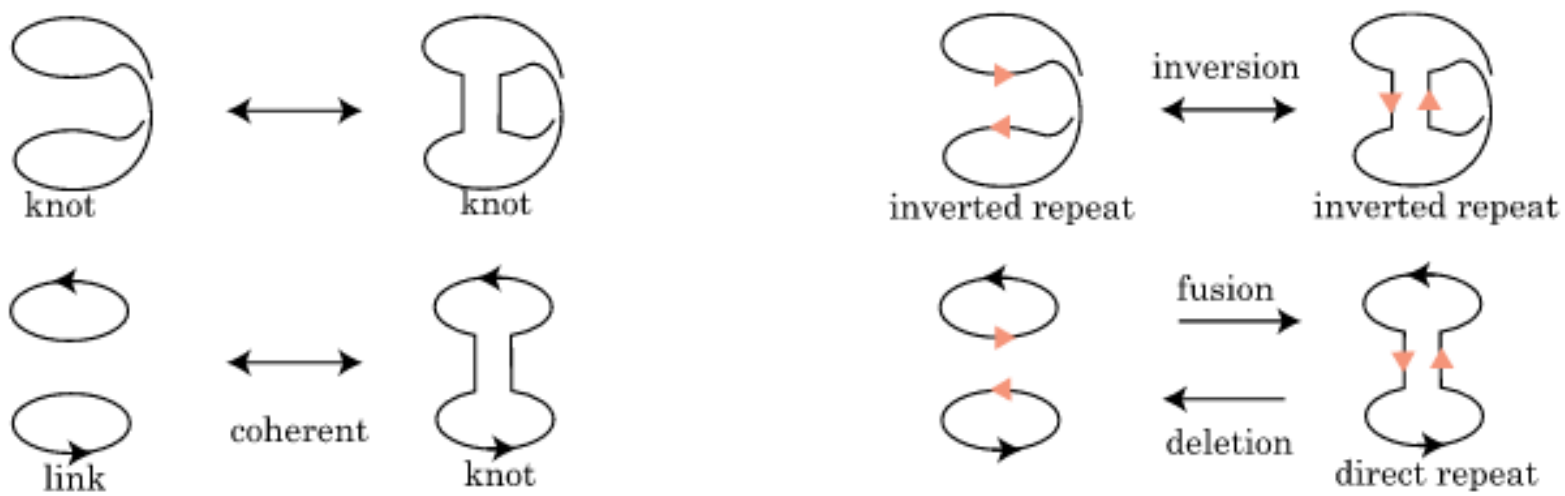
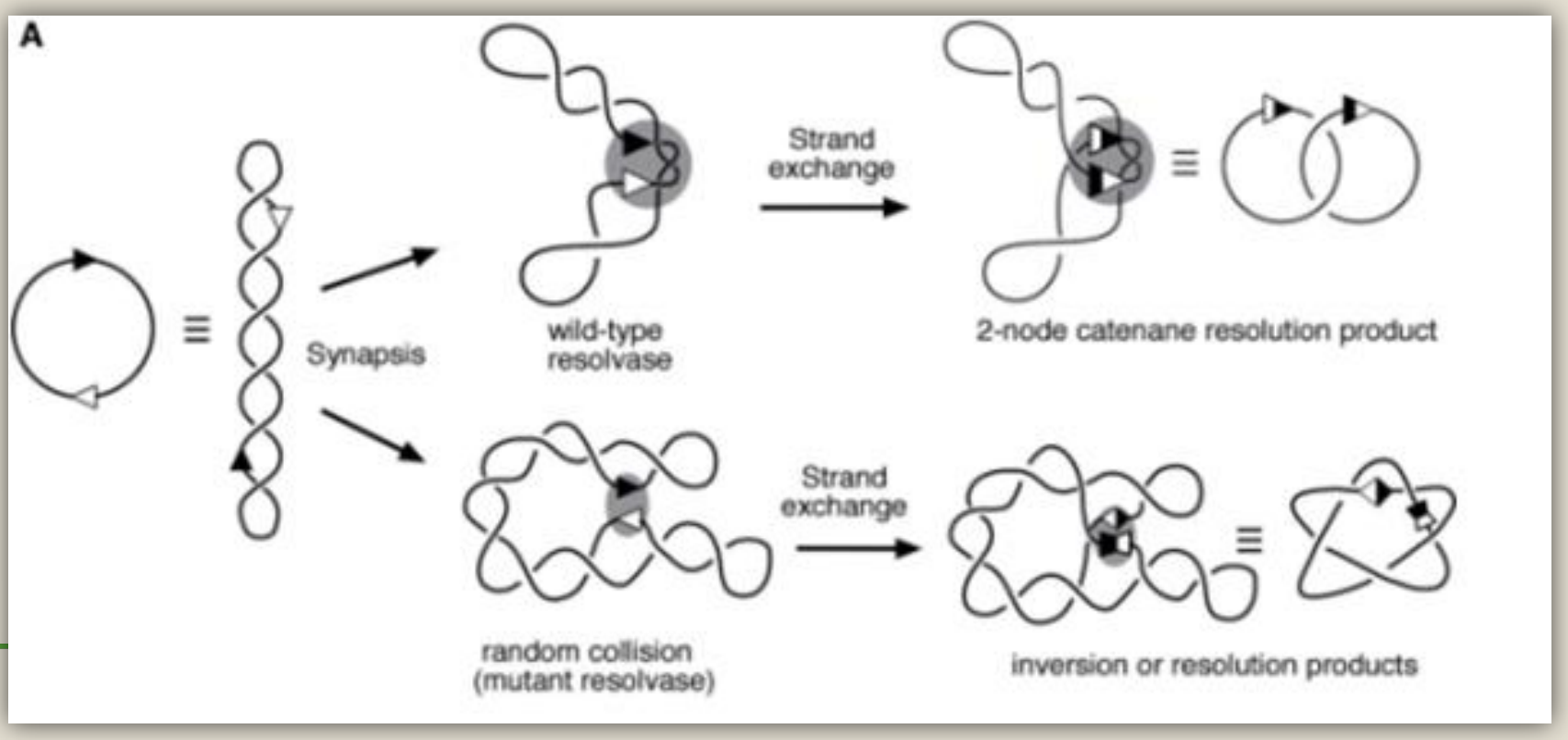


