TEORIA WĘZŁÓW W BIOLOGII

Agata Baran
Gr. 10B2

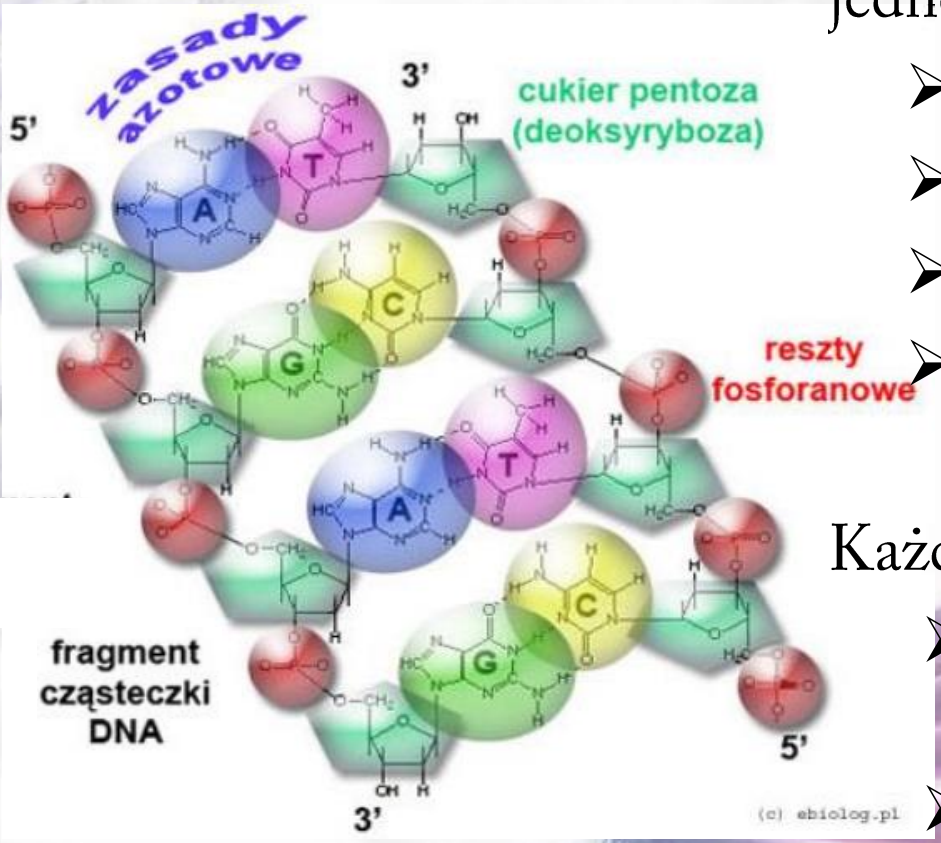
DNA- podstawowe informacje

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

- Jest nośnikiem informacji genetycznej
- Jego struktura odkryta została w 1954 r. przez dwóch uczonych: Jamesa Watsona i Francisa Cricka
- Fragment kwasu DNA tworzy gen

DNA składa się z dwóch komplementarnych nici polinukleotydowych skręconych wokół siebie w postaci podwójnej helisy.

DNA- podstawowe informacje



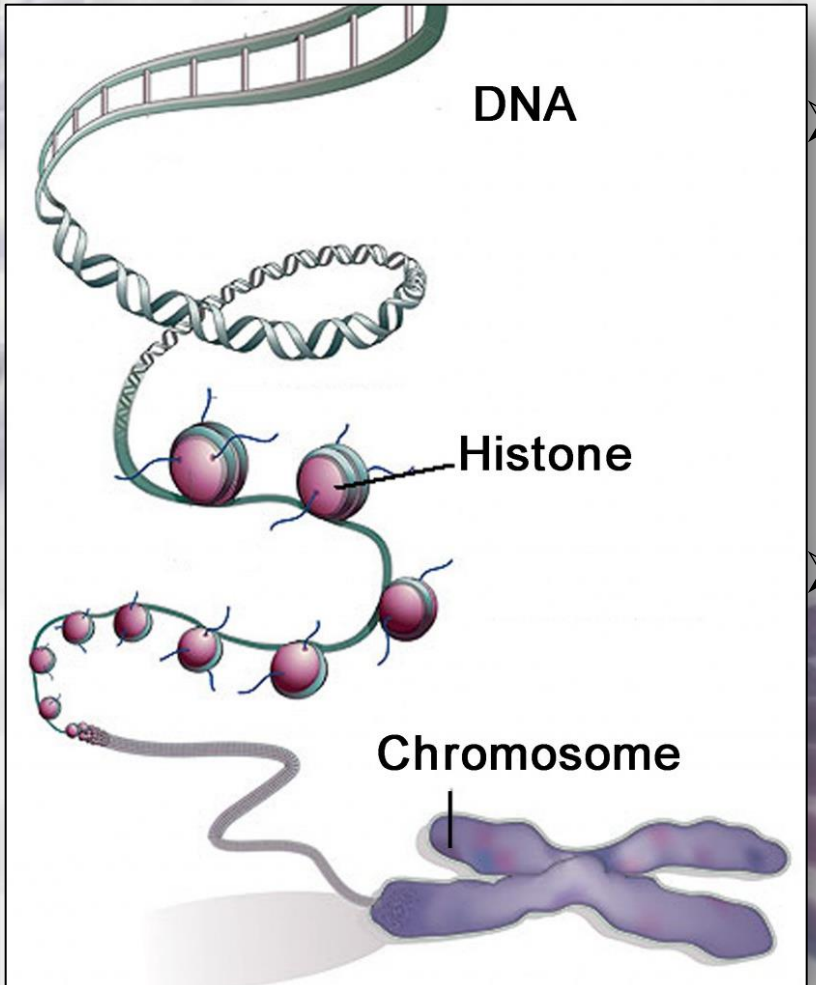
DNA zbudowany jest z 4 prostszych jednostek, zwanych **nukleotydami**:

- **adeninowego (A),**
- **tyminowego (T),**
- **guaninowanego (G),**
- **cytozynowego (C).**

Każdy nukleotyd zbudowany jest z:

- **odpowiedniej zasady azotowej (A,T,G,C),**
- **pięciowęglowego cukru (deoksyrybozy)**
- **reszty kwasu fosforowego**

DNA- podstawowe informacje



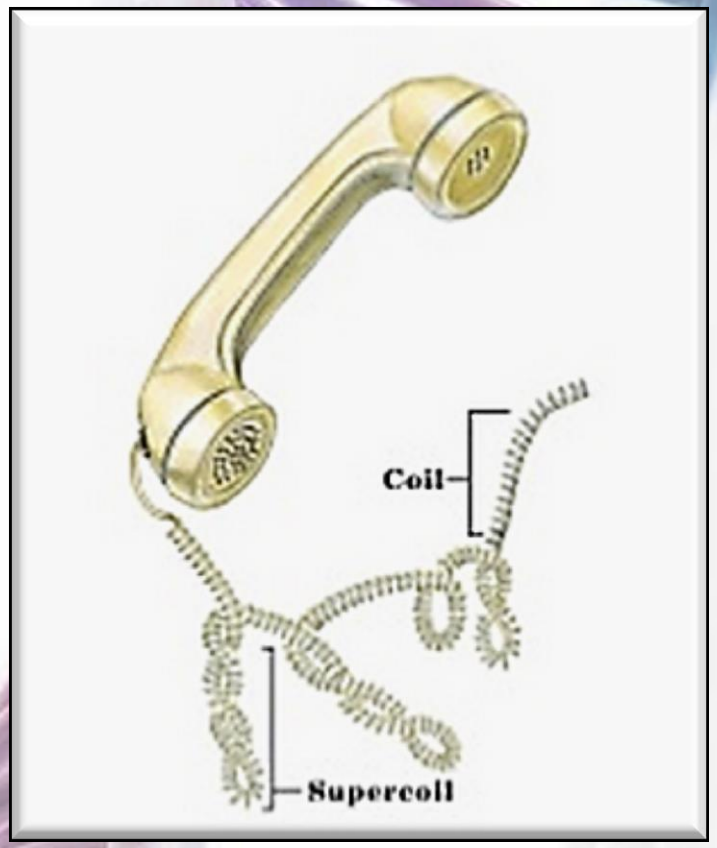
- W komórce cząsteczki DNA są upakowane w jądrze i zazwyczaj stanowią struktury niezamknięte, choć zaplecione.
- W latach siedemdziesiątych XX wieku odkryto również zamknięte cząsteczki DNA, dla których uproszczonymi matematycznymi modelami mogą być zapętlone okręgi, czyli węzły.
- Procesy replikacji i transkrypcji wymagają rozplątania DNA. Istotną rolę odgrywają w tych procesach enzymy nazywane topoizomerazami, działające miejscowo na helisę zapętlonego DNA.

