

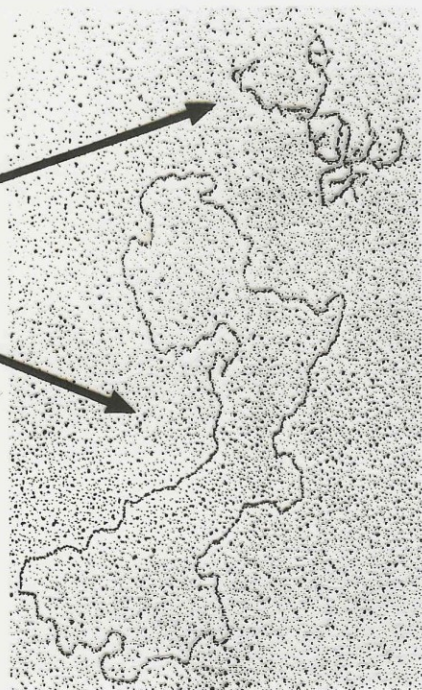
Superhelicitita DNA

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.



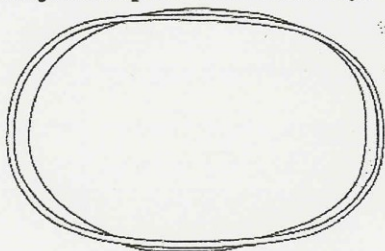
Superhelicitita je vlastnost molekul DNA, které nemají volné konce a jejich řetězce tudíž nemohou okolo sebe

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)

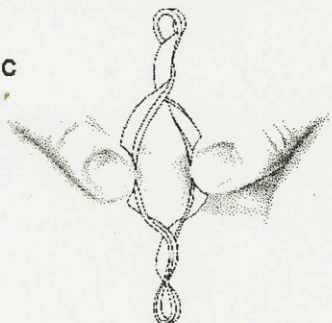
A



B



C



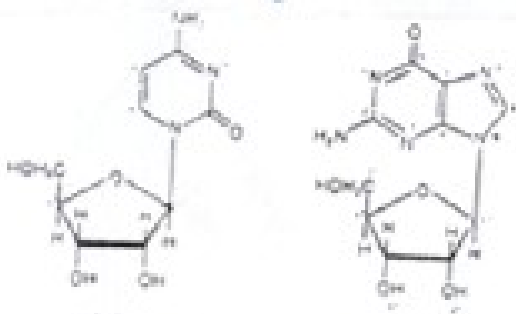
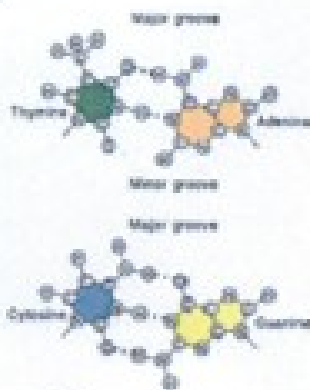
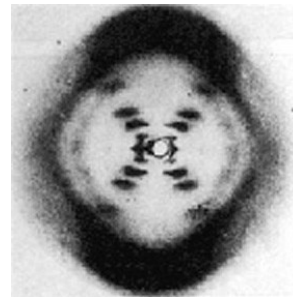
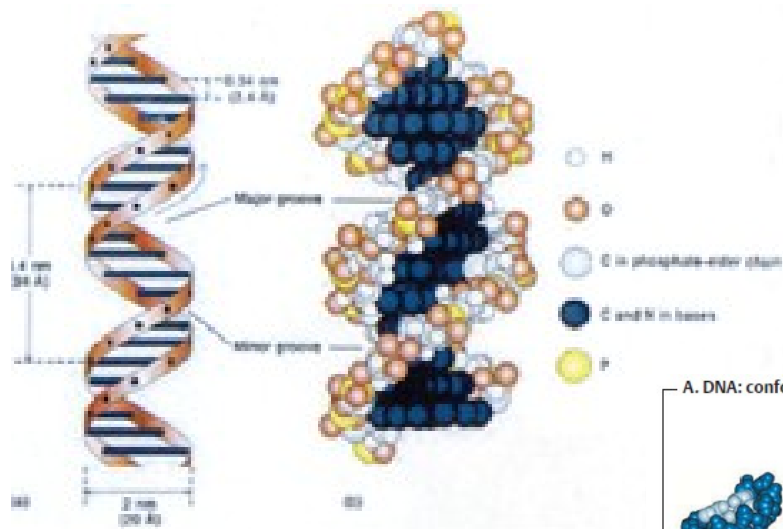
Molekula DNA má mechanické vlastnosti, které lze modelovat např. proužkem gumy:

-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



(a)

(b)

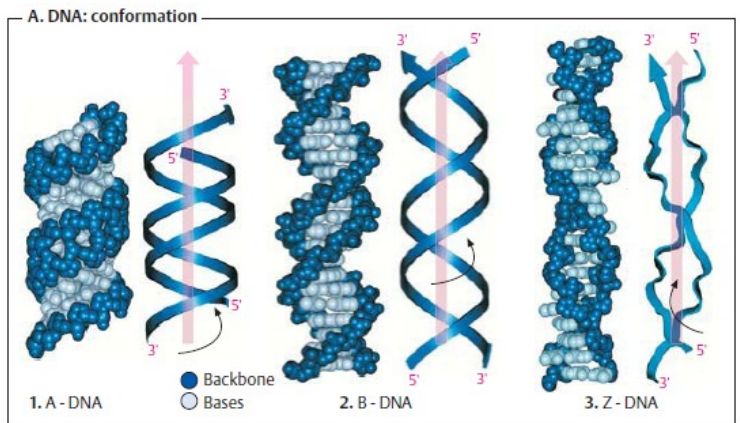


TABLE 1
Comparison of A-, B-, and Z-DNA

Helix sense	A-DNA ^a right-handed	B-DNA ^a right-handed	B'-DNA ^b right-handed	Z-DNA ^c left-handed
Base pairs per turn	11	10	10	12 (6 dimers)
Helix twist (°)	32.7	36.0	34.1, 36.8	-10, -50
Rise per base pair (Å)	2.9	3.4	3.5, 3.3	3.7
Helix pitch (Å)	32	34	34	45
Base pair tilt (°)	13	0	0	-7
P distance from helix axis (Å)	9.5	9.3	9.1	6.9, 8.0
Glycosidic orientation	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti, syn</i>
Sugar conformation	<i>C3'-endo</i>	Wide range	<i>C2'-endo</i>	<i>C2'-endo, C3'-endo^d</i>