Fig. 7. Band surgeries on the left correspond to site-specific recombinations on the right. In particular, a coherent band surgery on the left bottom corresponds to a direct repeat recombination on the right bottom.

Jak to działa?

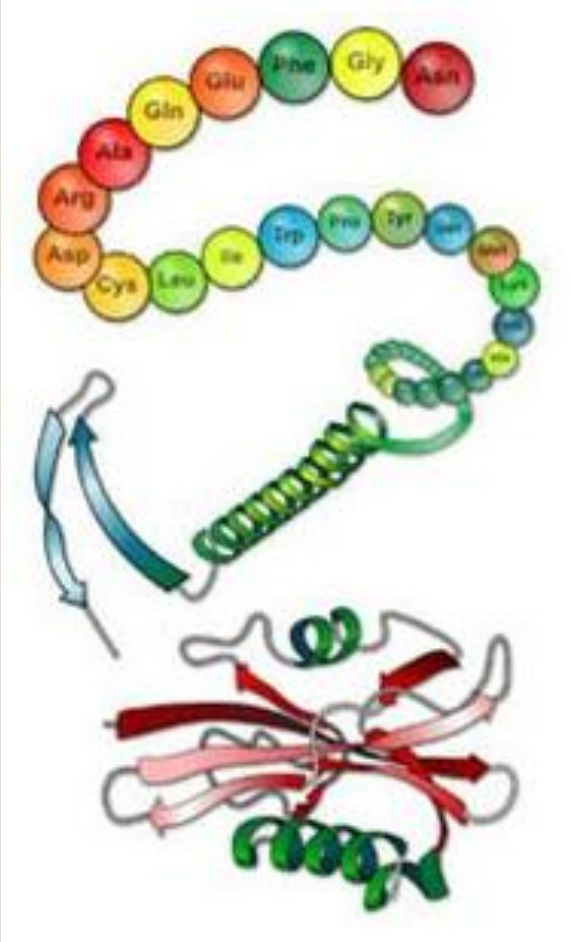
Białko przekształca sekwencję genetyczną (np. GATTACA na ACATTAG), czego rezultatem jest delecja, insercja lub inwersja segmentu DNA. To działanie wiąże się z różnorodnymi procesami fizjologicznymi, a szczególnie jest kluczowe w rozprzestrzenianiu się infekcji wirusowej.