Superskręty

- DNA człowieka jest bardzo długie i ściśle upakowane w jądrach komórkowych.

- Kiedy DNA jest w „stanie relaksacji", na jeden skręt przypada 10,4 zasad.

- Jeżeli DNA jest skręcane, nici zostają coraz ściślej nawinięte jak w kablu od słuchawki w starych telefonach, które zostały skręcone wokół siebie.



Postać ta nazywana jest **SUPERSKRĘTEM**

DNA - topologia

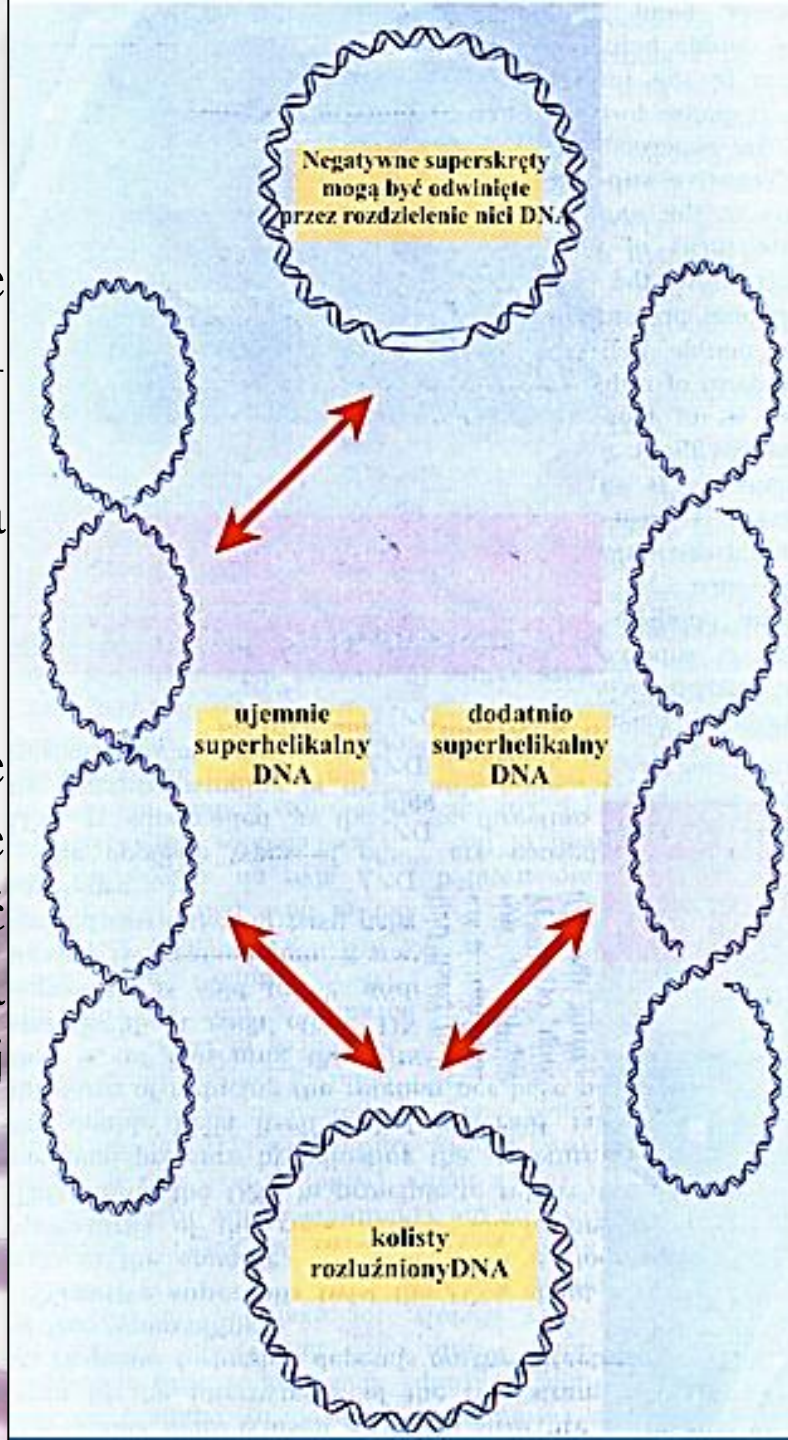
W celu pełnego zrozumienia topologii DNA, należy zapoznać się z trzema kluczowymi pojęciami matematycznymi:

- Skręt (T_w),
- Zwój (W_r),
- Liczba opleceń (L_k)

DNA - topologia

- **LICZBA SKRĘTÓW** (opisuje helikalne wzajemne skręcenie pojedynczych nici względem siebie).
- **LICZBA ZWOJÓW** (odzwierciedla zwinięcie osi dwuniciowej helisy).

Dodatnie wartości Wr są charakterystyczne dla nici zwiniętych lewoskrętnie, a ujemne dla zwiniętych prawoskrętnie. Większość natywnych superhelis DNA jest zwinięta ujemnie, ponieważ takie formy są lepiej przygotowane do replikacji.



DNA - topologia

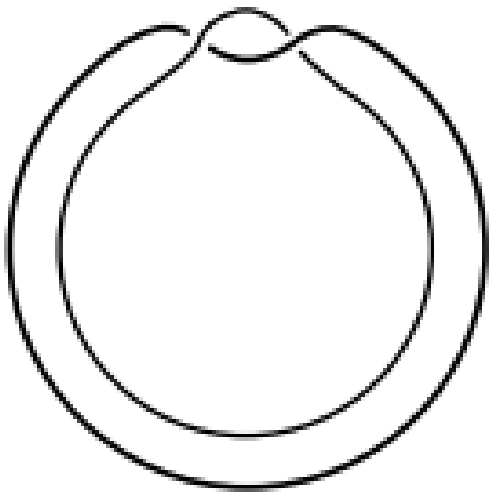
- Podstawową właściwością topologiczną cząsteczki kolistego DNA jest **LICZBA OPLECEŃ** (Lk), która określa, ile razy nić DNA owija się prawoskrętnie wokół osi helisy.
- Cząsteczki różniące się wyłącznie Lk nazywane są izomerami topologicznymi (topoizomerami).
- Są one identyczne pod względem topologicznym, lecz różne geometrycznie: mają różną liczbę skrętów, i liczbę zwojów

Liczba opleceń(zaplątania)