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 méně 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

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

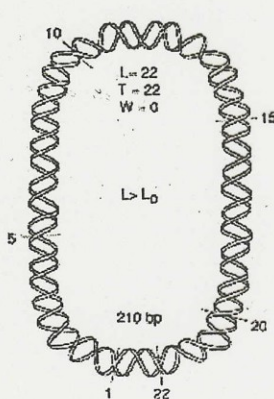
změna počtu závitů
dvoušroubovice

☞ **superhelicita** (ΔLk) vyvolává „pnutí“ v molekule DNA, které má tendenci se kompenzovat změnou její **sekundární** (ΔTw) a/nebo **terciární** (ΔWr) struktury

Pozitivně superhelikální DNA

molekula o délce 210 bp

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



$$T_w = 22, \Delta T_w = 2 \\ W_r = 0, \Delta W_r = 0$$

$$T_w = 20, \Delta T_w = 0 \\ W_r = 2, \Delta W_r = 2$$

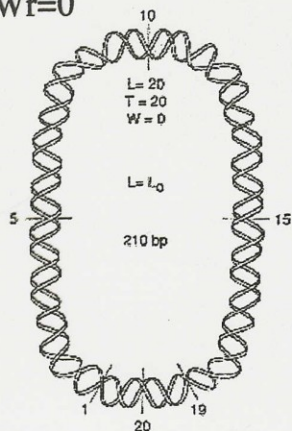
Relaxovaná DNA

molekula o délce 210 bp

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

$$T_w = 20$$

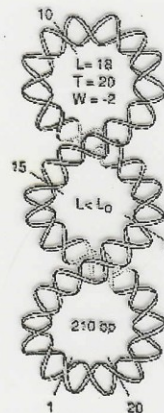
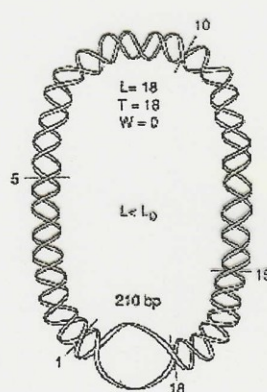
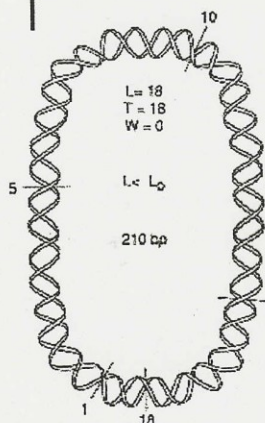
$$W_r = 0$$



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 ΔLk mezi ΔT_w a ΔW_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

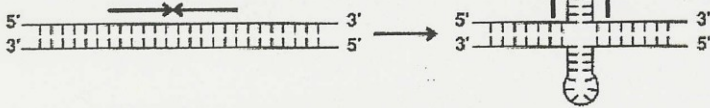
Otevřené lokální struktury

-“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

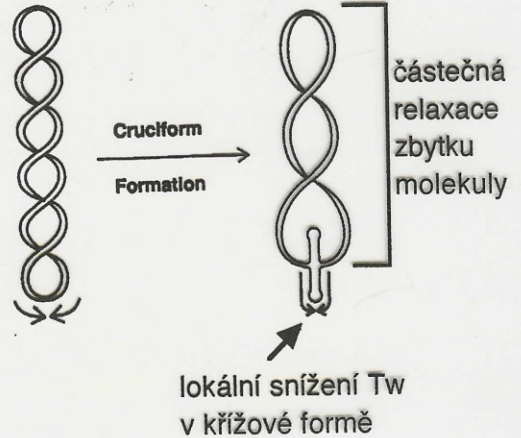
-vyžadují určité typy sekvencí DNA



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)

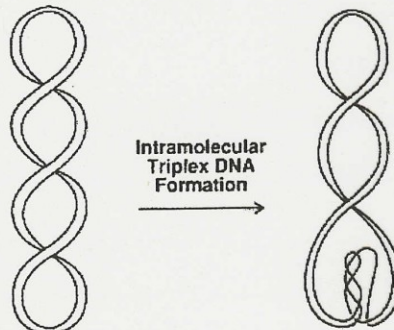
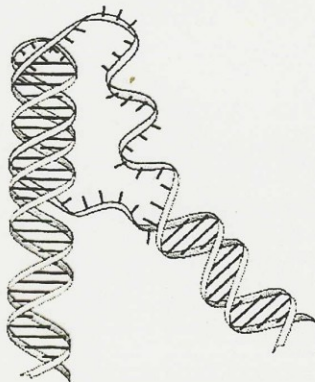
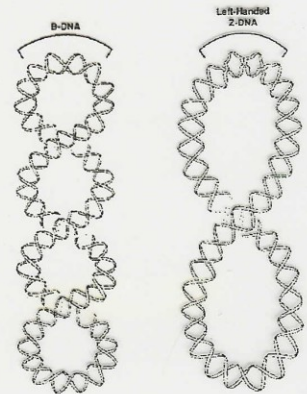
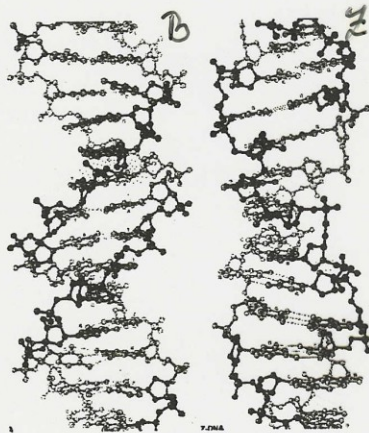
-každých **10 bp** křížové formy relaxuje přibližně **1** nadšroubovicový závit (topologicky je ekvivalentní denaturační bublině ve stejné sekvenci)