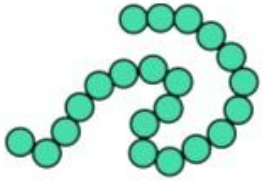
Białka

Wielkocząsteczkowe biopolimery, zbudowane z reszt aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi -CONH-. Występują we wszystkich żywych organizmach oraz wirusach. Białka zbudowane są z 20 aminokwasów. O właściwościach decyduje sekwencja aminokwasów w polipeptydowym łańcuchu. Ze względu na skale przestrzenną można białka podzielić na cztery poziomy:

- Struktura pierwszorzędowa
- Struktura drugorzędowa
- Struktura trzeciorzędowa
- Struktura czwartorzędowa

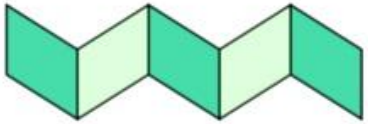


Białka



struktura pierwszorzędowa

to sekwencja aminokwasów, ich kolejność, liniowe ułożenie determinowane przez kolejność nukleotydów w DNA



beta harmonijka

alfa helisa

struktura drugorzędowa

zwinięcie struktury pierwszorzędowej utrwalone za pomocą wiązań wodorowych; ich zerwanie powoduje nieodwracalne zniszczenie białka - denaturację

struktura trzeciorzędowa

struktura warunkująca właściwości białka, stabilizowana przez wiązania powstające pomiędzy oddalonymi od siebie aminokwasami (m.in..wiązania jonowe, mostki dwusiarczkowe); również może ulegać denaturacji

struktura czwartorzędowa

to sposób połączenia się struktur trzeciorzędowych w przestrzeni; dotyczy białek zbudowanych z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego

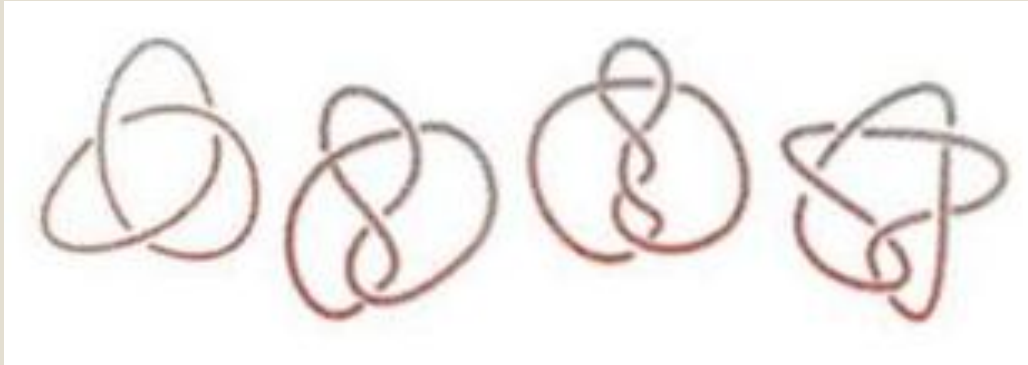
Białka a węzły

- Struktury białek poddano komputerowej analizie. Okazało się, że około 1% przebadanych białek zawiera węzły.
- Mechanizm powstawania węzła w strukturze białka:

– Najpierw powstaje pętla, która ulega skręceniu

– Następnie przez jej oczko zostaje przełożona końcówka łańcucha białkowego

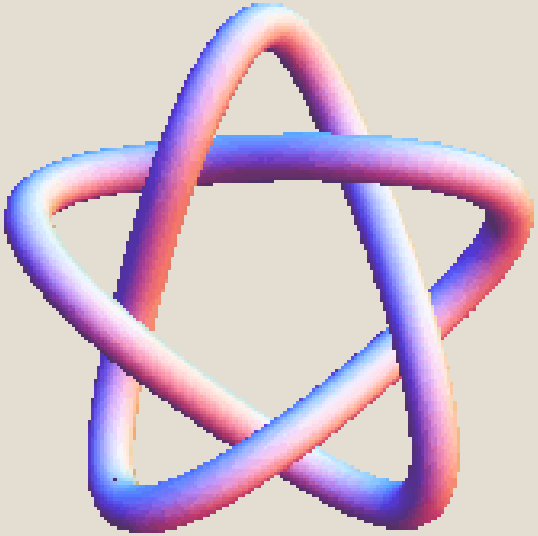
– Jeśli pętlę skręcimy o 180 stopni i wykonamy przełożenie przez oczko, otrzymamy węzeł 3_1; jeśli wykonamy pełny obrót: 4_1, jeśli dwa obroty: 5_2, przy trzech: 6_1.