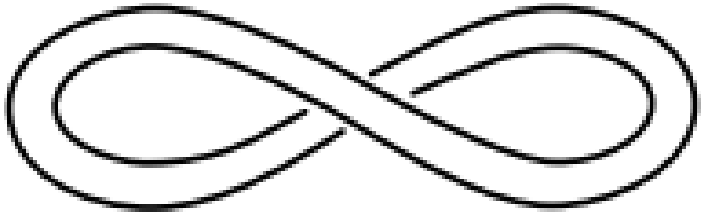
$$Lk(C,W) = Tw(R) + Wr(R)$$

Liczba opleceń

jest niezmiennikiem i jego zmiana ma bardzo istotny wpływ na strukturę cząsteczki DNA

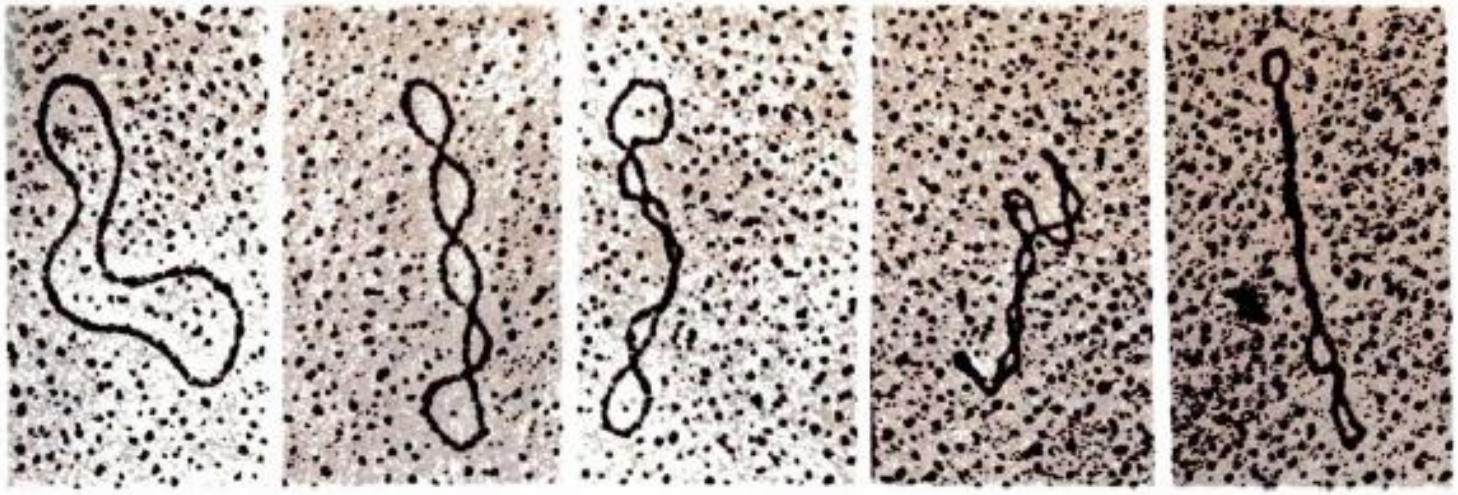


(a) $Lk(R) = -1, Tw(R) = -1, Wr(R) = 0$



(b) $Lk(R) = -1, Tw(R) = 0, Wr(R) = -1$

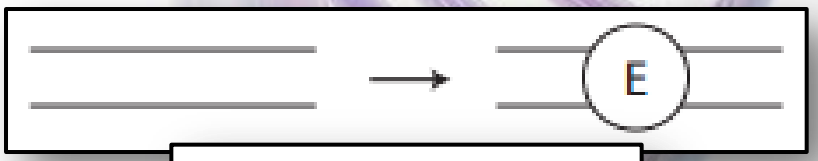
Zmiana konformacji topoizomerów jest możliwa tylko przez rozcięcie jednej lub dwóch nici i ponowne ich połączenie, co odbywa się dzięki obecności enzymów.



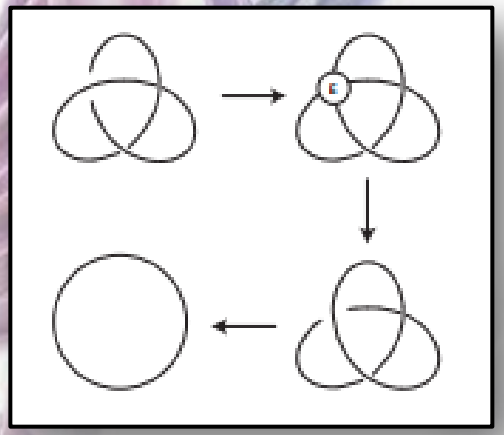
Mikrografie elektronowe kolistego DNA pokazujące stopień skręcenia: od całkowicie zrelaksowanej (pierwsza z lewej) do ciasno skręconej (pierwsza z prawej).

Enzymy mogą manipulować cząsteczką DNA na kilka sposobów:

- Mogą one powodować zwijanie się DNA (superskręty) **(a)**
- Mogą zmienić rodzaj przejścia na skrzyżowaniu (tunel↔ most) **(b)**
- Mogą rozdzielić nici DNA i połączyć je do innych końców **(c)**

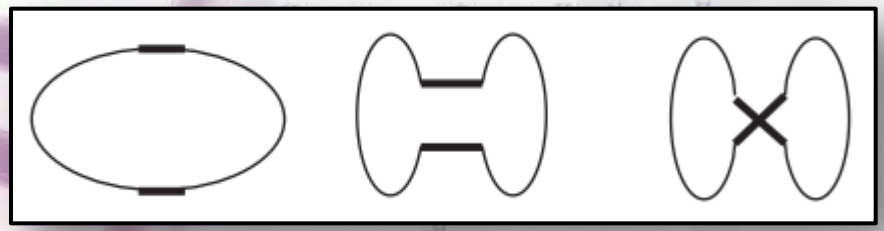


(a)

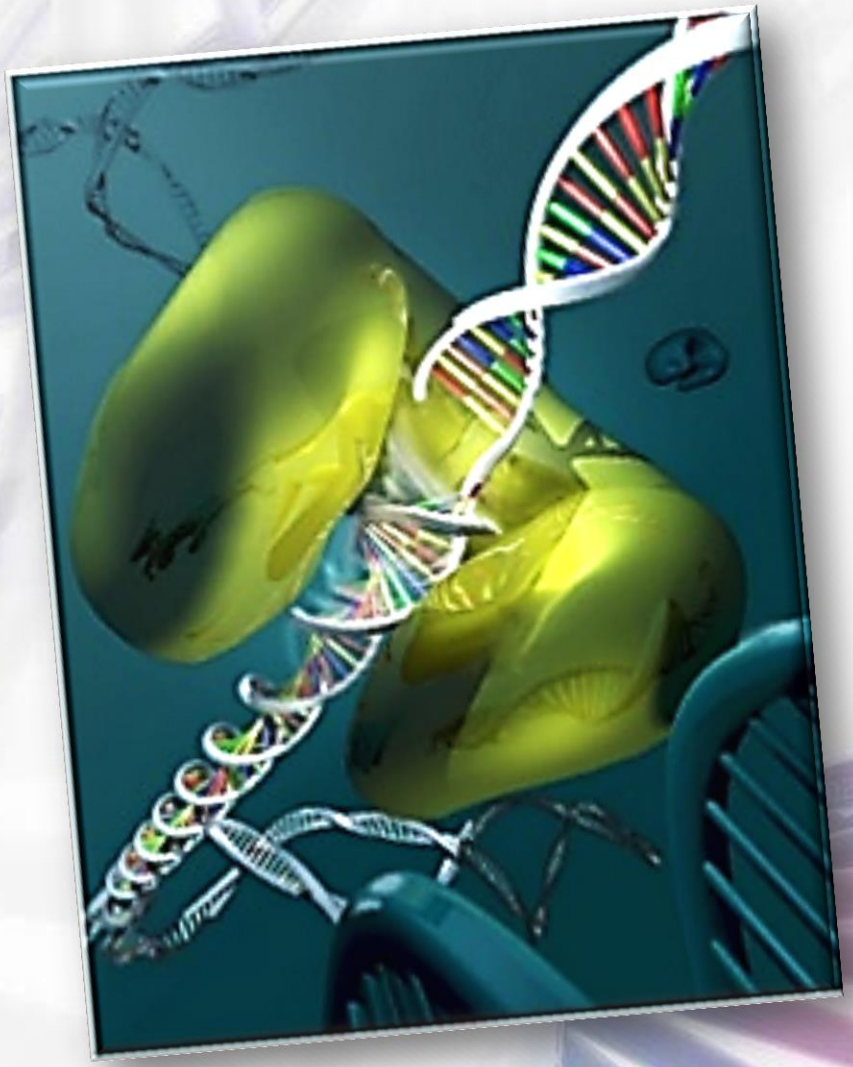


(b)