Levotočivá Z-forma DNA může být vytvořena střídavou (PuPy)_n 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)_n(Py)_n sekvencí se zrcadlovou symetrií (tak, aby se mohly vytvořit Hoogstenovy triády bází TAT, C⁺GC, GGC nebo AAT)

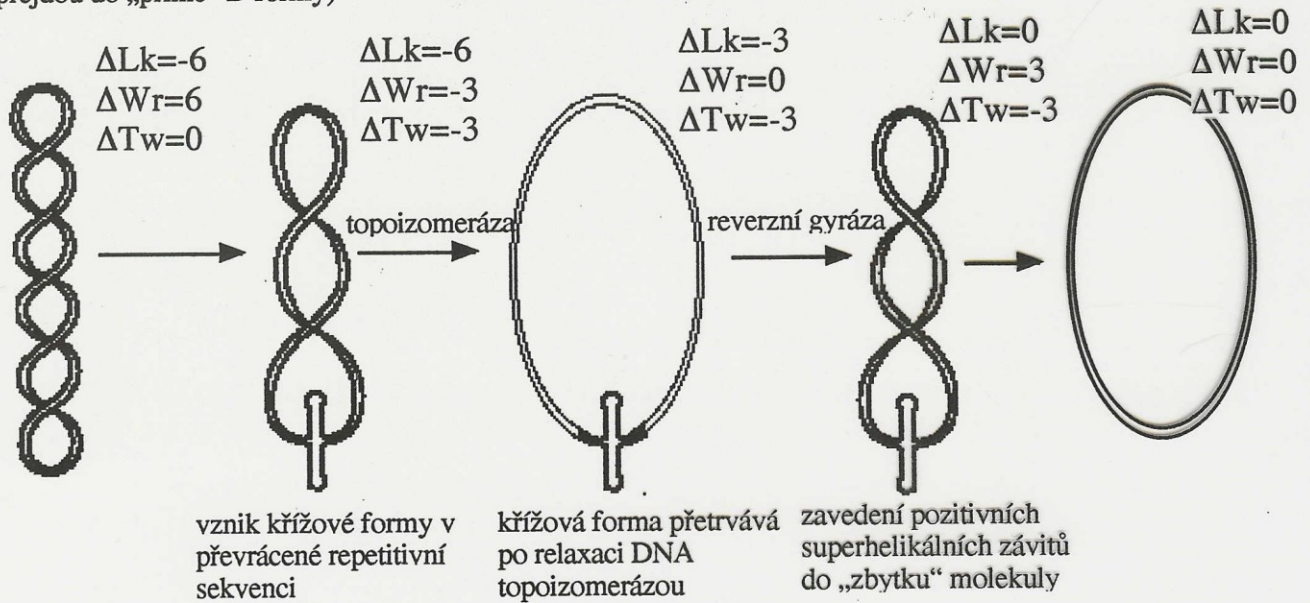
-každých **10 bp** triplexu relaxuje přibližně **1** nadšroubovicový závit (topologicky přibližně ekvivalentní denaturační bublině)

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 ΔLk 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

```

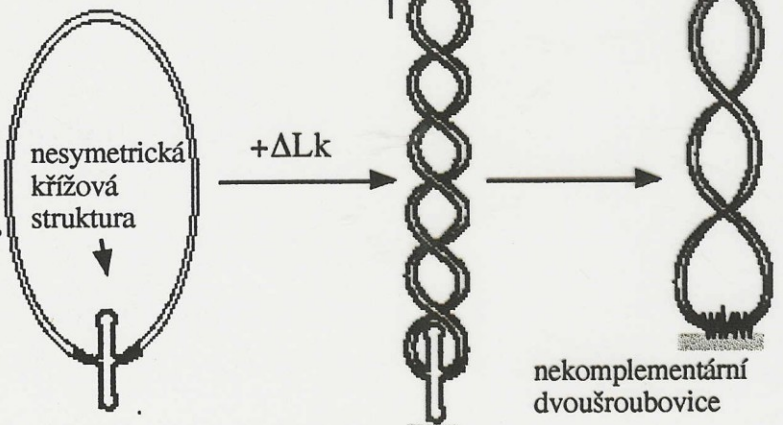
T   A
A   T
G   C
T   A
A   T
G   C
A   T
T   A
C   G
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
G   C
T   A
A   T
A   T
A   T
T   A
C   G
G   C
C   G
T   A
A   T
    
```

```

XXXXXXXXXX CCTAGATGATATCATCTAGGXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXX GTAATCGCTATAGCGATTACXXXXXXXXXX
    
```

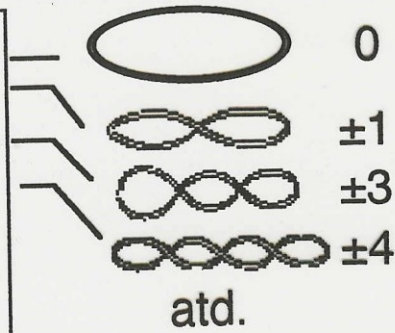
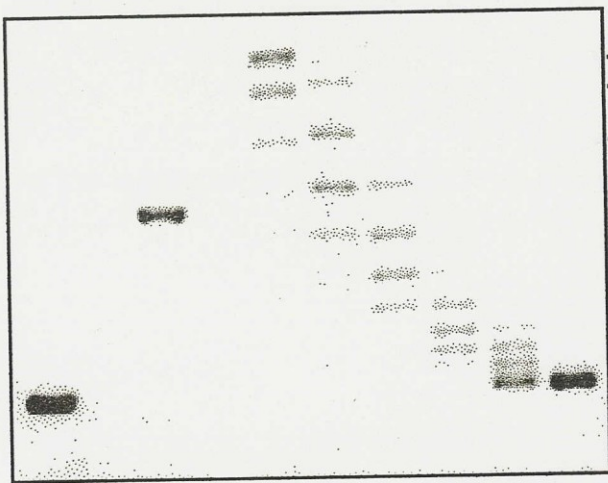
Vologodskii, A. V., Yang, X. & Seeman, N. C. (1998). Non-complementary DNA helices structure induced by positive torsional stress. *Nucleic Acids Res.* 26, 1503-1508.