Rodzaje węzłów w białkach. Od lewej: 3-1, 4-1, 5-2 i 6-1. Źródło: Public domain

Dlaczego w białku nie powstaje węzeł 5_1?

Powstanie tego węzła wymagałoby dwukrotnego przełożenia końcówki przez oczko, co jest bardzo mało prawdopodobne



Białka a węzły

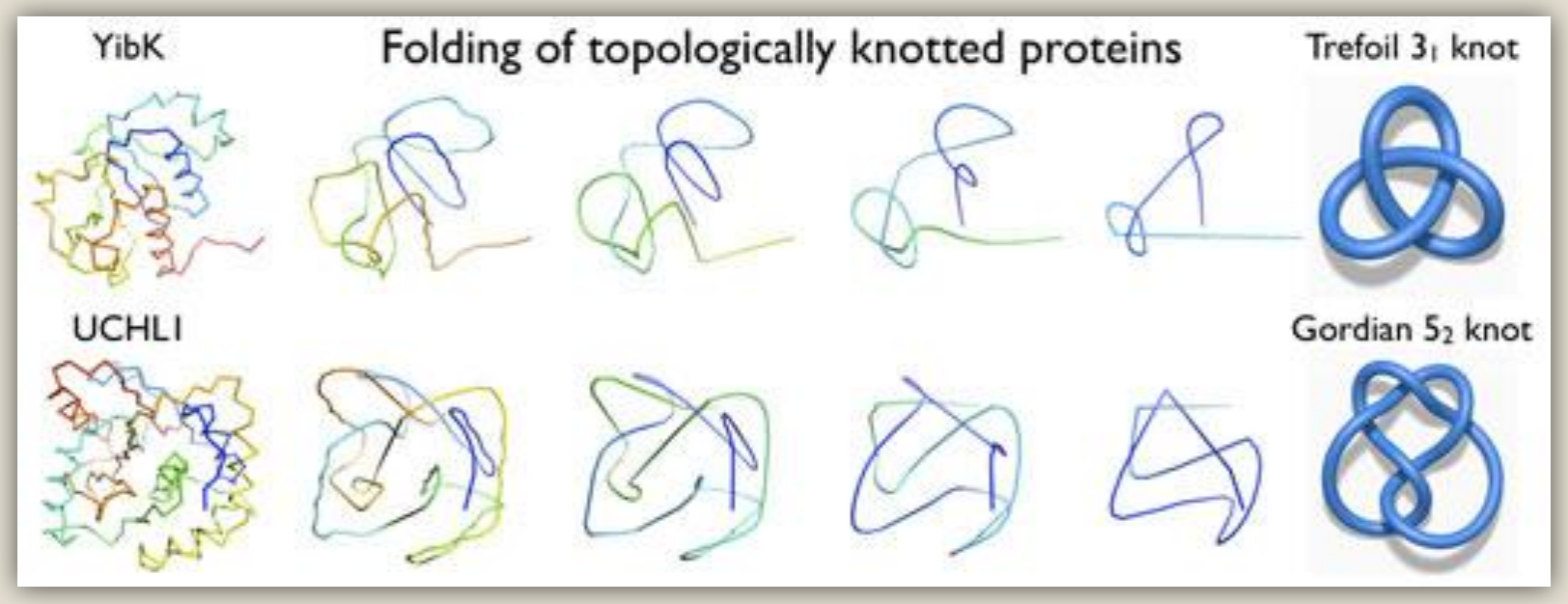
- Symulacje pozwoliły również zrozumieć, w jaki sposób dochodzi do przetknięcia końcówki łańcucha przez oczko pętli.
- Proces okazał się dwuetapowy.
  - Najpierw przez pierwotną pętlę przechodzi druga, tymczasowa pętla, co prowadzi do powstania pseudowęzła podobnego do stosowanego przy zawiązywaniu sznurowadeł.
  - Dopiero w drugiej fazie końcówka łańcucha przeciska się przez pętlę pierwotną i formuje właściwy węzeł.

