

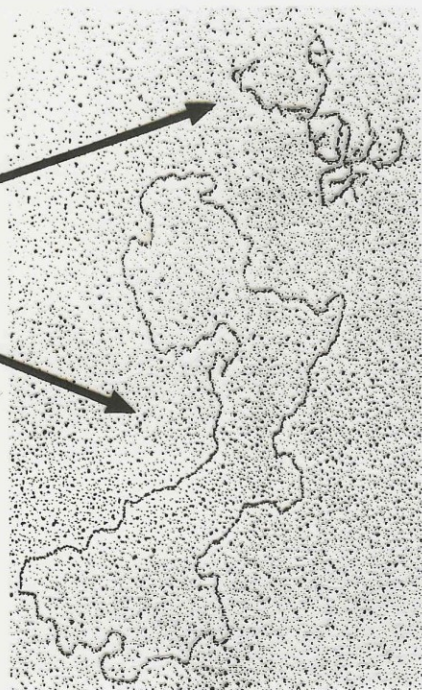
# Superhelicitita DNA

**Vinograd 1965:** kružnicová DNA některých virů existuje ve dvou formách, kompaktní **formě I** (tj. **nadšroubovicová, superhelikální**) a méně kompaktní **formě II** (**relaxovaná, obvykle otevřená kružnicová**)

(na základě sedimentačních měření)

Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R. & Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA.

*Biochemistry* 53, 1104-1111.



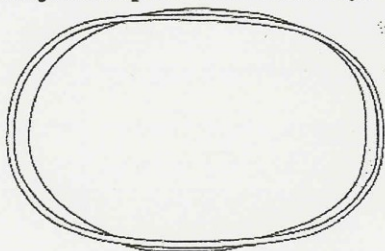
**Superhelicitita je vlastnost molekul DNA, které nemají volné konce** a jejich řetězce tudíž nemohou okolo sebe

volně rotovat, tj.

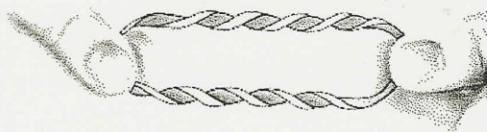
a. kovalentně uzavřené kružnicové molekuly (plasmidy, fágové DNA)

b. lineární molekuly s fixovanými konci (např. segmenty eukaryotních chromozómů připojené na jaderné proteinové struktury)

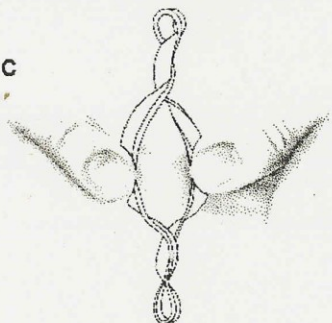
A



B



C



Molekula DNA má mechanické vlastnosti, které lze modelovat např. proužkem gumy:

-má určitou elasticitu vůči

1. torznímu zkrutu (twist,  $T_w$ )
2. zakřivení osy, ohybu (writhe,  $W_r$ )
- (a také 3. délce hlavní osy)

v relaxovaném stavu má snahu zaujmout (obecně) napříměný tvar a „twist“ (a délku) daný parametry dvoušroubovice v příslušném prostředí

pokud je **topologicky omezena** (tj. nemá volné konce - alespoň jeden jednořetězcový zlom) a liší se některým parametrem ( $T_w$ ,  $W_r$ ) od relaxované DNA, mluvíme o superhelikální DNA

twist  
počet závitů dvoušroubovice

$$Lk = Tw + Wr$$

linking number

- „molekulární číslo překřížení“  
- kolikrát protne jeden řetězec druhý, když molekula leží v rovině

writhe

charakterizuje zakřivení osy dvoušroubovice v prostoru (počet nadšroubovicových závitů)

v relaxované molekule DNA v B formě o délce N párů bazí je

$$Lk = N/10.5 = Lk_0$$

v kovalentně uzavřené molekule je Lk konstantní (lze ho změnit jen při

přerušení alespoň jednoho řetězce) a nemusí být rovno  $Lk_0$  :

superhelikální DNA je míněna molekula DNA, pro kterou  $Lk \neq Lk_0$

potom  $Lk - Lk_0 = \Delta Lk$  charakterizuje stupeň superhelicity;

obvykle se normalizuje velikostí molekuly do tvaru  $\Delta Lk/Lk_0 = \sigma$

(nadšroubovicová hustota)

Podobně se dají vyjádřit odděleně difference obou složek Tw a Wr od hodnot odpovídajících relaxované molekule:

$$Tw - Tw_0 = \Delta Tw$$

$$Wr - Wr_0 = \Delta Wr$$

změna mol. čísla  
překřížení

změna zakřivení osy  
dvoušroubovice

potom

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$$

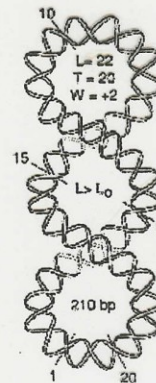
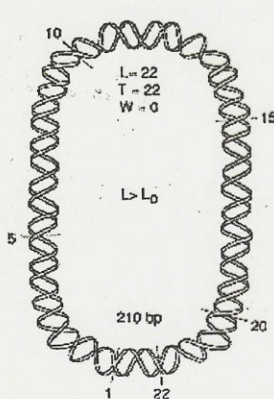
změna počtu závitů  
dvoušroubovice

☞ **superhelicita** ( $\Delta Lk$ ) vyvolává „pnutí“ v molekule DNA, které má tendenci se kompenzovat změnou její **sekundární** ( $\Delta Tw$ ) a/nebo **terciární** ( $\Delta Wr$ ) struktury

# Pozitivně superhelikální DNA

molekula o délce 210 bp

$$Lk = 22, \Delta Lk = 2$$



$$T_w = 22, \Delta T_w = 2$$

$$W_r = 0, \Delta W_r = 0$$

$$T_w = 20, \Delta T_w = 0$$

$$W_r = 2, \Delta W_r = 2$$

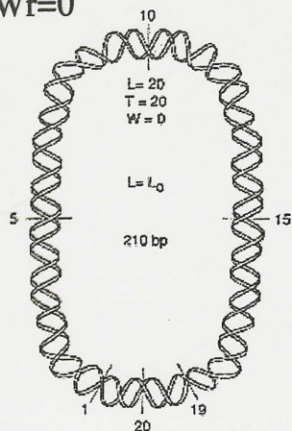
## Relaxovaná DNA

molekula o délce 210 bp

$$Lk = Lk_0 = 210/10.5 = 20$$

$$T_w = 20$$

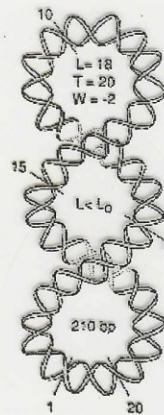
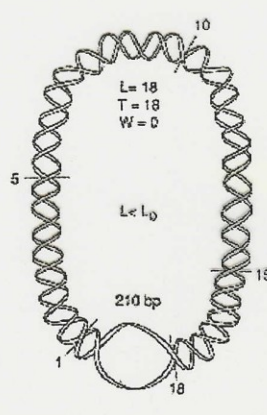
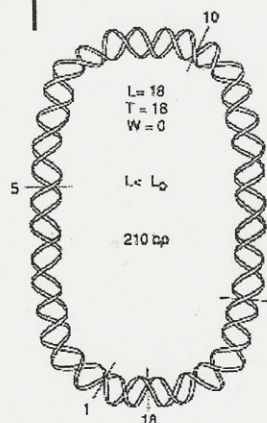
$$W_r = 0$$



## Negativně superhelikální DNA

molekula o délce 210 bp

$$Lk = 18, \Delta Lk = -2$$



$$T_w = 18, \Delta T_w = -2$$

$$W_r = 0, \Delta W_r = 0$$

$$T_w = 18, \Delta T_w = -2$$

$$W_r = 0, \Delta W_r = 0$$

$$T_w = 20, \Delta T_w = 0$$

$$W_r = -2, \Delta W_r = -2$$

*V reálných případech dochází k distribuci  $\Delta Lk$  mezi  $\Delta T_w$  a  $\Delta W_r$  a k současným změnám celkové a lokální struktury*

změněn počet závitů dvoušroubovice průměrně podél celé molekuly (tj. torzní úhel u mezi každými dvěma báry bazí)  
=> změna celkové sekundární struktury

lokální změna sekundární struktury: ve zbytku molekuly zůstává „normální“ B-forma

změna terciární struktury: zůstává B-forma dvoušroubovice; to je umožněno zakřivením její