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

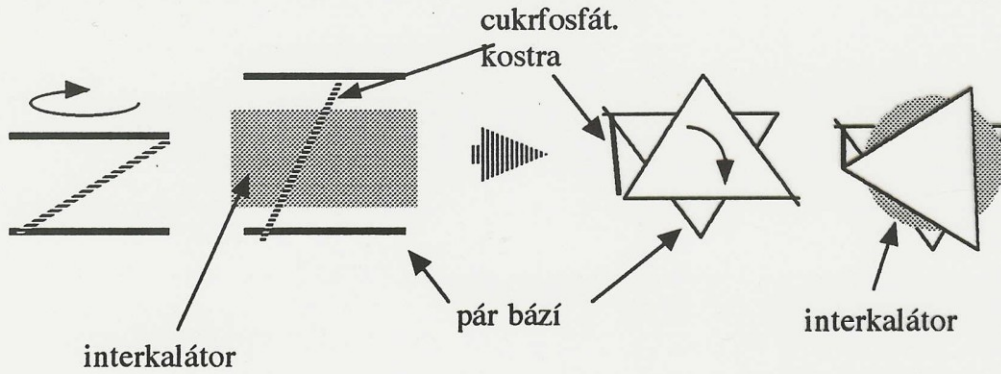
-to vede k prodloužení molekuly DNA (o efektivní tloušťku

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

hydrodynamických vlastností

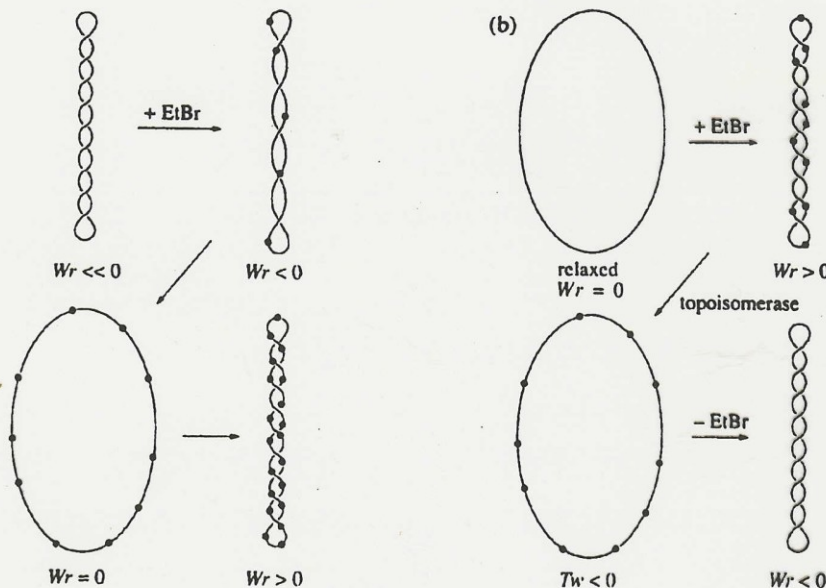
-to je spojeno s vzájemnou torzní rotací párů bází, zmenší se twist (z

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**



změna torzního úhlu (odvinutí dvoušroubovice)- ethidium a propidium 26 °, akridiny (proflavin) 17 °, daunomycin, adriamycin - 11 °

G.B. molekuly DNA neodvíjejí (neropsin: zavinutí)

dichroismus - planární cyklické systémy poskytují podobné chiroptické parametry jako páry bází

anizotropie polarizace fluorescence (např. ethidium):

studium konformace DNA

(G.B. molekuly mívají dichroismus opačný)

interkalace vede ke zploštění „vrtulového zkrutu“ párů bází, interkalátor a přilehlé bp mají navíc „tilt“ 20-25° (zesílení stacking interakcí s interkalátorem)



Tilt



Roll



Twist



Propellor Twist

avšak: interkalace nezpůsobí celkový ohyb DNA (lokální změny parametrů se zprůměrují)

INTERAKCE:

elektrostatické - kationické interkalátory vs. fosfáty

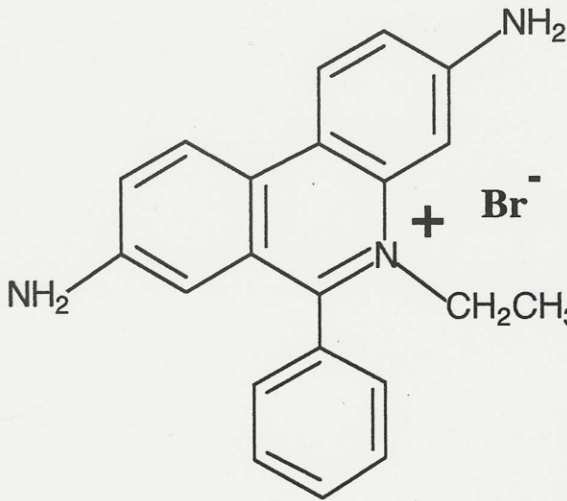
stacking - s páry bází

vodíkové vazby (obvykle exocyklických aminoskupin - např. ethidia, proflavinu - na kyslíky v fosfodiesterových vazbách)

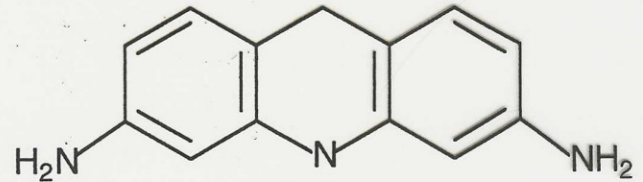
STRUKTURA: klasické interkalátory obsahují 2 - 3

kondenzované aromatické (heterocyklické) kruhy a kladně nabitě skupiny (často amino-, kvartérní dusík...)