Białka a węzły

- Węzły w wyraźny sposób ograniczają ruchy łańcucha, badania nad ich powstawaniem mają istotne znaczenie dla poznania mechanizmów zwijania i rozwijania struktur białkowych. Węzły stwarzają większy opór mechaniczny przy rozciąganiu białek.
- Wiele białek z węzłami to enzymy, w większości przypadków o nieznanej roli w organizmie.
- Zrozumienie roli węzłów w procesach prowadzonych przez białka może mieć więc szczególne znaczenie przy zwalczaniu chorób, w których kluczową rolę odgrywają agregaty białkowe (np. choroba Alzheimera).

Jak w białkach definiujemy węzły?

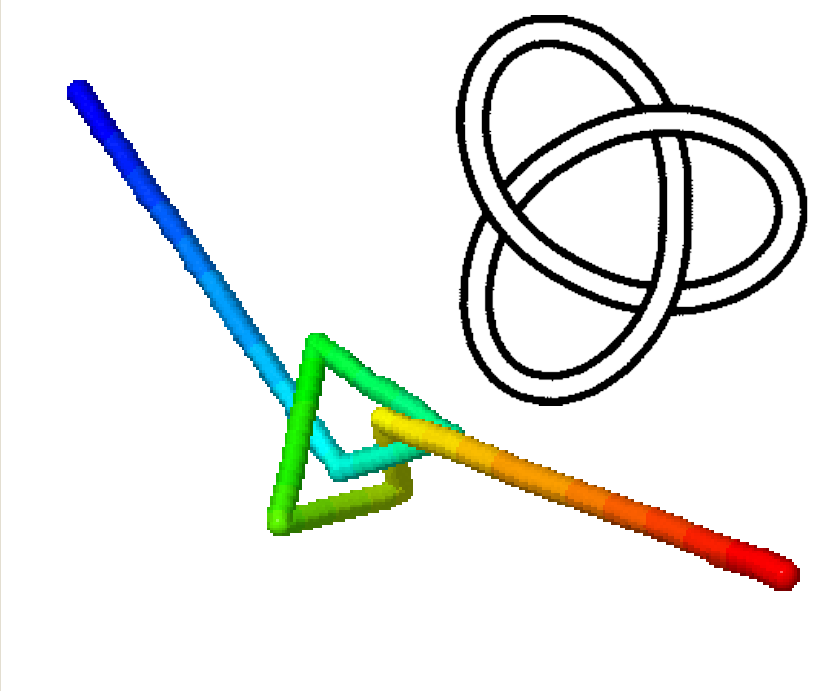
Wiadomo, że węzły (matematyczne) to zamknięte formy cykliczne, natomiast białka posiadają końce C i N zlokalizowane blisko powierzchni białka (niepołączone).



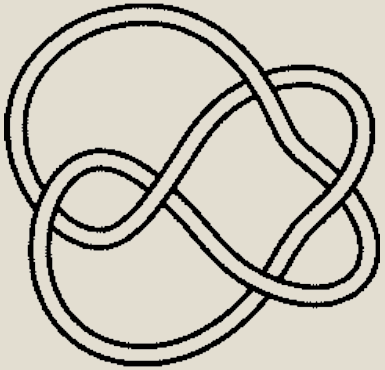
Methyltransferase Domain of Human TAR (HIV-1) RNA binding protein 1

Struktura białka

Węzeł (3_1)