(c)



Topoizomeraza

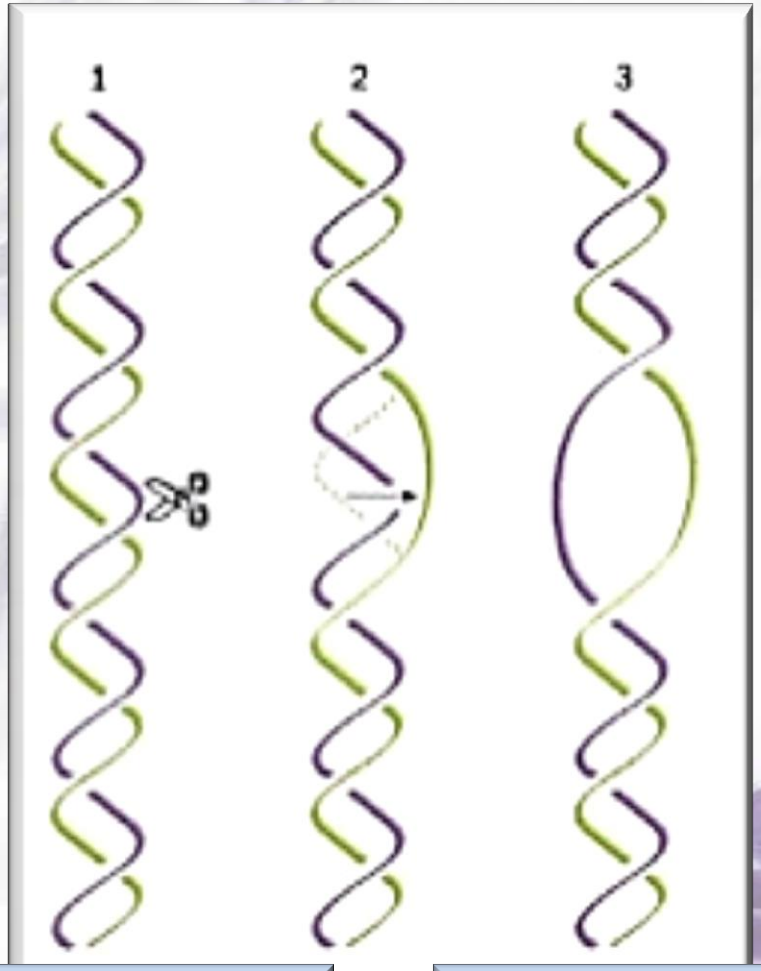


Topoizomerazy – grupa enzymów biorących udział w replikacji, gdzie odpowiadają za stopień skręcenia podwójnej helisy

In vivo topoizomerazy rozplatają podwójną helisę DNA, udostępniając w ten sposób matrycę dla enzymów replikacyjnych lub transkrypcyjnych.
W zależności od liczby rozrywanych jednorazowo wiązań fosfodiestrowych wyróżnia się:

- **topoizomerazy I**, hydrolizujące jednego wiązania
- **topoizomerazy II**, hydrolizujące dwa wiązania

Topoizomeraza I



Podwójne DNA
n skrętów

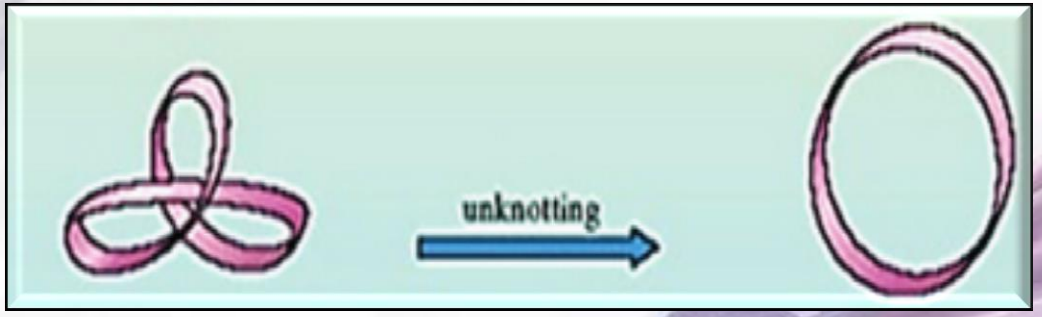
Podwójne DNA
n -1 skrętów

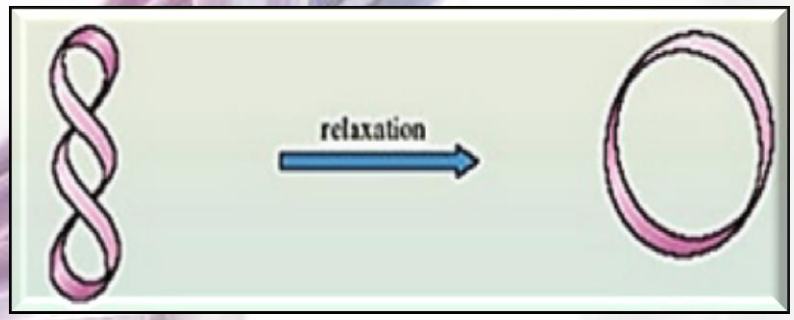
- Topoizomerazy klasy I rozwiązują problem naprężeń spowodowanych w trakcie zwijania i rozwijania DNA
- Enzym owija się wokół helisy DNA i nacina tylko jedną z jej nici. Później, utrzymując się w miejscu uszkodzenia, pozwala helisie wirować. Znosi to naprężenia wynikające z jej zwinięcia.
- Gdy struktura jest już rozluźniona, topoizomeraza łączy przecięty łańcuch, przywracając pierwotną strukturę podwójnej helisy DNA

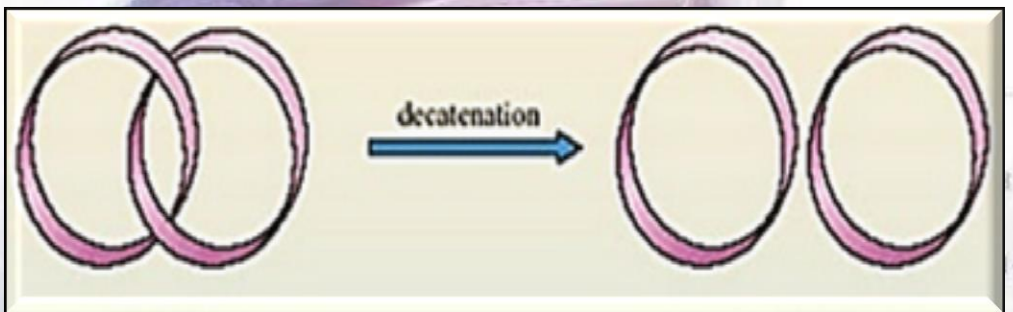
Topoizomeraza II

Topoizomerazy klasy II są wyspecjalizowane w rozplątywaniu DNA w jądrze komórkowym. Podczas rozdzielania dwóch kopii każdego z chromosomów fragmenty dwóch siostrzanych chromosomów mogą się splątać razem, co powoduje, że po podziale ciągle są ze sobą połączone.