(G.B. molekuly: cykly nejsou kondenzované, mohou vzájemně rotovat - ale též „neklasické“ interkalátory)



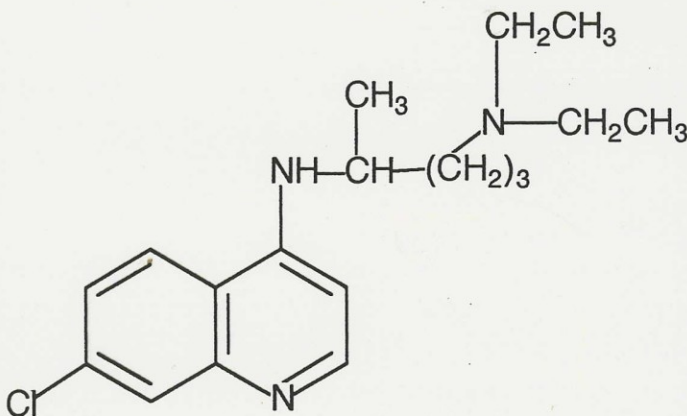
ethidium (bromid)



proflavin

propidium: místo ethylové skupiny $-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ (bývá jako iodid)
fenylová skupina brání dokonalé interkalaci=> určitý „kink“ v místě vazby
tyto postranní skupiny v malém žlábk

barvení gelů, jader, stanovení DNA (fluorescenční komplex)
příprava topoizomerů, izolace scDNA v CsCl-gradientu



Chloroquin

slabší interkalátor
-stanovení superhelikální hustoty gelovou elektroforézou
-2D-elektroforéza: sledování strukturních přechodů v scDNA

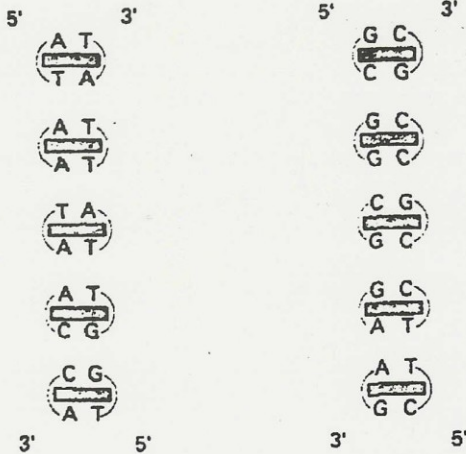
řada antibiotik: adriamycin, daunomycin, doxorubicin

Vazebná specificita

jednoduché interkalátory interagují jen s dvěma bp

(G.B. molekuly s více)

=> deset možností vazebných míst:



(postranní řetězce mohou ovlivňovat i další bp)

většina interkalátorů poněkud preferuje G:C páry

(G.B. molekuly A:T)

důvod - obecně větší vnitřní dipólmoment v G:C páru, který indukuje polarizaci v molekule interkalátoru

interkal. s preferencí k A:T byly syntetizovány

obecně je selektivita G.B. molekul větší než interkalátorů (protože

„dutiny“ mezi A:T a G:C páry se málo liší co do elektrostatických, van der Waalových, hydrofobních atd. interakcí; na druhé straně žlábků v A:T a G:C oblastech jsou velmi rozdílné)

„vyloučení sousedního místa“ (neighbour exclusion):

obecně by mohl interkalátor obsadit všechna místa mezi bp (tj.

stejný počet molekul jako bp), ale v praxi je saturovaná DNA

interkalátorem obsazena jen asi z 1/2 - střídavě, jen každé druhé místo:

jestliže je jedno místo obsazeno, na sousední se nenaváže

-z konformačních důvodů (změna indukovaná interkalací další interkalaci v sousedství znemožní)

-z elektrostatických důvodů (první interkalátor neutralizuje negativní náboj DNA, vazba druhého v sousedství je méně výhodná)

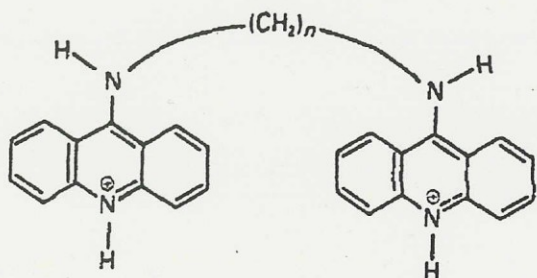
- některé bisinterkalátory >> toto pravidlo porušují

Bisinterkalátory

syntetické: dva planární interkalující cyklické systémy spojené řetězcem, který může mít varabilní délku (např. methylenové skupiny)

-zvýšení vazebné konstanty (význam např. u léků)

-pokud je spojovací řetězec příliš krátký, molekula může porušit

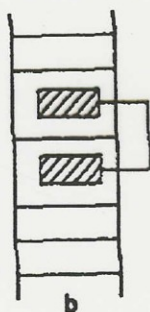
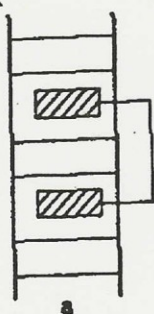


např. bisakridin s oligomethylenovým linkerem

pro $n < 4$ se váže jen jako monointerkalátor, druhá akridinová skupina je vně

$n = 6$ - bisinterkalace s porušením pravidla vyloučení

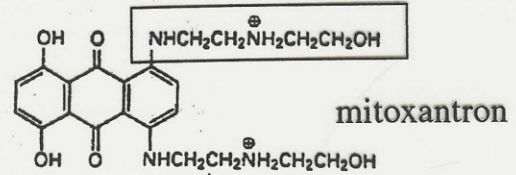
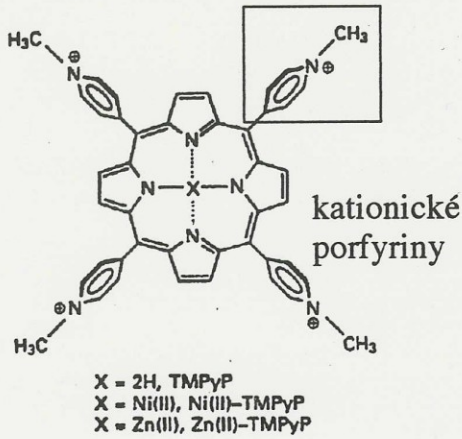
$n > 8$ - bisinterkalace bez porušení



(modelový systém, který tak ve skutečnosti možná nefunguje; existují však rigidní molekuly, které se prokazatelně bisinterkalují s porušením pravidla)