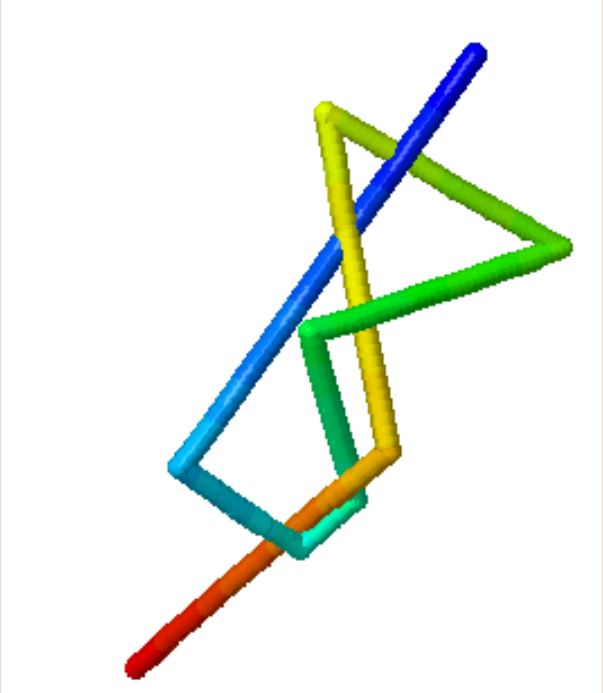


Ubihin hydrolase

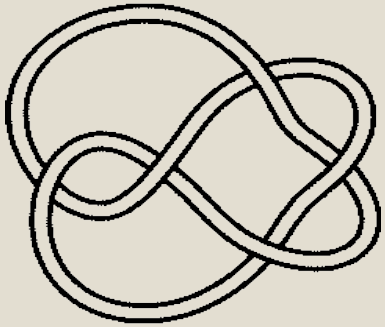


Struktura białka

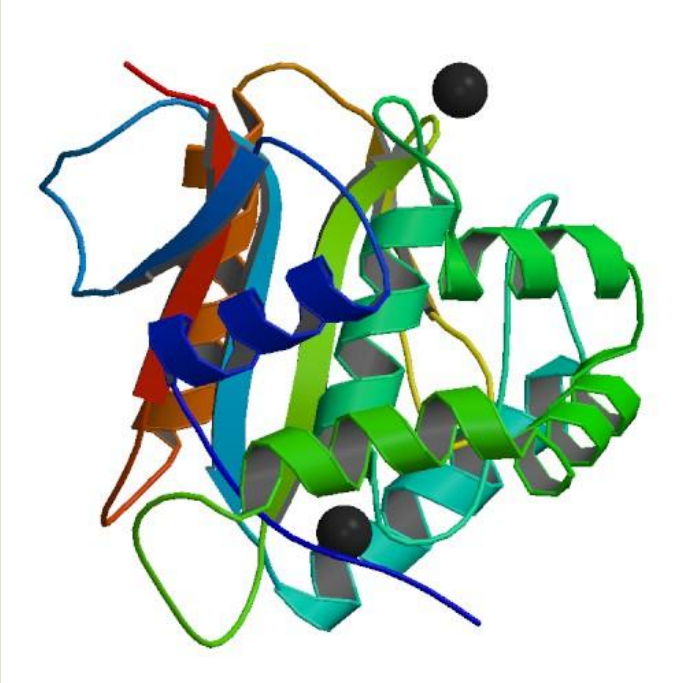
Węzeł (5_2)



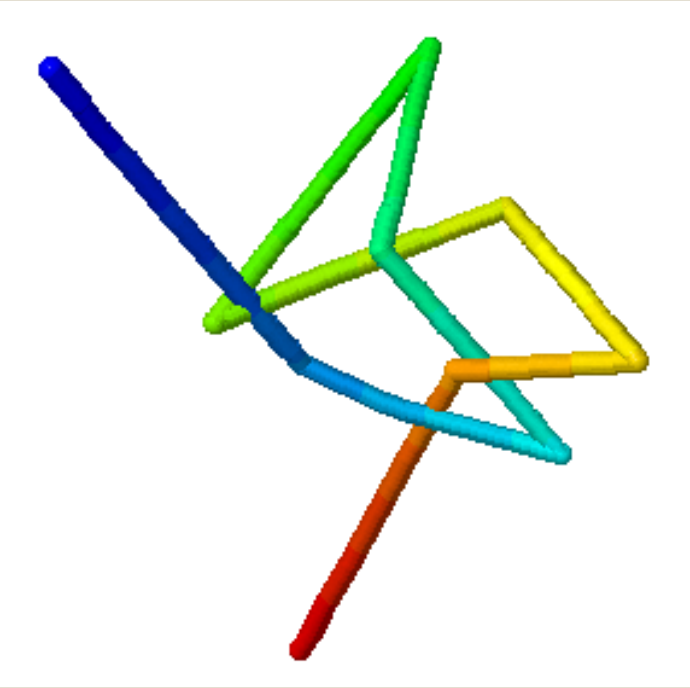
Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1)