Topoizomerazy klasy II rozwiązują ten problem przez umożliwienie jednej helisie DNA przejścia przez inną helisę poprzez przecięcie obu łańcuchów jednej helisy DNA. Na końcu łączą ze sobą rozcięte końce i przywracają ciągłość nici DNA.







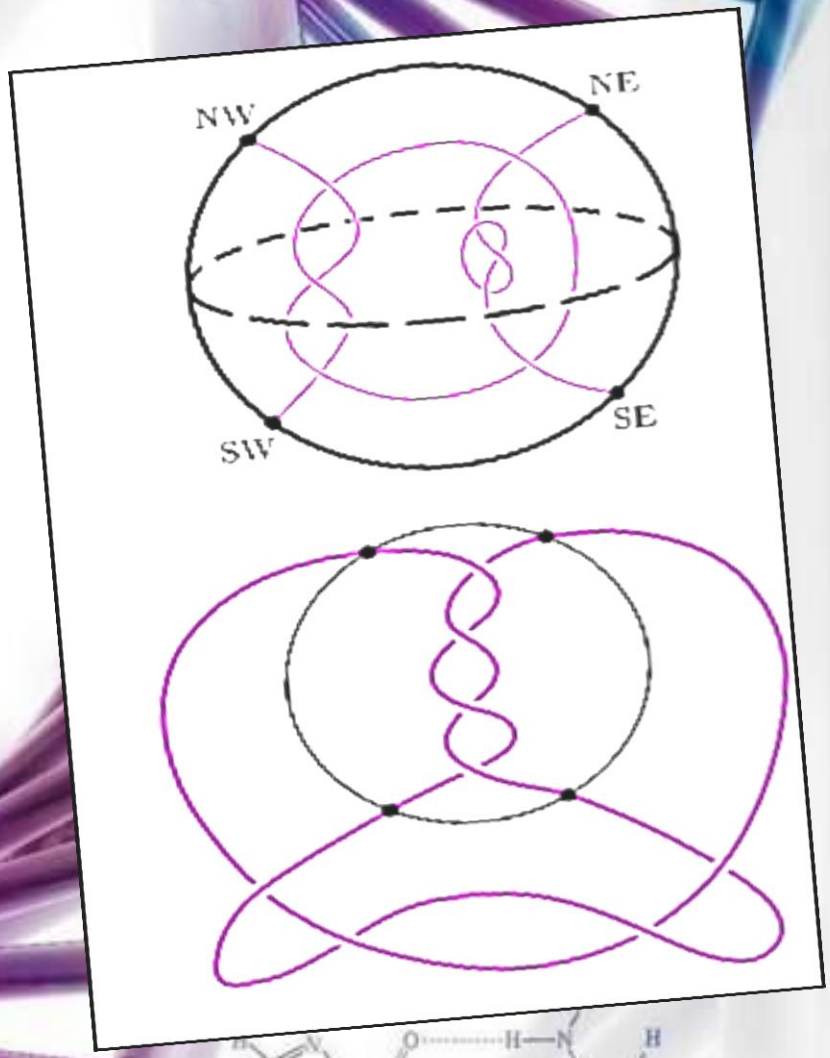
Wiemy już, że …

- Różne procesy zachodzące w komórce wymagają rozplecenia cząsteczek DNA.
- Istotną rolę odgrywają w tych procesach enzymy nazywane topoizomerazami, działające miejscowo na helisę zapętlonego DNA.

Do lepszego zrozumienia tychże procesów pomocna jest wiedza z zakresu równań supłowych.

Supły

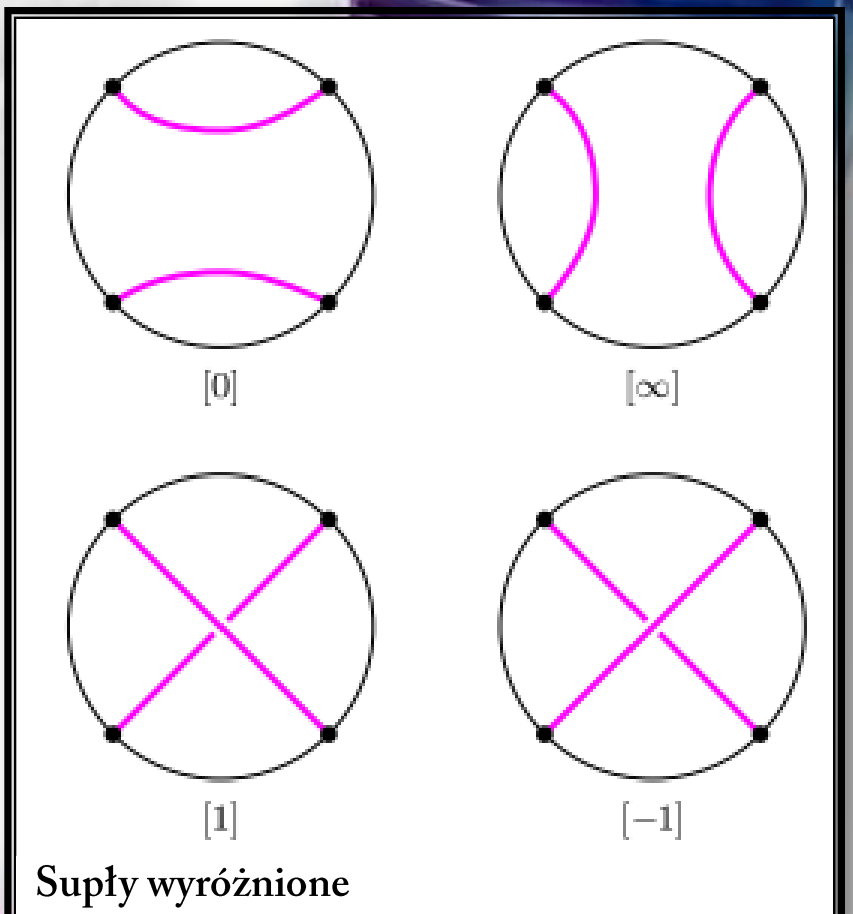
- Supeł jest fragmentem węzła lub splotu. Wycinając z węzła jego kawałek o czterech końcach dostajemy właśnie supeł. Bardziej precyzyjnie: wybierzmy na sferze (np. jednostkowej) cztery punkty leżące na jednym okręgu. Nazwijmy je **NW, NE, SE, SW** – jak w kompasie.
- Dwie krzywe w kuli ograniczonej przez tę sferę o końcach w wyróżnionych punktach tworzą właśnie supeł.