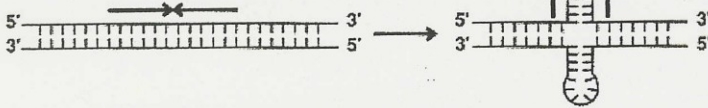
# Otevřené lokální struktury

-“otevřené“, protože jsou charakterizovány sníženým „twistem“ DNA (jsou vzhledem k B-formě DNA odvinuté) a mohou obsahovat nespárované nukleotidy (i denaturační bublina je otevřená lokální struktura)

-proto jsou stabilizovány/indukovány **negativní superhelicitou**:

tím, že odpovídají **nižší Tw**, absorbují negativní superhelicitu

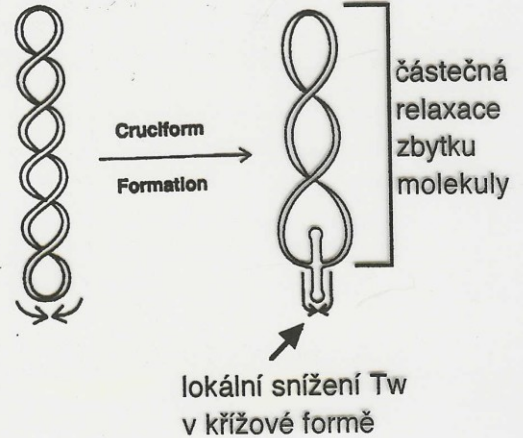
-vyžadují **určité typy sekvencí DNA**



**Křížová forma** DNA může být vytvořena převráceně repetitivní sekvencí

(tj. tam, kde určitý úsek DNA na jednom řetězci je od středu sám sobě komplementární a může vytvořit vlásenku)

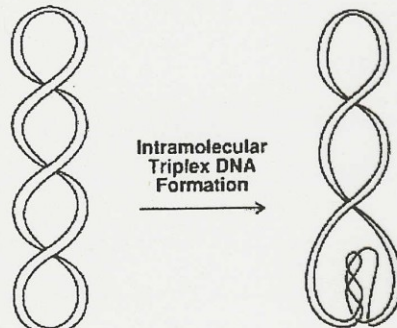
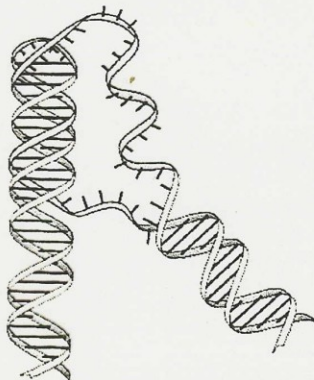
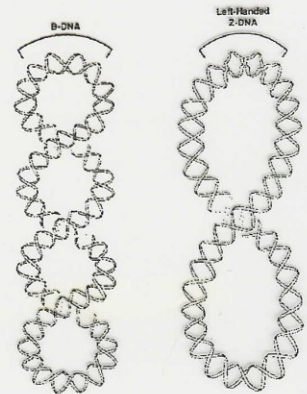
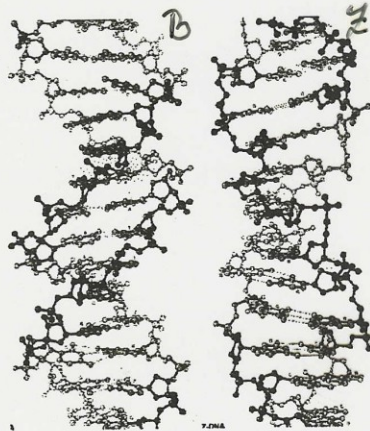
-každých **10 bp** křížové formy relaxuje přibližně **1** nadšroubovicový závit (topologicky je ekvivalentní denaturační bublině ve stejné sekvenci)



**Levotočivá Z-forma** DNA může být vytvořena střídavou (PuPy)<sub>n</sub> sekvencí

(nejlépe GC, ale i AT i smíšené)

-každých **10 bp** v **Z**-formě relaxuje přibližně **2** nadšroubovicové závity (~jeden na odvinutí pravotočivé B-DNA a druhý na vytvoření levotočivé Z-DNA)



**Intramolekulární triplex(formy H, H\*..)**

DNA může být vytvořen (Pu)<sub>n</sub>(Py)<sub>n</sub> sekvencí se zrcadlovou symetrií (tak, aby se mohly vytvořit Hoogstenovy triády bází TAT, C<sup>+</sup>GC, GGC nebo AAT)

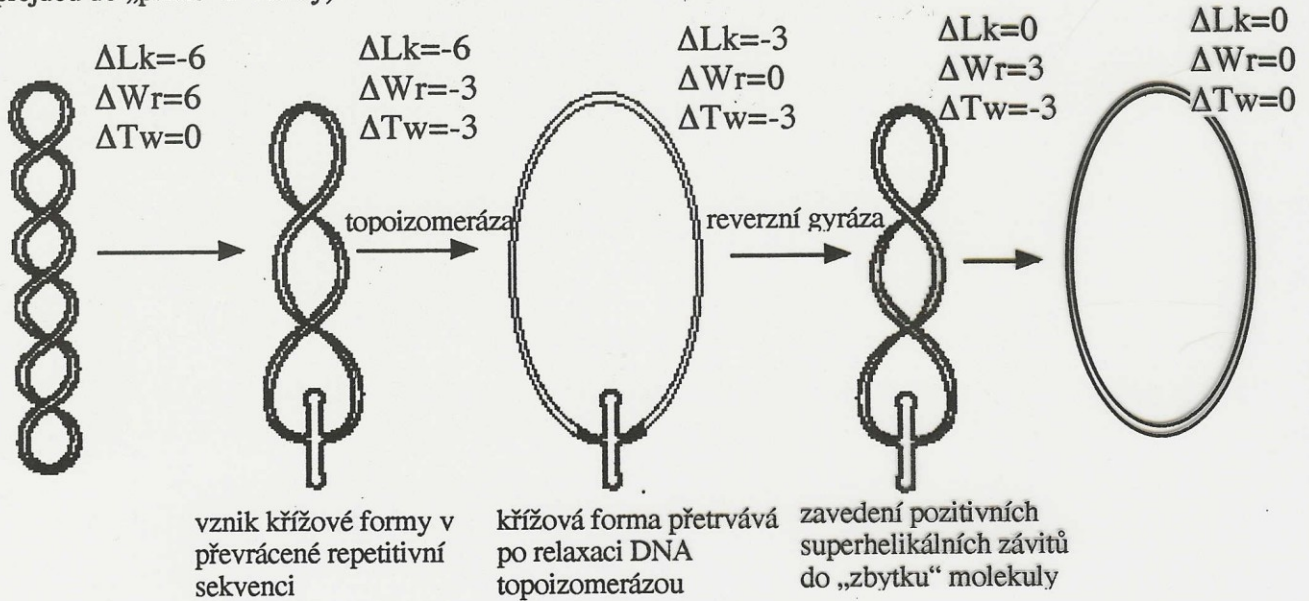
-každých **10 bp** triplexu relaxuje přibližně **1** nadšroubovicový závit (topologicky přibližně ekvivalentní denaturační bublině)

# Pozitivní superhelicitita je spojena s větším „twistem“ dvoušroubovice

☞ *znesnadňuje* denaturaci DNA (možný smysl pozitivních nadšroubovic u hypertermofilů)

☞ *znevýhodňuje* vznik lokálních otevřených struktur

☞ *ruší je* (např. křížové formy, které existují v relaxované DNA, zavedením pozitivní superhelicity přejdou do „přímé“ B-formy)



☞ při dostatečně pozitivní  $\Delta Lk$  může dojít v určitých sekvencích ke vzniku nekomplementární dvoušroubovice (např. z „nepohyblivých“, nesymetrických křížových struktur)

tento úsek není tvořen komplementární sekvencí => normálně tato lineární struktura nevznikne

```

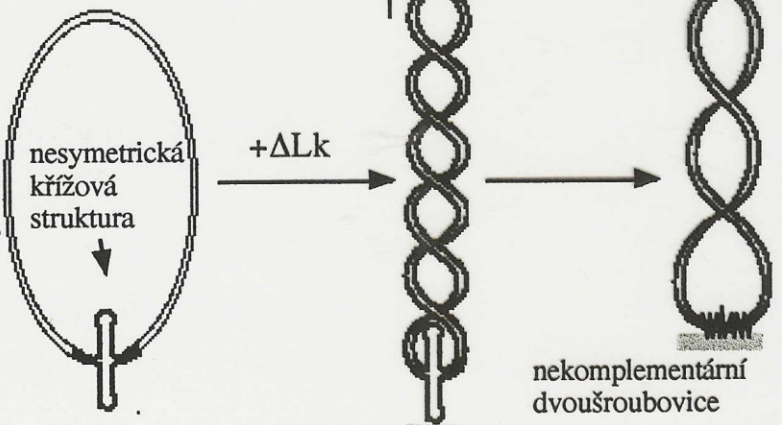
T   A
A   T
G   C
T   A
A   T
G   C
A   T
T   A
C   G
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
G   C
T   A
A   T
A   T
A   T
C   G
C   G
C   G
C   G
T   A
A   T
    
```