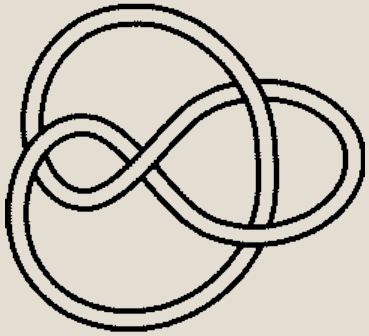
Struktura białka



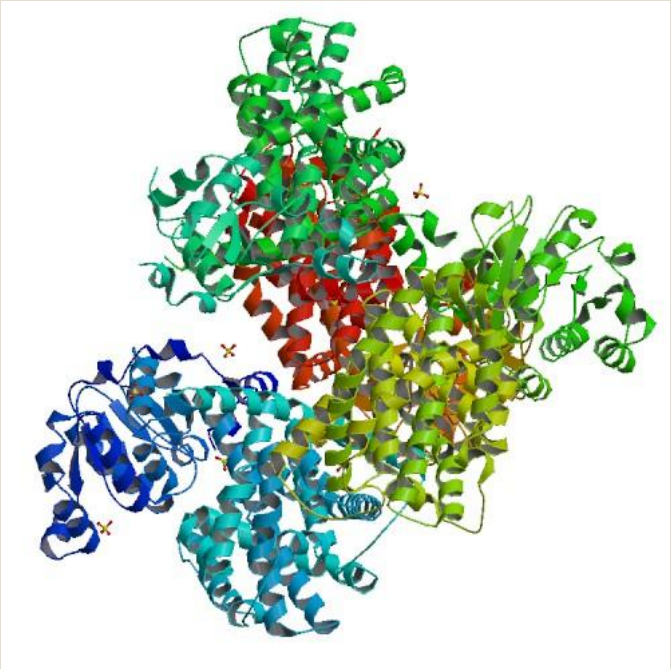
Węzeł (5_2)



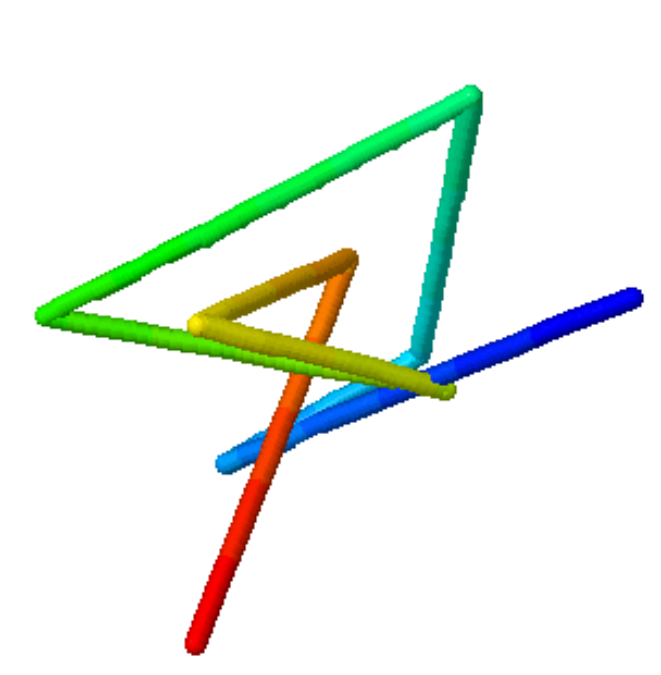
Escherichia coli ketol-acid reductoisomerase



Struktura białka



Węzeł (4_1)



Literatura

- D. Buck, K. Ishihara „Coherant band pathways between knots and links" World Scientific vol.24. 2015
- Y. Zhang, Z. Wang „Knot Theory Based on the Minimal Braid in Lorenz System". Int. J Theor Phys (2008) vol 47 s.873-880
- J.C. Misra, S. Mukherjee „A mathematical model for enzymatic action on DNA knots and links". Elsevier. Vol. 39. 2004.1423-1430
- A. Flammini, A. Martian, A.Stasiak „Simulations of Action of DNA Topoisomerases to investigate Boundaries and Shapes of Spaces of Knots". Biophysical Journal. vol 87. 2004. 2968-2975
- M. Popielarska „Projekt: matura Biologia" Wyd. Zielona Sowa.Kraków.2010
- M. Libik-Konieczny, G. Góralski, R. Konieczny „Repetytorium Biologia" Wydawnictwo Szkolne PWN. Warszawa. 2011
- http://www.eioba.pl/a/2hc1/topoizomerazy-czyli-jak-powstaje-superhelikalna-struktura-dna
- http://bioinfo.imdik.pan.pl/wiki/Topoizomeraza_typu_I
- http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,369536,polscy-badacze-na-tropie-tajemnic-wezlow-w-bialkach.html
- http://knots.mit.edu/

Anna Spytek
10B2

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