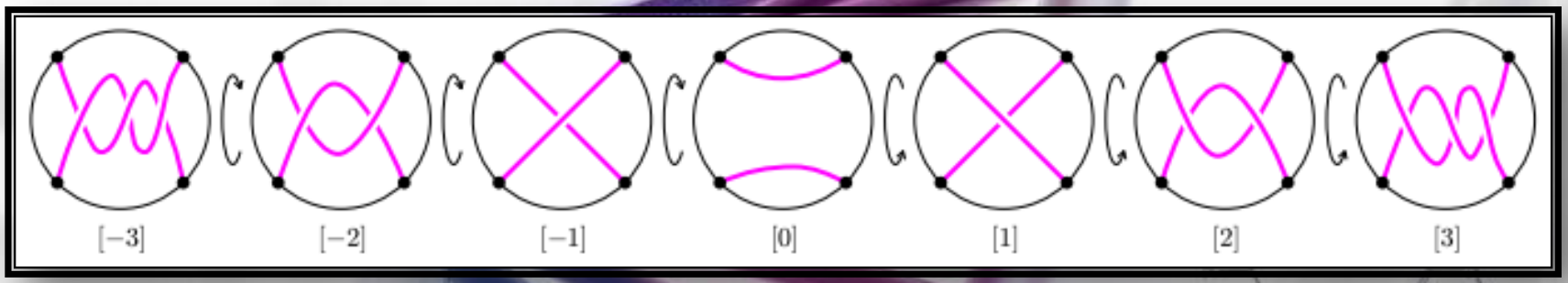
Przedstawienie supła w sferze i w węźle

Supły

- Najprostsze są następujące supły, które będziemy oznaczać odpowiednio [0], [∞], [1] i [−1].
- Pierwsze dwa z nich to tzw. supły trywialne.

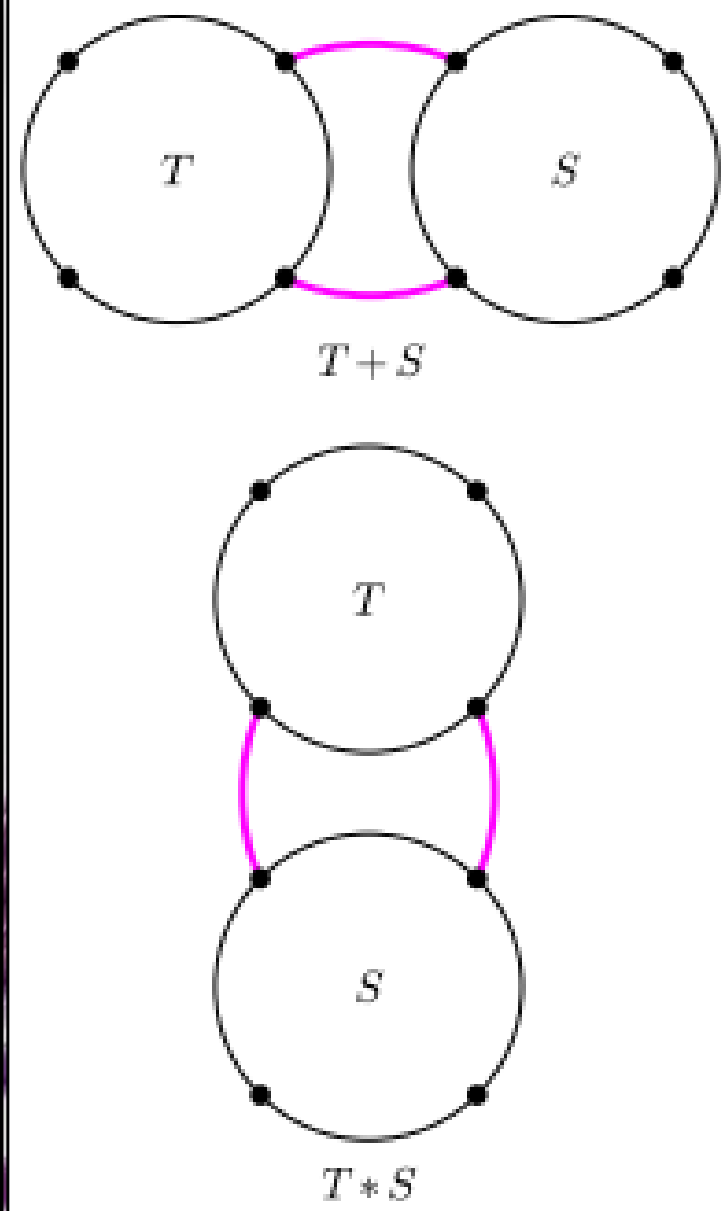


Supły wyróżnione



Supły

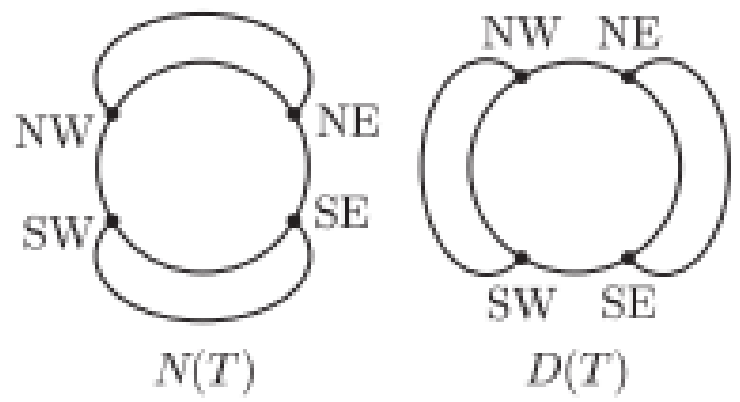
- Supły możemy dodawać i mnożyć.
- Suma **T + S** powstaje z supłów **T i S** przez połączenie końców **NE** i **SE** supła **T** odpowiednio z końcami **NW** i **SW** supła **S**.
- Natomiast iloczyn **T ∗ S** tworzymy przez połączenie końców **SW** i **SE** supła **T** z końcami odpowiednio **NW** i **NE** supła **S**.



Suma i iloczyn supłów

Supły

- Na bazie supła T konstruujemy dwa węzły lub sploty: łącząc końce NW i NE oraz SW i SE dostaniemy węzeł (splot) oznaczany N(T), a łącząc końce NW z SW oraz NE z SE otrzymamy węzeł (splot) D(T).
- Jeśli w wyniku tych operacji powstaje splot, to on ma zawsze dwa ogniwa, gdyż mamy do dyspozycji cztery końce.



Konstrukcje N(T) i D(T)

Cząsteczka DNA przed działaniem enzymu, czyli substrat może być opisana za pomocą zależności

N(S + T) = substrat

Gdzie:
S jest fragmentem DNA, na który nie działa enzym,
T częścią podlegającą działaniu enzymu.

W wyniku działania enzymu dostajemy produkt, który też można opisać za pomocą równania

N(S + R) = produkt

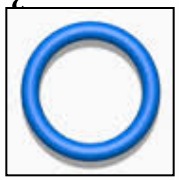
Gdzie:
R jest fragmentem (supłem) DNA po działaniu enzymu

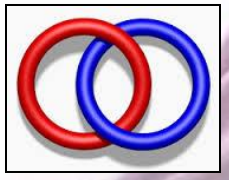
W praktyce znany jest zazwyczaj substrat i produkt, a supły S, T i R nie są znane. Istnieje jednak możliwość ich wyznaczenia dla specjalnych enzymów przy pewnych dodatkowych założeniach.

Oto przykład twierdzenia dla enzymu nazwanego Tn3 rezolwazą.

TWIERDZENIE

Niech supły S, T i R spełniają następujące równania

1) N(S + T) = C(1) (węzeł trywialny), 

2) N(S + R) = C(2) (splot Hopfa), 

3) N(S + R + R) = C(2, 1, 1) (węzeł ósemkowy).

Wtedy pary {S, R} – rozwiązania powyższych równań są następujące: {(−3, 0,(1)}, {(3, 0),(−1)}, {(−2, −3, −1),(1)} oraz {(2, 3, 1),(−1)}. Podobnych twierdzeń dla różnego typu komórek i enzymów można sformułować więcej. Ich dowody wykorzystują wiedzę z zakresu ogólnej teorii równań supłowych.

Ponieważ nie ma w chwili obecnej bezpośredniej metody obserwacji dla działania enzymów, trzeba polegać na metodach pośrednich.