Vologodskii, A. V., Yang, X. & Seeman, N. C. (1998). Non-complementary DNA helices structure induced by positive torsional stress. *Nucleic Acids Res.* 26, 1503-1508.

```

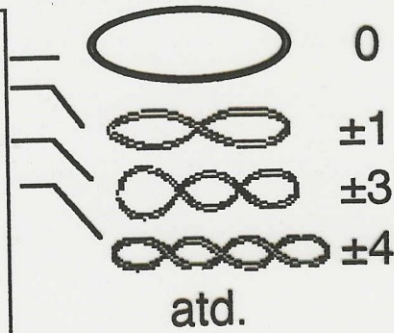
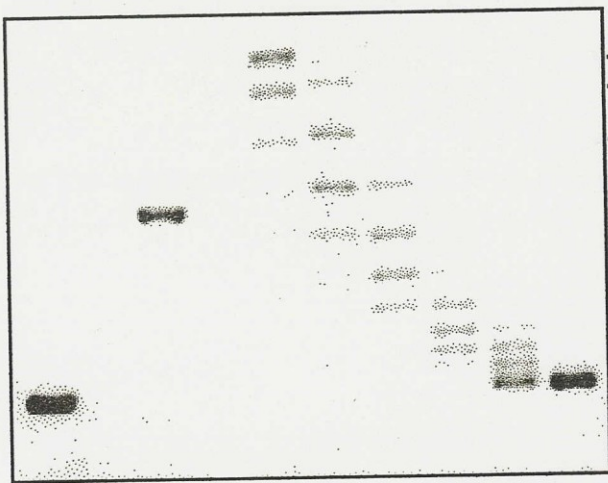
XXXXXXXXXX CCTAGATGATATCATCTAGGXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXX GTAATCGCTATAGCGATTACXXXXXXXXXX
    
```

ramena (vlásky) této „nepohyblivé“ křížové struktury jsou tvořena různými komplementárními sekvencemi, chybí střed symetrie



**Elektroforézou v agarózovém gelu** lze (do jisté hodnoty  $W_r$ ) rozdělit molekuly DNA lišící se počtem nadšroubovicových závitů - **topoizomery**

(pohyblivostí se liší molekuly o různém  $|\Delta W_r|$  - nerozliší se však pozitivně a negativně superhelikální DNA)



— nerozlišené topoizomery o vysokém  $W_r$

## Interkalace

zač. 60 let, Lerman: interakce DNA s planárními organickými kationty

interkalace - vymezení planární molekuly mezi sousední páry bází

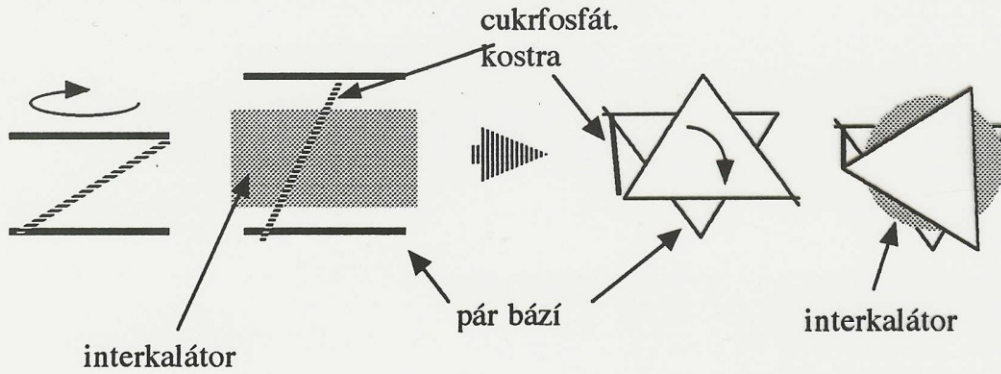
-to vede k prodloužení molekuly DNA (o efektivní tloušťku

interkalátoru, asi 0.34 nm podle klasického modelu)=>změna

hydrodynamických vlastností

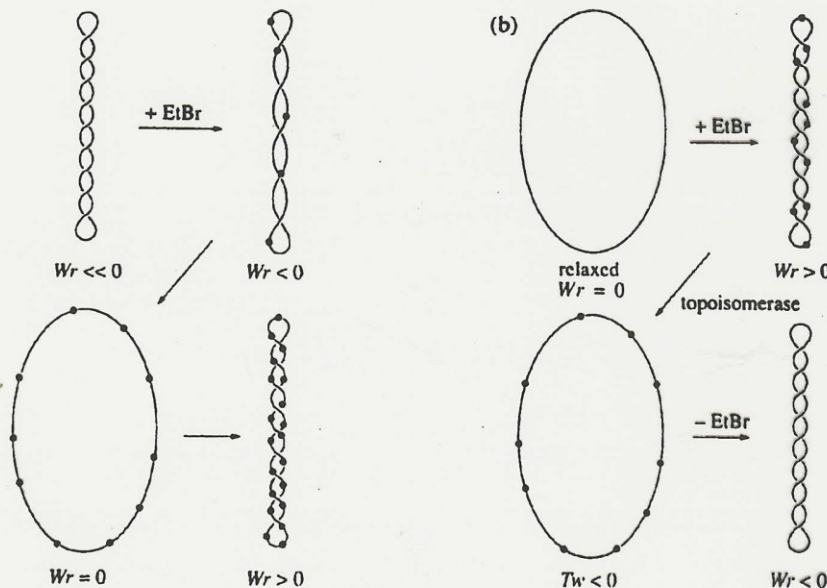
-to je spojeno s vzájemnou torzní rotací párů bází, zmenší se twist (z

obvyklých 36 °) a zvětší počet bp na otáčku



v kovalentně uzavřené kružnicové DNA se v důsledku toho zvětší počet nadšroubovicových závitů (tj. negativně scDNA se relaxuje, relaxovaná přechází na pozitivně sc)

=>**příprava topoizomerů**

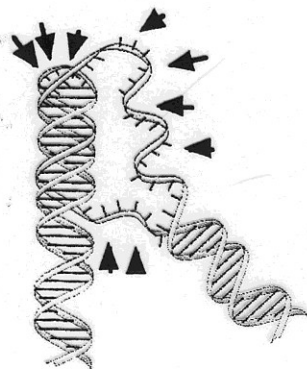
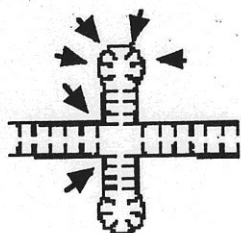
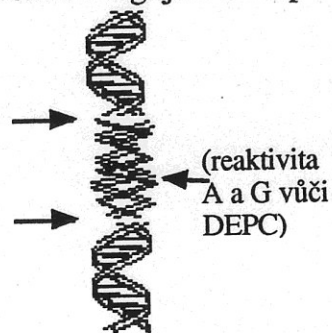


# Detekce lokálních struktur DNA

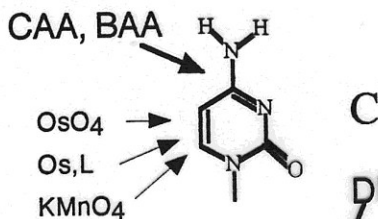
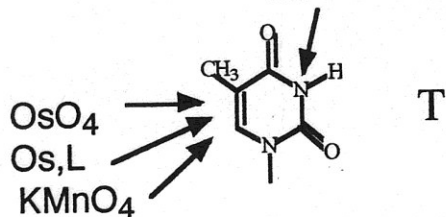
-využití strukturních sond selektivních pro jednořetězcovou DNA

-enzymy: S1, P1 ...