Neklasické interkalátory

Interkalátory s více objemnými skupinami - pokud jsou na opačných stranách molekuly, musí se jedna z nich při tvorbě komplexu „protlačit“ skrz dvoušroubovici mezi bp => pomalý krok, kinetický blok pro tvorbu komplexu (zejména pokud jsou postranní řetězce nabitě nebo polární)

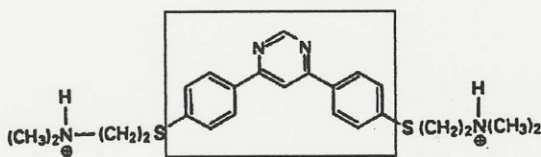


vazba jednoduchého klasického interkalátoru (proflavin) je dvoustupňová:

1. nespecifická iontová interakce s DNA a lineární difuze k místu, kde 2. vstoupí do interkalačního komplexu u molekul s objemnými skupinami vyžaduje druhý krok významnou distorzi struktury DNA nebo i přerušení vodíkových vazeb v bp => pomalu

boční řetězce tvoří výhodné interakce např. ve žlábcích, nebo elektrostatické s fosfáty => vysoké vazebné konstanty (navíc je kineticky blokována i disociace interkalačního komplexu)

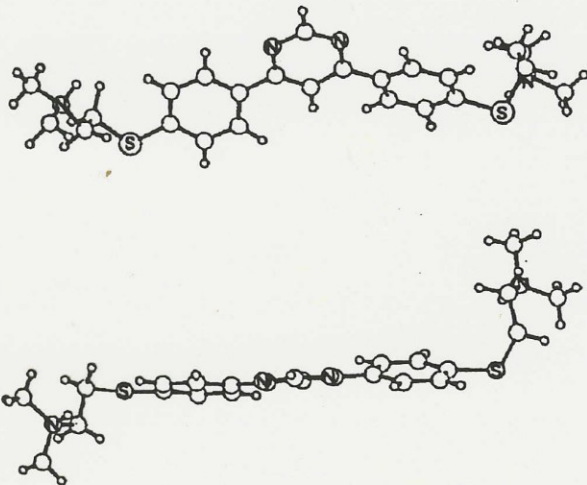
Interkalátory s „vrtulovým zkrutem“ - nekondenzované cyklické systémy (jako G.B. molekuly) - mají torzní volnost



4,6-difenylyrimidin (a deriváty):

struktura odpovídající G.B., ale jde o silný interkalátor (odvíjí scDNA, prodlužuje molekuly DNA)

twist v molekule může kopírovat propeller-twist párů bází

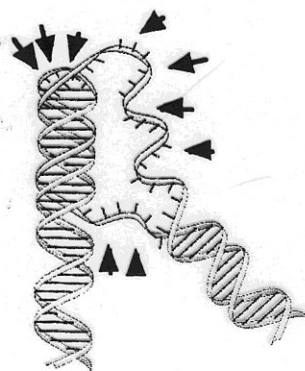
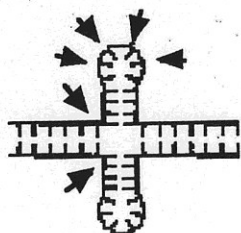
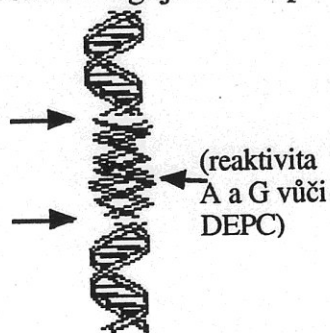


Detekce lokálních struktur DNA

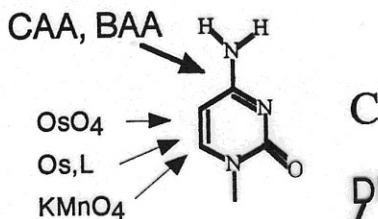
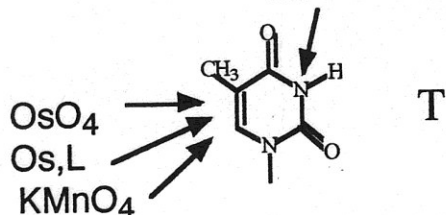
-využití strukturních sond selektivních pro jednořetězcovou DNA

-enzymy: S1, P1 ...

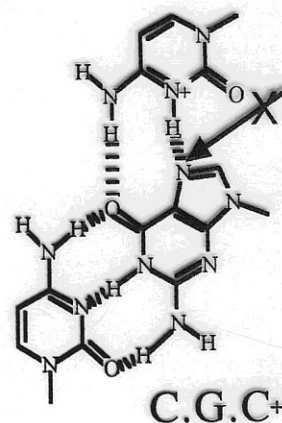
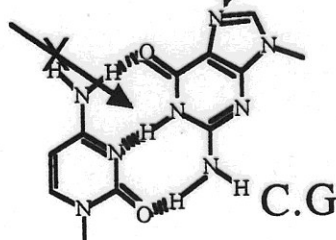
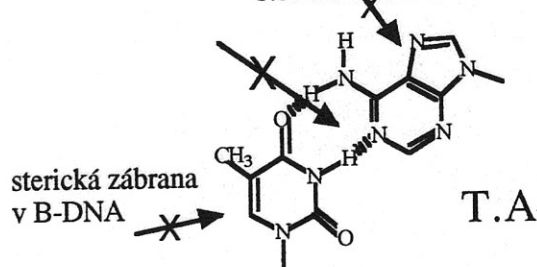
-chemikálie reagující s nespárovanými bázemi



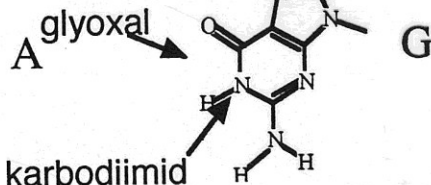
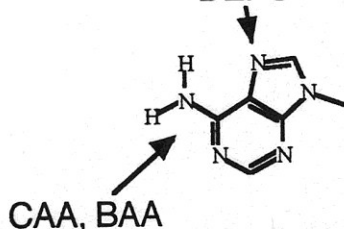
karbodiimid



sterická zábrana v B-DNA



DEPC



detekce modifikovaných bází:

-enzymaticky (S1, P1)

-sekvenačně (charakteristické obrazce pro jednotlivé struktury)

-specifické protilátky

-fyzikálně-chemické vlastnosti aduktů

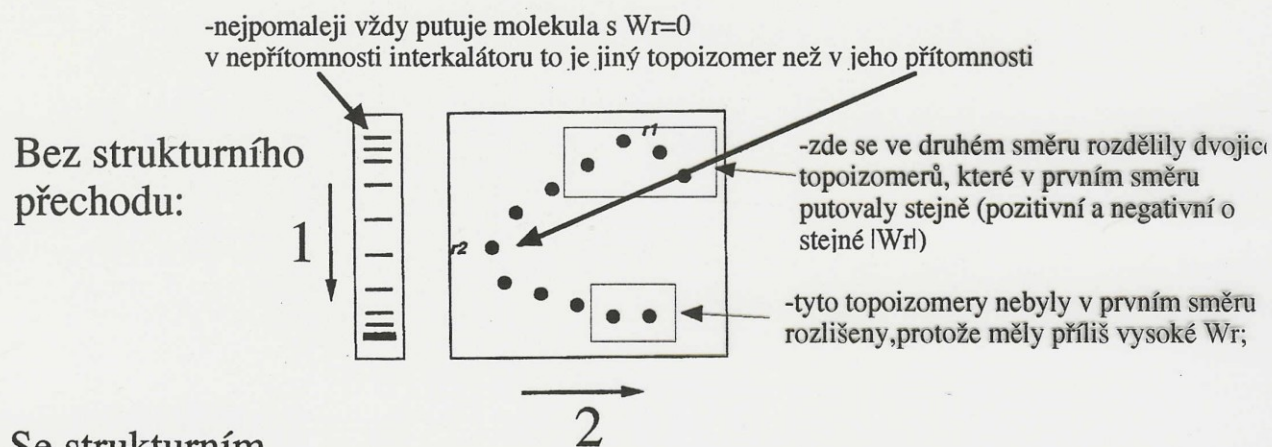
(elektrochemie, spektroskopie)

Dvojrzměrná (2D) elektroforéza: detekce strukturních přechodů

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

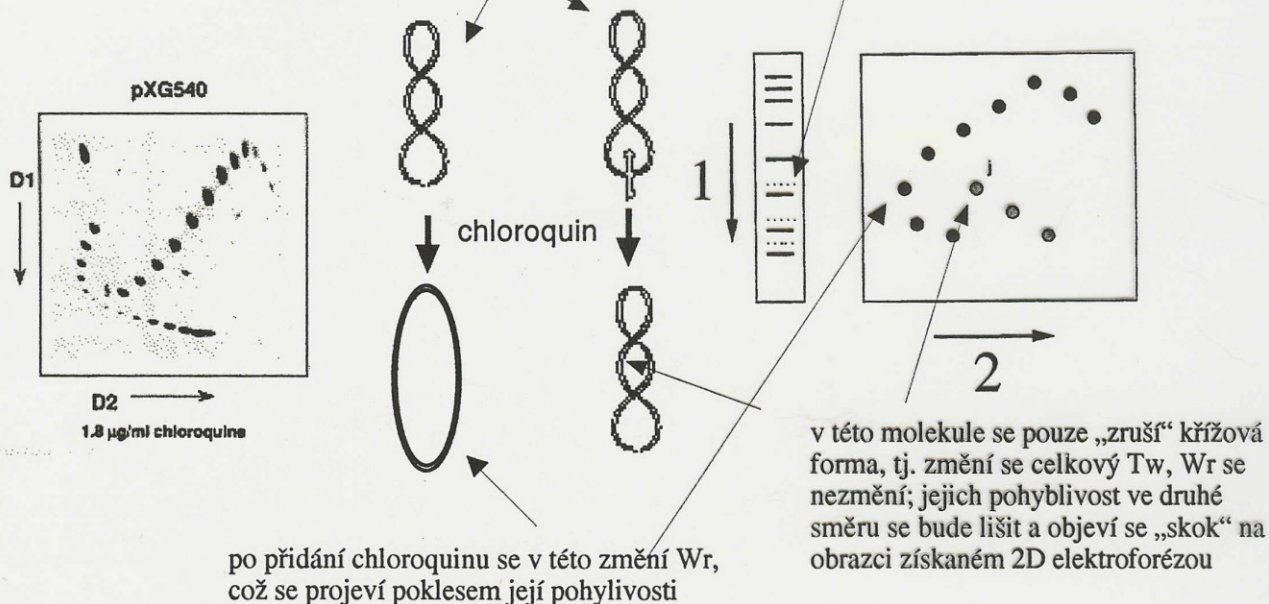
-v přítomnosti **interkalátoru** se DNA odvíjí, tj. snižuje se počet závitů dvoušroubovice=> **snižuje se Lk_0**
 .protože Lk u cccDNA zůstává **konstantní**, interkalátor sníží negativní a zvýší pozitivní nadšroubovicovou hustotu

=>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 strukturním 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

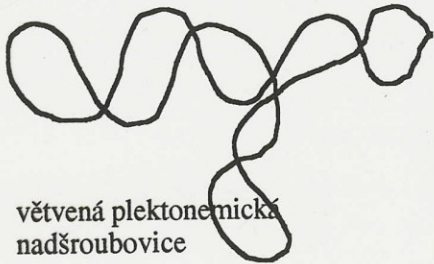
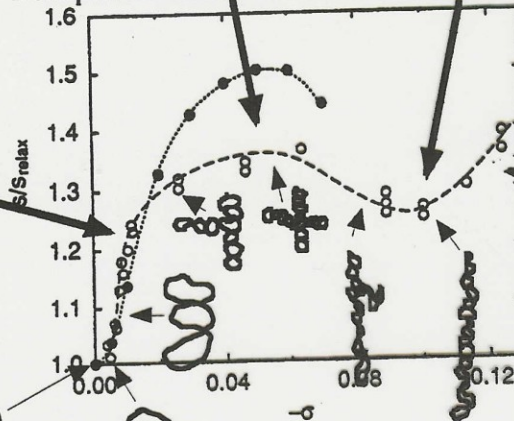
s dalším růstem ΔLK