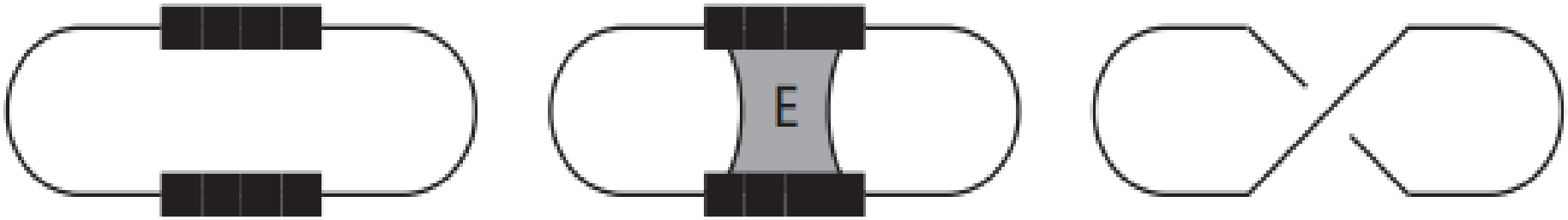
Rekombinacja miejscowa

Jednym z głównych zastosowań teorii węzłów w biologii molekularnej jest proces **REKOMBINACJI GENETYCZNEJ**

Rekombinacja specyficzna miejscowo jest jednym ze sposobów, w którym natura zmienia kod genetyczny organizmu:

- przesuwając blok DNA do innej pozycji w cząsteczce
- poprzez włączenie bloku obcego DNA do genomu gospodarza.

- Enzym, który pośredniczy w rekombinacji specyficznej miejscowo to rekombinaza
- Rekombinacja ma miejsce na krótkim odcinku (10-15 par zasad) podwójnej nici DNA, których sekwencja jest rozpoznawana przez rekombinazę.
- Cząsteczka DNA połączona z enzymem nazywana jest **KOMPLEKS SYNAPTYCZNY**



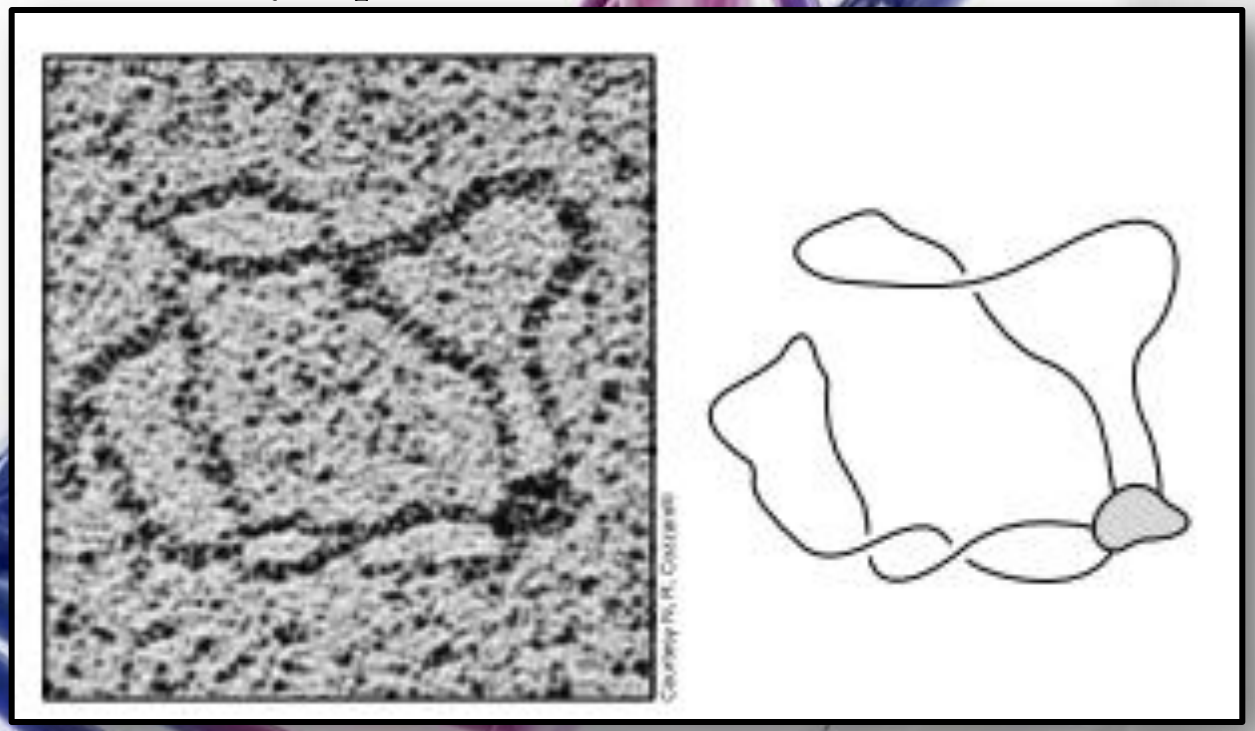
SUBSTRAT

KOMPLEKS SYNAPTYCZNY

PRODUKT

Rekombinacja miejscowa

- Zdjęcie mikroskopu elektronowego przedstawia synaptyczny kompleks utworzony przez enzym TN3 resolwaza w reakcji z rozplecioną dwuniciową kolistą cząsteczką DNA.
- Synaptosom na zdjęciu jest czarnym punktem przyłączonym do DNA, a niezwiązane przez enzym DNA tworzy na zewnątrz synaptosomu skręcone pętle.



Obserwacja geometrii i topologii produktów reakcji rekombinacji

Badania in vitro zwykle przebiegają w następujący sposób:

- Przygotowanie kolistych cząsteczek DNA jako substratów, przy czym wszystkie cząsteczki reprezentują ten sam typ węzła (zwykle ujemnie superskręcone węzły trywialne).

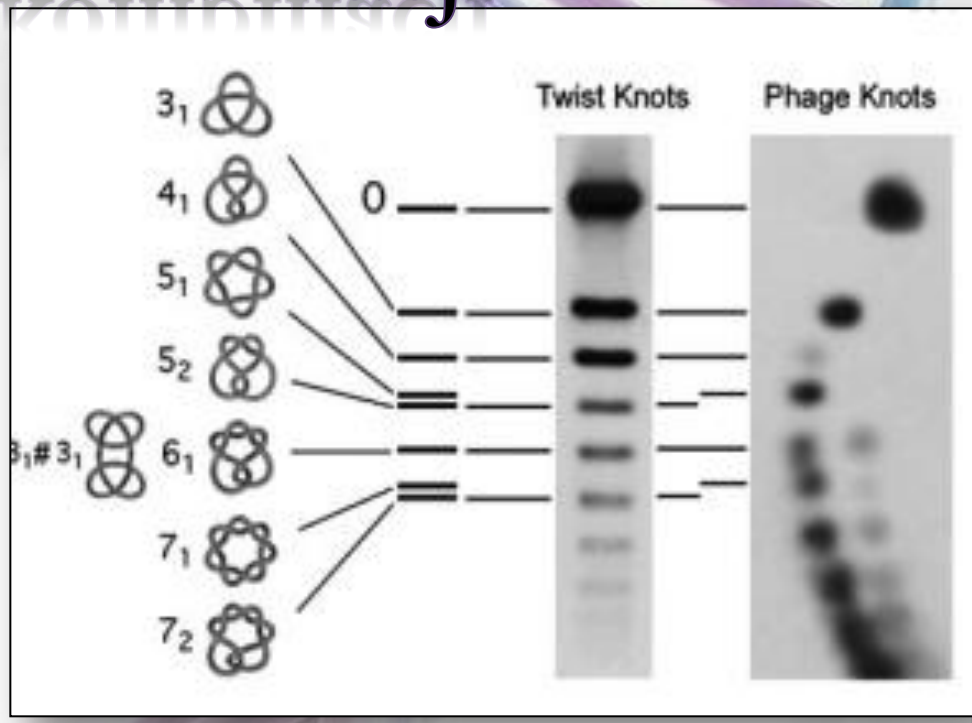
- Substraty poddaje się reakcji w warunkach in vitro z wysokim stężeniem oczyszczonego enzymu, a produkty reakcji rozdziela się metodą elektroforezy żelowej.