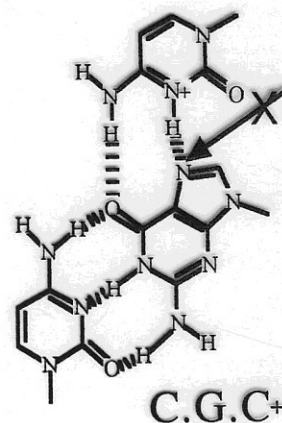
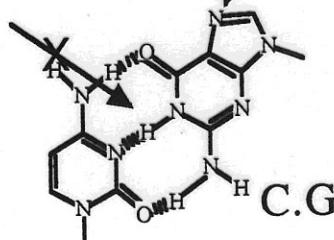
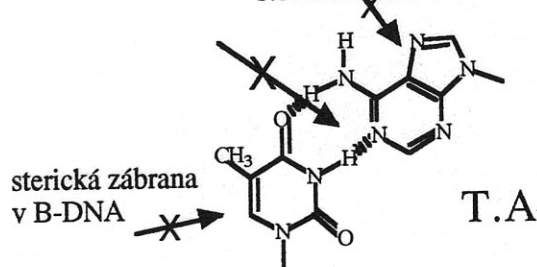
-chemikálie reagující s nespárovanými bázemi



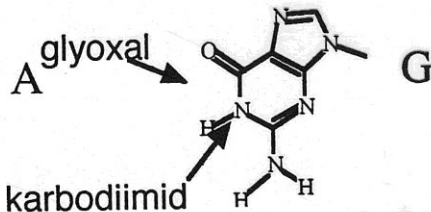
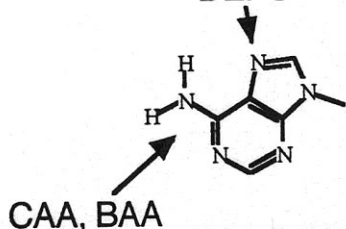
karbodiimid



sterická zábrana v B-DNA



DEPC



## detekce modifikovaných bází:

-enzymaticky (S1, P1)

-sekvenačně (charakteristické obrazce pro jednotlivé struktury)

-specifické protilátky

-fyzikálně-chemické vlastnosti aduktů

(elektrochemie, spektroskopie)

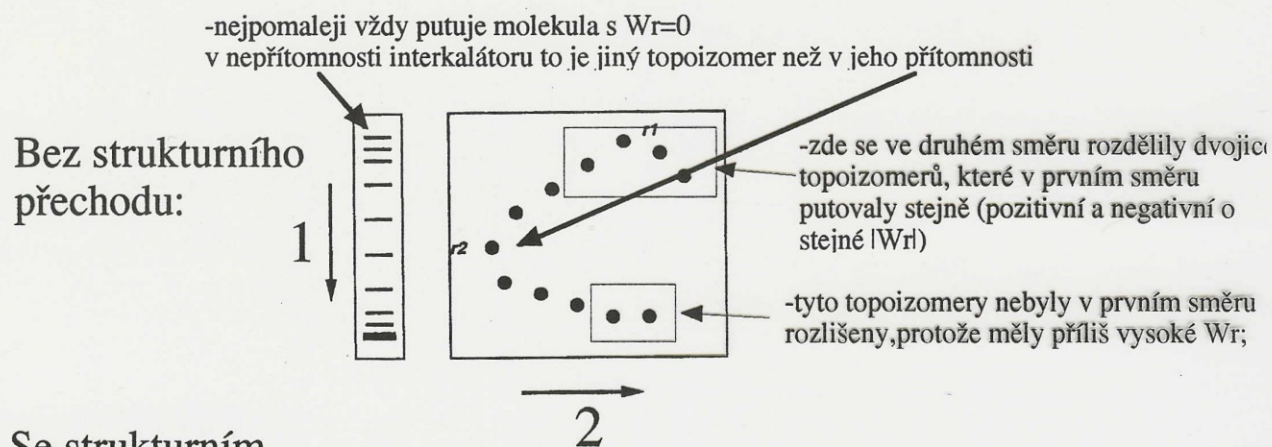


# Dvojměrná (2D) elektroforéza: detekce strukturálních přechodů

1. V prvním směru se rozdělí topoizomery
2. Gel se ekvilibruje v roztoku **interkalátoru** (chloroquinu) a provede se elektroforéza ve druhém směru

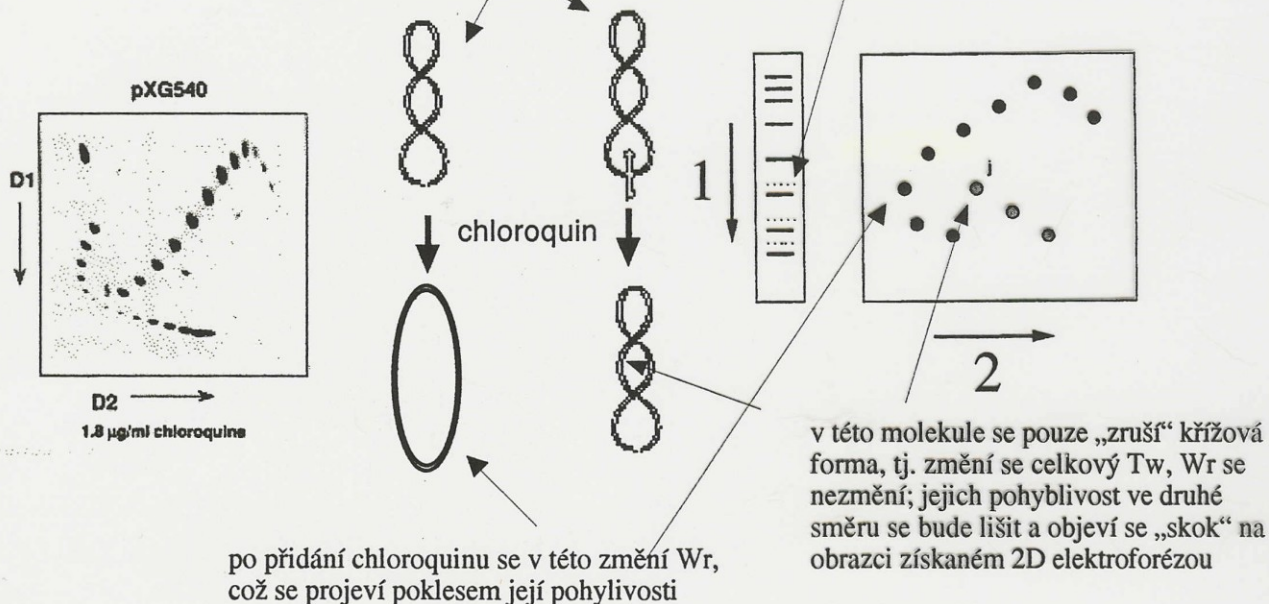
-v přítomnosti **interkalátoru** se DNA odvíjí, tj. snižuje se počet závitů dvoušroubovice=> **snižuje se  $Lk_0$**   
 .protože  $Lk$  u cccDNA zůstává **konstantní**, interkalátor sníží negativní a zvýší pozitivní nadšroubovicovou hustotu

=>negativní topoizomery se s rostoucí konc. interkalátoru relaxují a přechází do pozitivní nadšroubovice  
 =>tím se zároveň ruší lokální struktury přítomné v negativně superhelikální DNA



**Se strukturálním přechodem:**

Tyto dvě molekuly se neliší  $Wr$  a putují v gelu téměř stejně; liší se však  $Lk$  a  $Tw$  (v křížové formě)



# Měření hydrodynamických vlastností DNA

-> sedimentační koeficient

-> difusní koeficient

☞ informace o celkovém tvaru molekuly (terciární struktura), její kompaktnosti

sedimentační koeficient 10 kb

DNA v závislosti na superhelikální hustotě

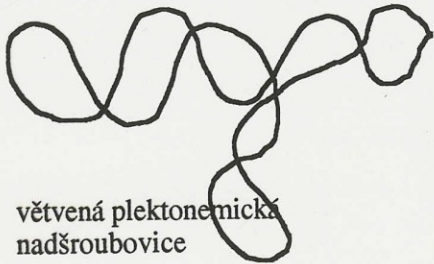
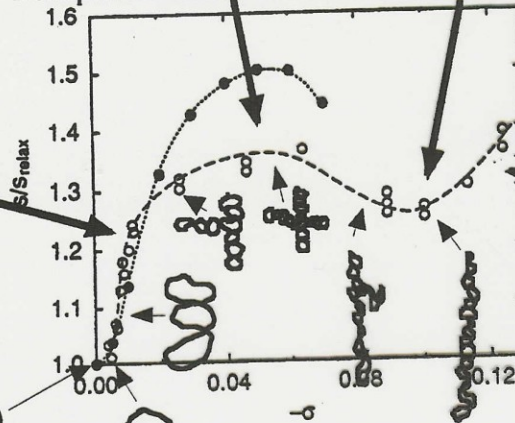
s dalším růstem  $\Delta LK$

**klesá** frekvence větvení, takže molekuly jsou delší => **pokles** sedimentačního koeficientu

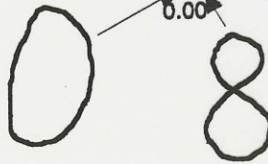
**maximum** pro bohatě větvené, tudíž velmi kompaktní nadšroubovice

**roste**, protože s rostoucí  $W_r$  se molekuly stávají kompaktnější

molekuly málo větvené, ale **roste** jejich kompaktnost



větvená plektoneická nadšroubovice

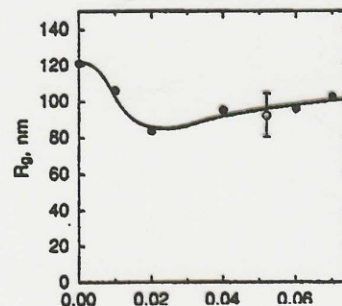
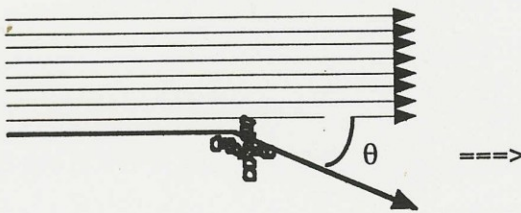


Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. (1994). Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 609 - 643.

## Rozptyl světla:

-získají se informace o **rotačním poloměru** molekul DNA

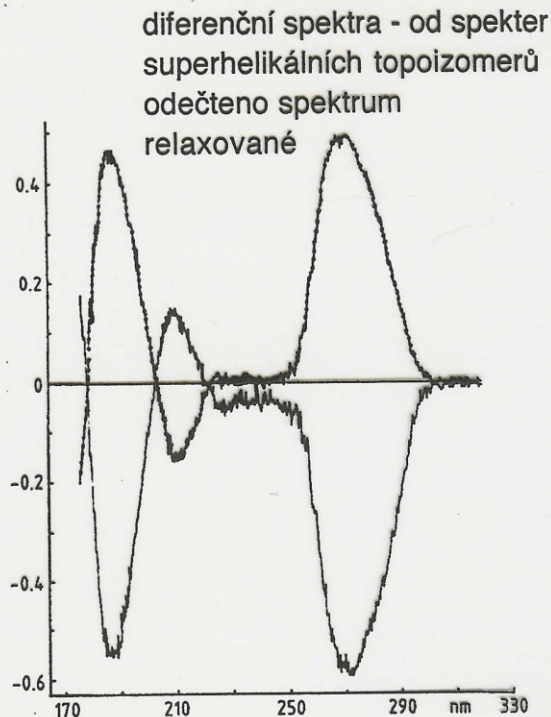
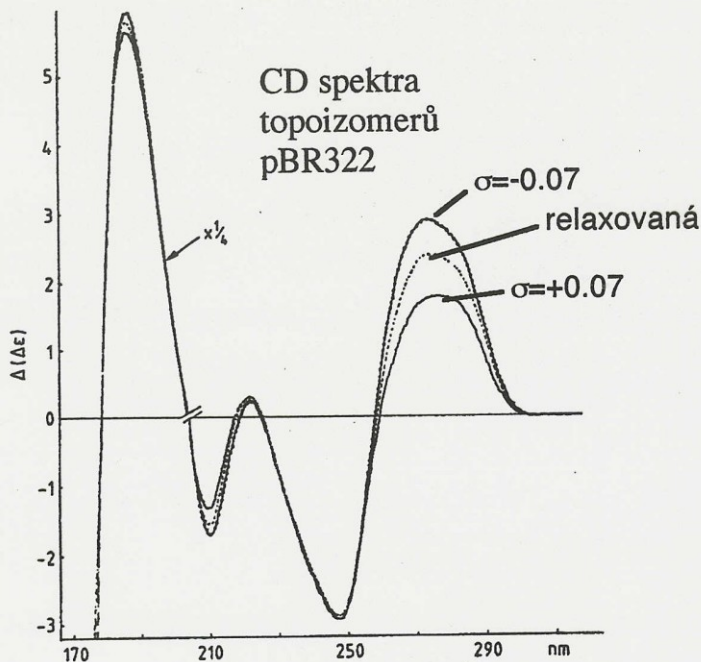
-průběh je přibližně zrcadlový k průběhu transportních parametrů



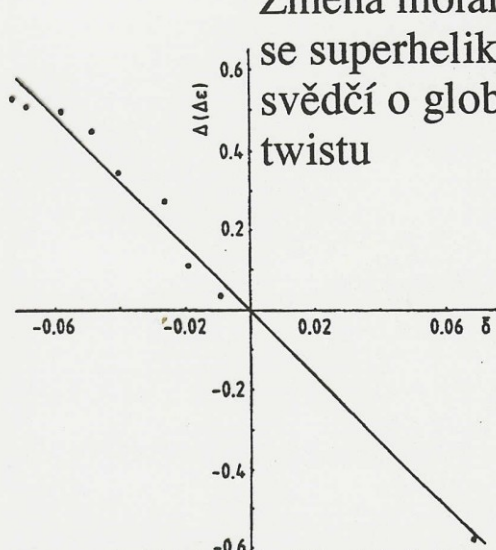
# Cirkulární dichroismus

-dvoušroubovicová struktura DNA představuje asymetrické prostředí, které je opticky aktivní => poskytuje CD spektra charakterizovaná molární elipticitou  $\epsilon$   
 -tato veličina závisí na globální (nebo průměrné) **sekundární struktuře DNA**, v podstatě na *twistu*

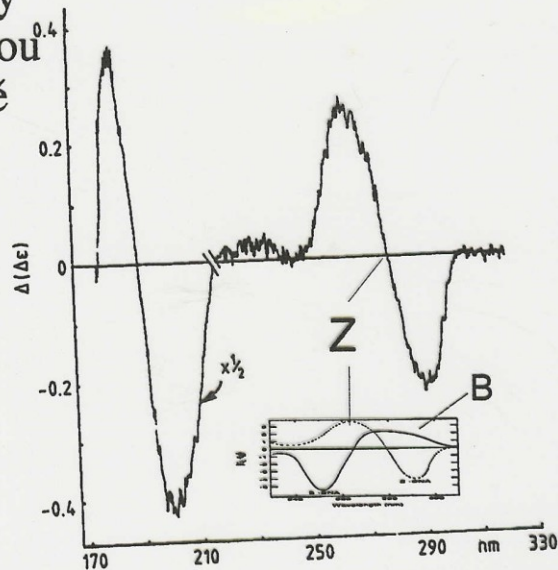
277



Změna molární elipticity se superhelikální hustotou svědčí o globální změně *twistu*



Brahms, S., Nakasu, S., Kikuchi, A. & Brahms, J. G. (1989). Structural changes in positively and negatively supercoiled DNA. *Eur. J. Biochem.* 184, 297-303.



Při vysoce negativní  $\sigma$  (-0.18) lze v CD spektru odlišit signál specifický pro levotočivou DNA

# Zobrazovací (mikroskopické) metody:

Elektronová mikroskopie - potvrzuje existenci plektonemických struktur

-z mikrografů lze odečíst parametry  $W_r$ , úhel vinutí, průměr nadšroubovice, větvení

nevýhody: pravděpodobné změny struktury DNA

v důsledku imobilizační procedury (několik výměn roztoku; vzorek je poté vysušen; nedefinované iontové podmínky)



Adrian, M., Heggeler-Bordier, B., Wahli, W., Stasiak, A. Z., Stasiak, A. & Dubochet, J. (1990). *EMBO J.* 9, 4551-4554.

Kryoelektronová mikroskopie - roztok DNA je prudce zmražen na  $-140\text{ }^\circ\text{C}$  a

poté je vybroušena tenká (50-100 nm) vrstva ledu, v níž jsou pozorovány molekuly DNA

-díky stereo snímkům lze rekonstruovat trojrozměrný obraz

-i zde mohou být špatně definované iontové podmínky kvůli vypařování vzorku

## Mikroskopie s rastrovací sondou

(SPM; varianty: SFM=AFM -

rastrovací neboli atomová silová m., STM - rastrovací tunelovací m.)