Obserwacja geometrii i topologii produktów reakcji rekombinacji

W odpowiednich warunkach tj:

- gęstość żelu
- przyłożone napięcie

cząsteczki DNA migrują w żelu z prędkością determinowaną przez liczbę skrzyżowań na węzłach i splotach

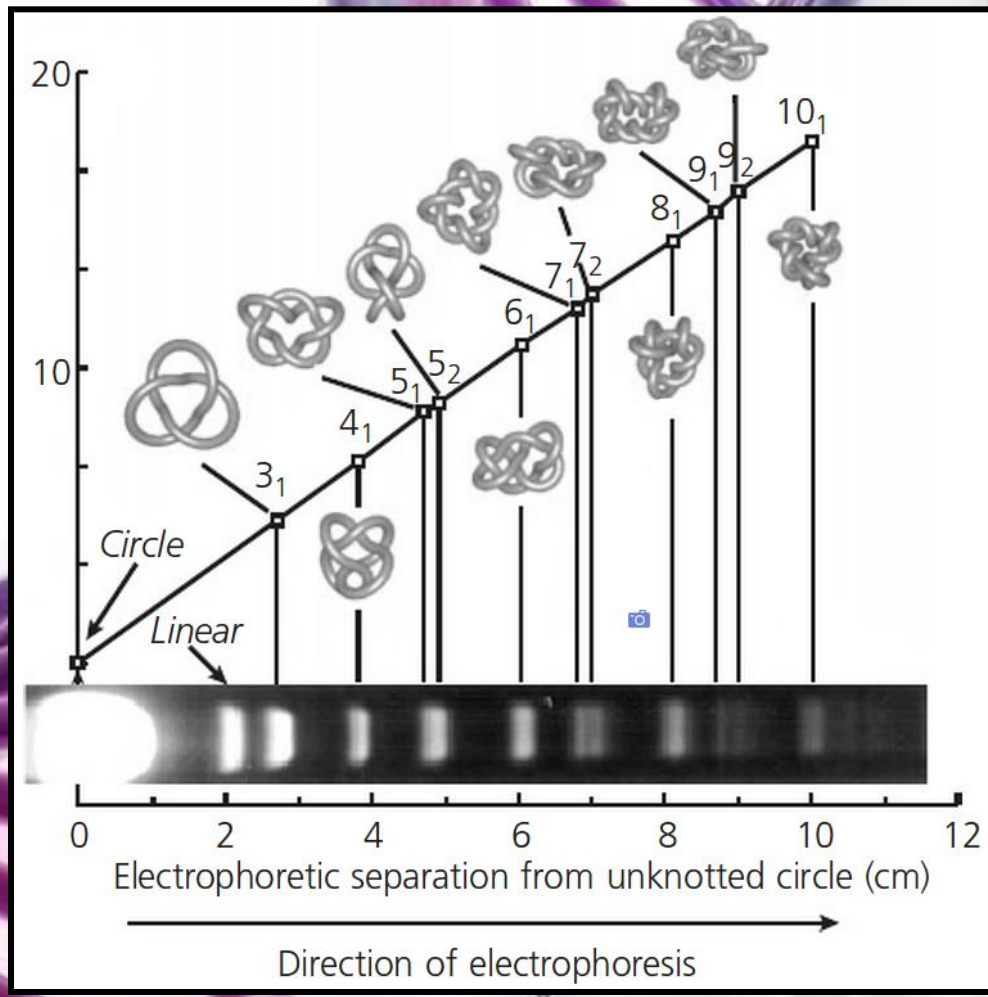


Węzły i sploty z tą samą liczbą skrzyżowań migrują z tymi samymi prędkościami w żelu

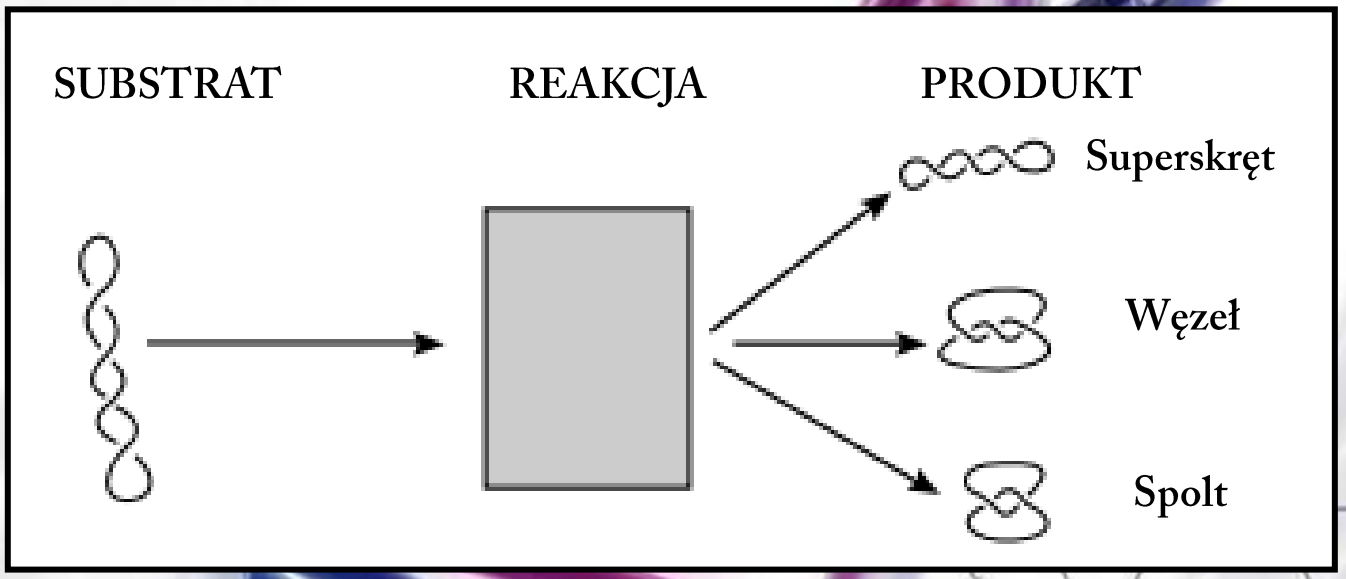
Obserwacja geometrii i topologii produktów reakcji rekombinacji

Po przejściu przez żel, cząsteczki DNA mogą być usunięte, a następnie pokryte białkiem A Rec.

Jest to nowa technika obserwacji mikroskopii elektronowej, pozwala wyszczególnić węzły i zanalizować teoretycznie produkty reakcji



Obserwując zmiany w geometrii i topologii DNA spowodowanych przez enzym, możemy opisać mechanizm działania enzymu



Dziękuję za uwagę

Literatura

- JANIAK-OSAJCA, Agnieszka; GÓRA, Zielona. Węzły, supły i ułamki.
- https://www.rose-hulman.edu/mathjournal/archives/2006/vol7-n1/paper13/v7n1-13pd.pdf
- http://www.slideshare.net/teresarothaar/applications-of-knot-theory-to-dna
- http://rcin.org.pl/Content/7741/WA336_15601_O-B326-11_Hyz.pdf
- http://www.mimuw.edu.pl/delta/artykuly/delta1204/arytmetyka.pdf
- http://www.ams.org/notices/199505/sumners.pdf