-vzorek je imobilizován adsorpcí na

podložce (slída) bez dalšího fixování

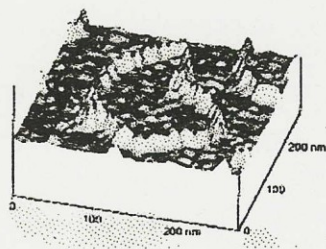
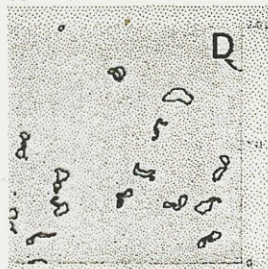
omezení - ztrácí se informace o orientaci molekul

ve třetím rozměru

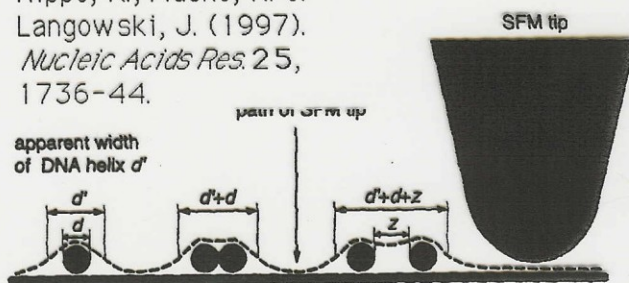
-podložka se vzorkem je řádkována

hrotem

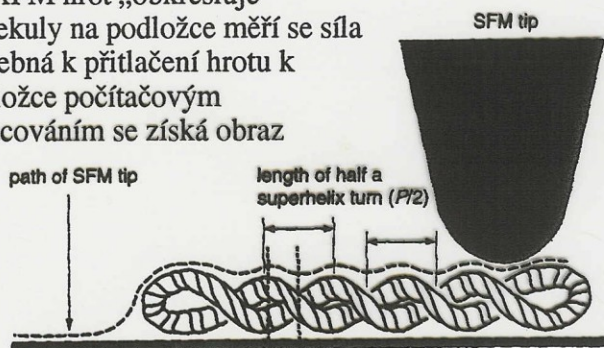
při STM hrot prochází v konstantní výšce nad podložkou a měří se tunelovací proud; ten závisí na vzdálenosti od podložky



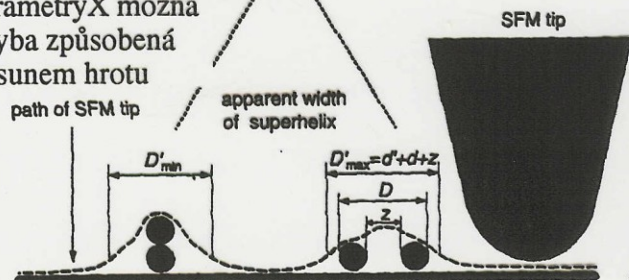
Rippe, K., Mücke, N. & Langowski, J. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25, 1736-44.



při AFM hrot „obkresluje“ molekuly na podložce měří se síla potřebná k přitlačení hrotu k podložce počítačovým zpracováním se získá obraz

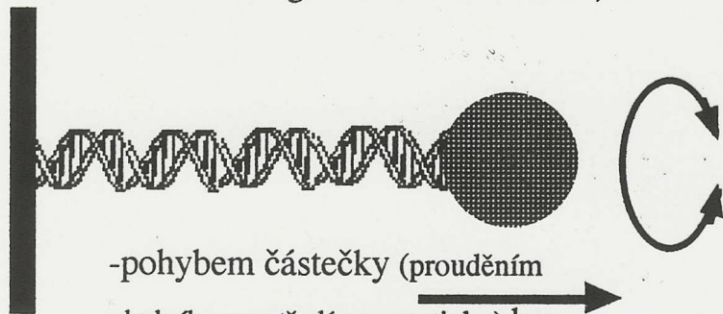


lze odečíst parametry  $X$  možná chyba způsobená posunem hrotu



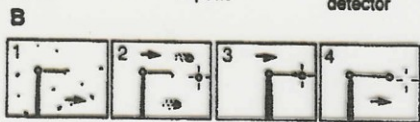
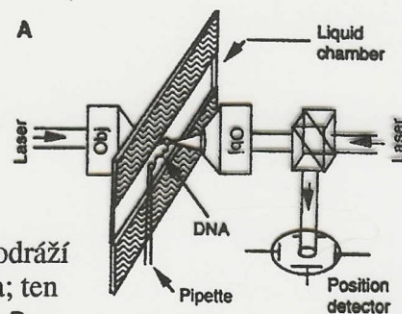
# Manipulace s jednou molekulou DNA

-lineární molekula DNA upevněná konci na podložku a na pevnou částičku (latexovou nebo z magnetického materiálu)



-pohybem částičky (prouděním okolního prostředí, magneticky) lze molekulu DNA **napínat dobře definovanou silou**

-rotací částičky (magneticky) lze v molekule DNA indukovat dobře definovanou  $\Delta Lk$

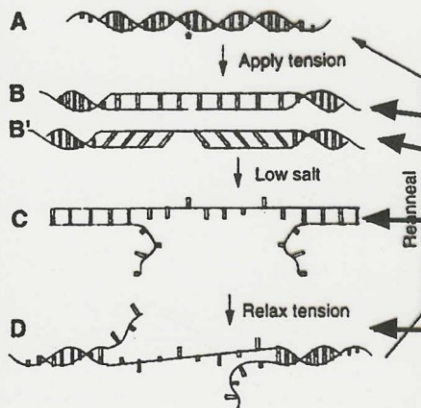
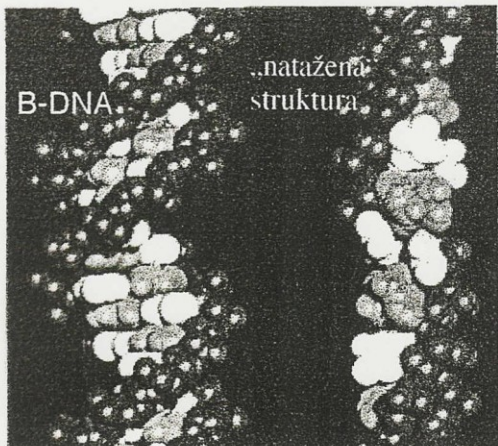


Cluzel, P. et al.,  
Science 271, 792-5  
(1996)

Smith, B.S. et al.,  
Science 271, 795-8  
(1996)

-jedno z možných experimentálních uspořádání: chování molekuly DNA se odráží v pohybu částičky, na které je upevněna; ten je sledován pomocí přesné optiky

☞ lze měřit délku molekuly v závislosti na působící síle při kontrolované superhelicitě



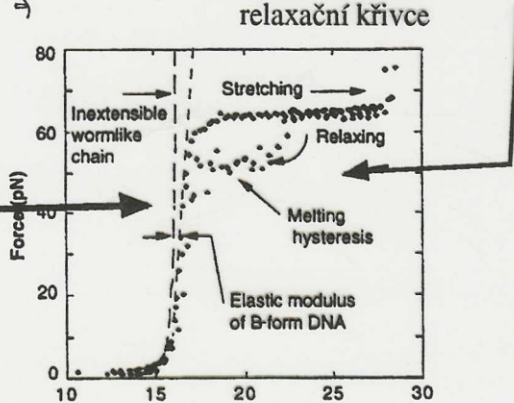
☞ molekula obsahující zlomy v řetězcích: „natahování“ indukuje -odvíjení v okolí zlomů, -přechod do „natažené“ konformace -a lokální denaturaci

☞ po uvolnění napětí dochází k pomalé renaturaci, což se projeví hystezí pozorovanou na relaxační křivce

☞ molekula upevněná na koncích jen za jeden řetězec: (volná rotace, není superhelikální):

☞ ostrý strukturální přechod při určité působící síle

-výsledná konformace závisí na tom, za které konce jsou upevněna: 5'-3', 5'-5' nebo 3'-3'



☞ molekula bez zlomů upevněná za oba řetězce: rotací se v ní indukuje dobře definovaná superhelicita

- lze měřit buď sílu  $\nu$  s. délkou při konstantní  $\sigma$  nebo délkou  $\nu$  s.  $\sigma$  při konstantní délce

nesymetrické chování superhelikálních molekul:

☞ při malé síle (napětí) se pozitivní i negativní nadšroubovice chová podobně

☞ při velké síle (napětí) podléhá negativní nadšroubovice poměrně snadnému přechodu do „natažené“ konformace, zatímco pozitivní nadšroubovice je vůči prodložení rigidní (přechod podobný jako u negativní nadšroubovice je pozorován až při extrémě velké síle)

- toto chování je ve shodě s následujícím vztahy:

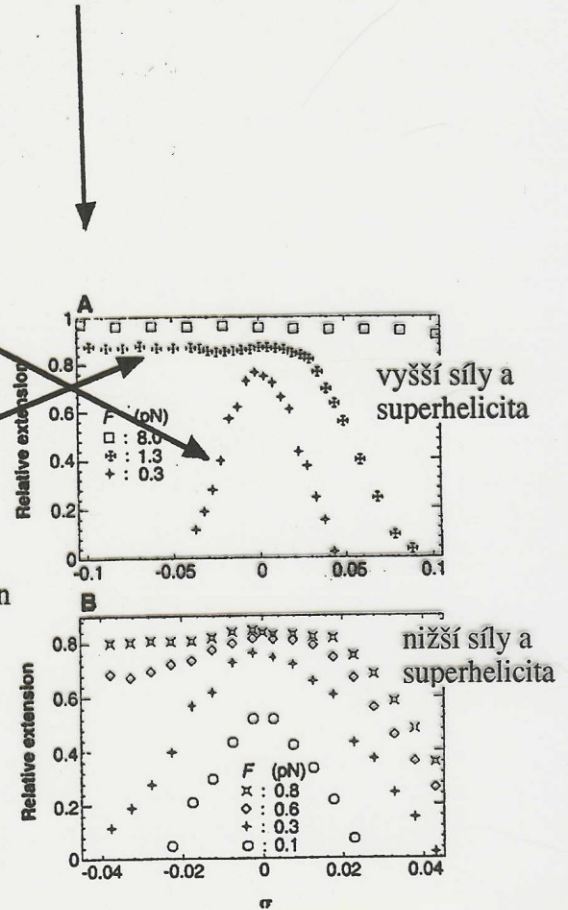
- symetrie chování při **malém napětí** (zkracování molekuly s rostoucí  $|\sigma|$  při obou znaménkách superhelicity) souvisí se změnami ve „**writu**“

- **vyšší napětí** vede ke konverzi  $\Delta W_r$  na  $\Delta T_w$

- **natažení** molekuly vyvolává její **odvinutí** (srovn. interkalace) - snížení twistu; stejně tak **negativní** superhelicita; v molekule s konci fixovanými vůči rotaci si oba jevy „pomáhají“

(při vyšších  $\sigma$  se navíc zřejmě tvoří segmenty levotočivé Z DNA nebo jiné lokální struktury)

- **zvýšení twistu** molekuly má za následek její **zkrácení**, což přirozeně znesnadňuje její napínání



Strick, T.R.  
Science 271, 1835-7 (1996)

# Topoizomerázy

-enzymy, které mění topologický stav DNA (Lk): regulují superhelikální hustotu DNA

(řada procesů - replikace, transkripce, rekombinace - vede k tvorbě nadšroubovicových závitů a vzájemnému ovjenu molekul DNA, které je potřeba průběžně odstraňovat TOPOIZOMERÁZAMI; jiné děje, např. vytvoření určitých struktur, superhelicitu vyžadují a ta je vytvářena tzv. GYRÁZAMI)

-mají schopnost přerušit a znovu spojit řetězec (řetězce) DNA

-obecně mají schopnost relaxovat superhelikální DNA

spektrum enzymů napříč všemi organismy:

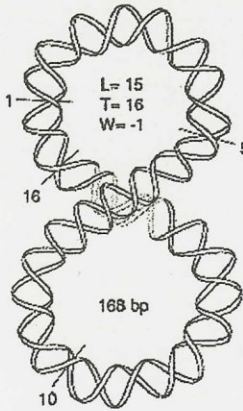
dva základní typy: *topoizomerázy I během reakce vytvoří a spojí jednořetězcový zlom.*  
*topoizomerázy II během reakce vytvoří a spojí dvouřetězcový zlom.*

Enzym	Zdroj	RMH (podjednotka)	Typ	Charakteristika
„protein ω“ bakteriální topo I	bakterie <i>E. coli</i> aj.	97	I	Relaxuje pouze <i>negativní</i> nadšroubovice
Int protein	<i>fág λ</i>	40	I	Proteiny zúčastněné v rekombinaci, vykazují topoizomerázovou aktivitu
Resolváza	transpozony	21	I	
eukaryotická topo I	eukaryota	91	I	Relaxuje <i>pozitivní i negativní</i> sc
topoizomeráza III*)	bakterie ( <i>E. coli</i> )	74	I	Dekatenace
reverzní gyráza	termofilní a hypertermofilní bakterie a <i>Archae</i>	128	I	Vytváří <i>pozitivní</i> nadšroubovice vyžaduje ATP
DNA gyráza	bakterie ( <i>E. coli</i> )	97 + 90	II	Vytváří <i>negativní</i> nadšroubovice vyžaduje ATP
T4 topoizomeráza	<i>fág T4</i>	58 + 51 + 18	II	Vyžadují ATP, ale pouze <i>relaxují DNA</i> nevytvářejí nadšroubovice
eukaryotická topo II	eukaryota	174	II	
topoizomeráza IV*)	bakterie ( <i>E. coli</i> )	67 + 81	II	

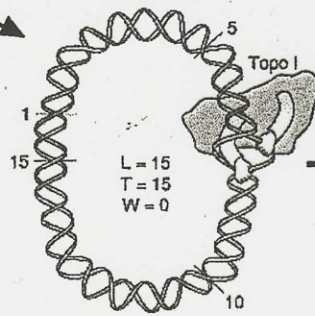
\*)toto číselné označení nemá vztah k počtu přerušovaných řetězců během reakce!!!

# Relaxace superhelikální DNA topoizomerázou typu I

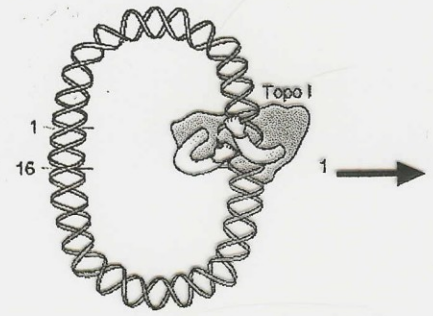
tyto dvě molekuly mají stejný topologický stav, (vlevo je  $\Delta Lk = Wr = -1$  a  $\Delta Tw = 0$ ; vpravo je molekula s  $Wr = 0$ , tj. planární kružnice, a má  $\Delta Lk = \Delta Tw = -1$ ); odvinutí v místě vazby topoizomerázy je naznačeno z ilustrativních důvodů - enzym to takto doslova ve skutečnosti nedělá (potom by v principu nemohl relaxovat pozitivně scDNA; prokaryotické topo I však pro první interakci s DNA vyžadují, aby byla „podvinutá“, tj. negativně sc)



scDNA, 1 negativní závit

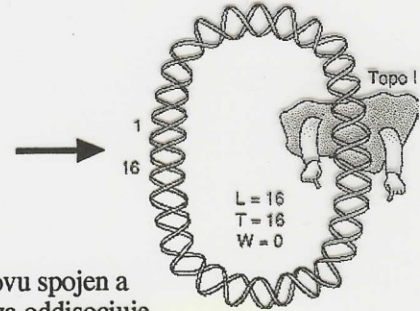


topoizomeráza se naváže kovalentně v místě, kde je vytvořen jednořetězcový zlom (obvykle hydroxylovou skupinou tyrozínu na 5' fosfát)



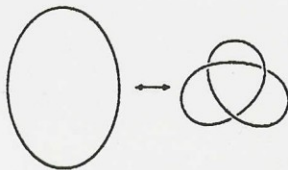
skrz zlom je přenesen druhý řetězec; tím dojde ke změně twistu o 1 (směrem k relaxaci) tj. nyní je  $\Delta Wr = 0$  a  $\Delta Tw = 0$ ,  $\Rightarrow \Delta Lk = 0 \Rightarrow$  relaxovaná DNA

-topoizomerázy typu I v principu nevyžadují ATP (fosfodiesterová vazba není hydrolyzována, ale přenesena na molekulu enzymu)

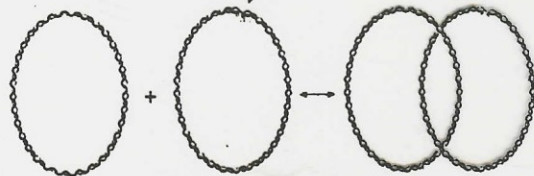


zlom je znovu spojen a topoizomeráza oddisociuje

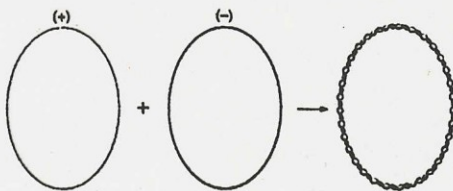
## Další reakce katalyzované topoizomerázami typu I



Tvorba jednořetězcových uzlů („knots“, „knotting“)



Tvorba katenanů - jedna z molekul musí obsahovat jednořetězcový zlom; případně tvorba katenanů jednořetězcových molekul



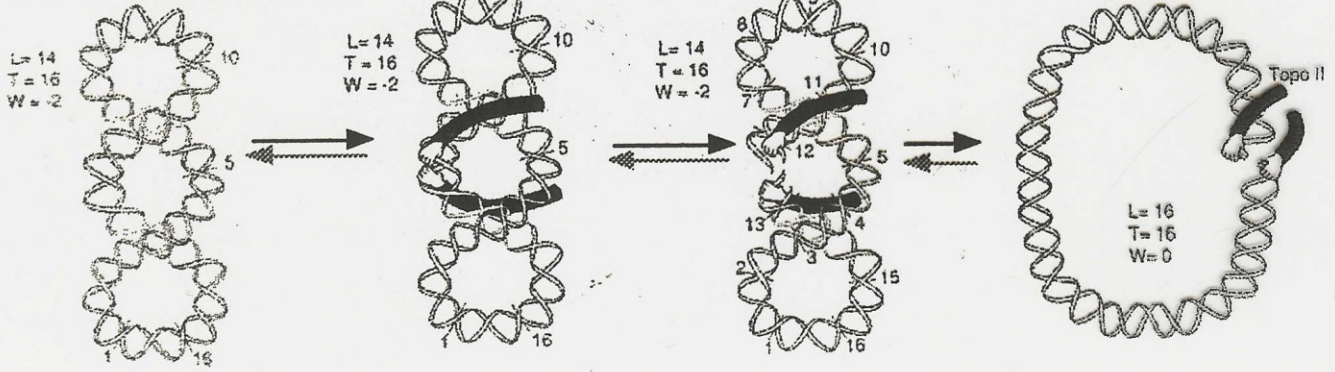
Tvorba duplexu ze dvou komplementárních jednořetězcových kovalentně uzavřených cyklických molekul:

(tato reakce je vlastně relaxací extrémně negativně superhelikální DNA: výchozí stav topologicky odpovídá superhelikální molekule DNA o  $Lk = 0$ , tj.  $\Delta Lk = -Lk_0$ )



# Změny topologického stavu superhelikální DNA topoizomerázou typu II

$$\Delta Lk = Wr = -1 \text{ a } \Delta Tw = 0$$



scDNA, 2 negativní závit

topozomeráza se naváže kovalentně v místě, kde je vytvořen dvouřetězcový zlom hydroxylovou skupinou tyrozinu na 5' fosfáty na obou stranách zlomu)

skrz zlom je „provlečena“ jiná část molekuly; tím dojde ke změně „writhu“ o 2 v tomto případě je nyní je  $\Delta Wr=0$  a  $\Delta Tw=0$ ,  $\Rightarrow \Delta Lk=0$   $\Rightarrow$  relaxovaná DNA

-za spotřeby ATP gyráza vytváří negativní nadšroubovicové závit u prokaryot:

opačný děj

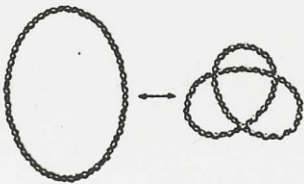


(i ty topoizomerázy typu II, které mohou DNA pouze relaxovat, jsou často ATP-dependentní)

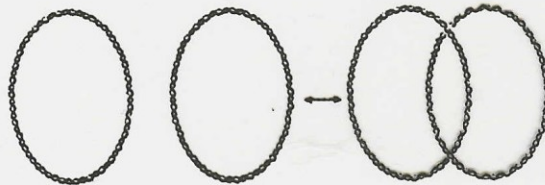
zlom je znovu spojen a topoizomeráza oddisociuje



## Další reakce katalyzované topoizomerázami typu II



Tvorba dvouřetězcových uzlů („knots“, „knotting“)



Tvorba dvouřetězcových katenanů - molekuly mohou být dvouřetězcové, kovalentně uzavřené

# Helikázy

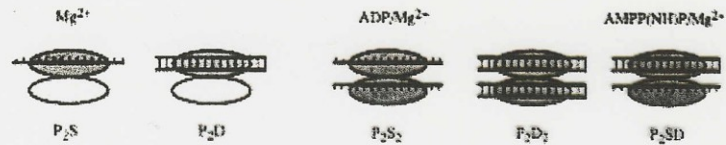
- rozvíjejí dvoušroubovici: při *replikaci, transkripci, rekombinaci, opravných procesech*
- rozvíjení je spojeno s aktivní translokací podél DNA za spotřeby NTP
- dimerní* (Rep helikáza) nebo *hexamerní* struktura (SV 40 T-antigen, DNaB..)

## Vazba na DNA:

- aktivní mechanismus vyžaduje specifické interakce *jak s ss, tak ds DNA*
- u Rep je vazba na ssDNA *orientovaná ve směru polarity* cukrfosfátového řetězce; polarita ss řetězce na rozhraní ss/ds DNA vázaného v P<sub>2</sub>SD komplexu určuje *směr odvíjení DNA*

-Rep helikáza v přítomnosti DNA a dimerizuje; může vázat ss a ds DNA v komplexech:

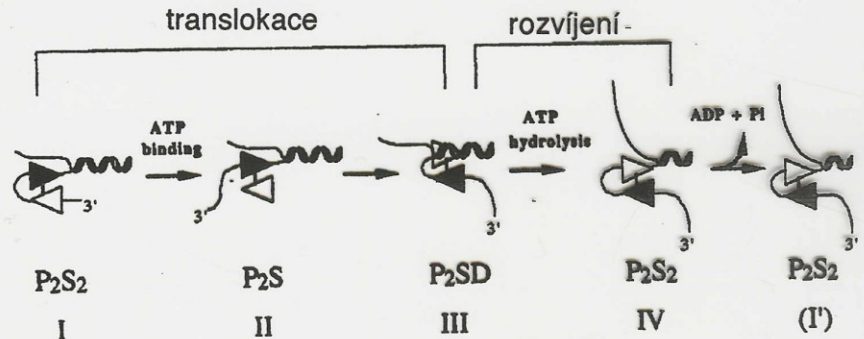
v přítomnosti Mg je zvýhodněna struktura P<sub>2</sub>S, v přítomnosti ADP P<sub>2</sub>S<sub>2</sub> a v přítomnosti nehydrolyzovatelných analogů ATP P<sub>2</sub>SD  
=> viz mechanismus



## Mechanismus odvíjení:

I. Rep-helikáza vázaná na rozhraní ss/dsDNA v komplexu P<sub>2</sub>S<sub>2</sub>

II. vazba ATP indukují uvolnění ssDNA z toho monomeru, který váže ssDNA proti směru translokace, a vytvoření komplexu P<sub>2</sub>SD (III).



IV. hydrolyza ATP vyvolá konformační změnu, která vede k odvinutí DNA a vzniku komplexu P<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, z něhož oddisociuje ADP (V).

(v principu je možný též pasivní mechanismus, kdy helikáza pouze „čeká“ na spontánní odpárování nukleotidů mechanismem „dýchání“ DNA a vyvazuje ssDNA)

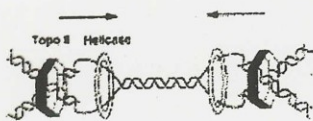
-*přeměňují chemickou energii ATP na energii mechanickou podobně jako „motorové“ proteiny (myosin, dynein), s nimiž mají některé společné strukturní rysy*

# Součinnost helikáz a topoizomeráz

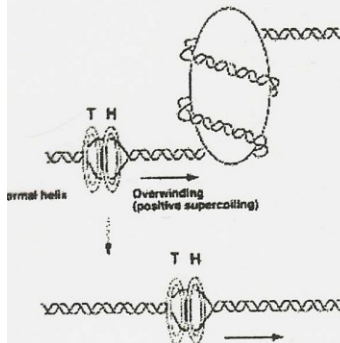
-řada procesů, spojených s rozvíjením DNA, představuje topologický problém, pokud je DNA kovalentně uzavřená kružnice nebo je rozdělena do uzavřených domén; v tom případě *rotace* odvíjených řetězců indukují *superhelicitu*, která musí být relaxována *topoizomerázami*



-**posun replikační vidlice** je umožněn tím, že pozitivní superhelicita před vidlicí je relaxována u eukaryot topoizomerázami I a II, u prokaryot gyrázou



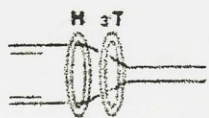
-**segregace replikovaných chromozómů** - ty jsou okolo sebe „omotány“ a jsou separovány topoizomerázou II



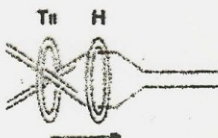
-**zrušení nukleozomové struktury** - vyžaduje zrušení negativní superhelicity, tedy vytvořením pozitivní nadšroubovice. Translokací helikázy podél DNA se vytváří „za“ helikázou negativní a „před“ helikázou pozitivní nadšroubovice (jako při transkripci). Pozitivní sc je absorbována zrušením nukleozomů, negativní topoizomerázou působící za helikázou

stejně funguje archaebakteriální reverzní gyráza

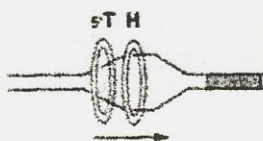
## Možné „složené enzymy“ z helikáz a topoizomeráz:



„swiveláza“ - zde při replikaci - ale může působit i při transkripci a jako mechanismus umožňující tvorbu nukleozomů (vnáší negativní sc)



„segregatáza“ - topoizomeráza II odstraní vzájemné křížení dceřinných molekul na konci replikace



„reformatáza“ - odstraňuje negativní sc (a tím i otevřené lokální struktury); rovněž může „zavíjet“ DNA za transkripčním komplexem

topo I relaxuje negativní sc za helikázou => reverzní gyráza

topo I relaxuje pozitivní sc před helikázou => aktivita odpovídající prokaryotické gyráze