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

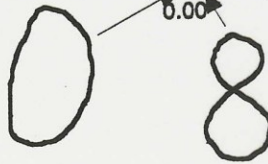
maximum pro bohatě větvené, tudíž velmi kompaktní nadšroubovice

roste, protože s rostoucí W_r se molekuly stávají kompaktnější

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



větvená plektonemická nadšroubovice

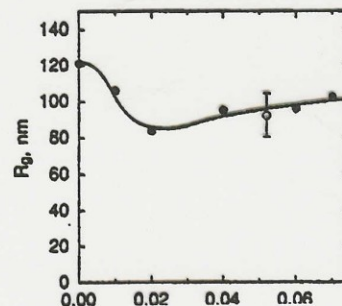
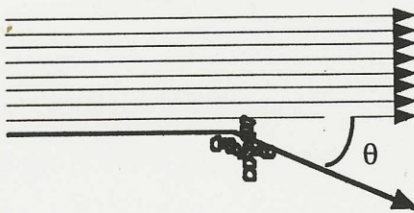


Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. (1994). Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 609 - 643.

Rozptyl světla:

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

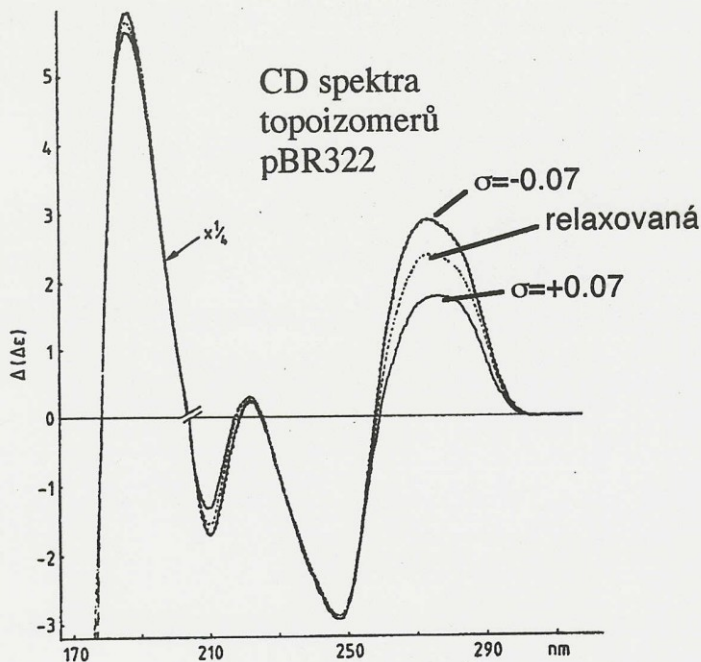
-průběh je přibližně zrcadlový k průběhu transportních parametrů



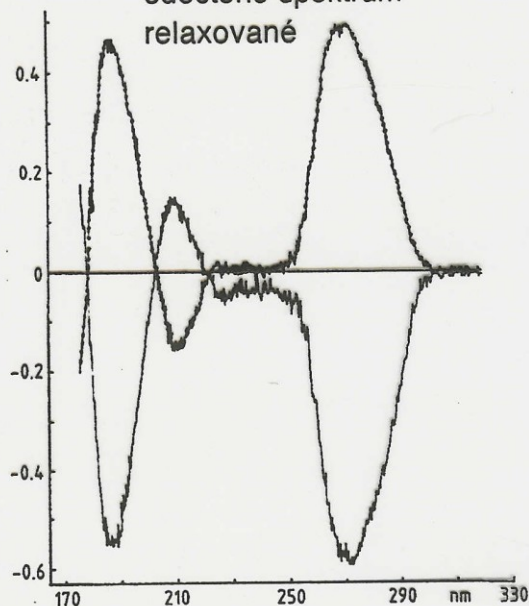
Cirkulární dichroismus

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

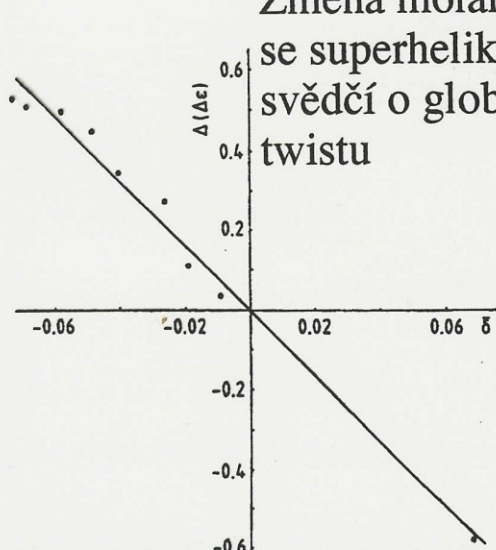
277



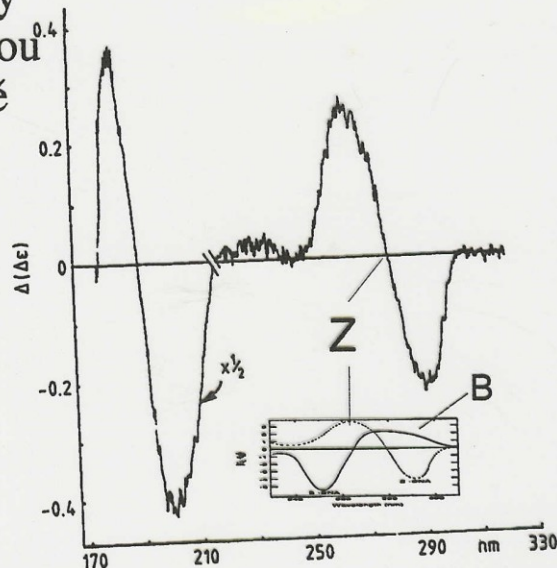
diferenční spektra - od spekter superhelikálních topozomerů odečteno spektrum relaxované



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 σ (-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 vybrušena 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

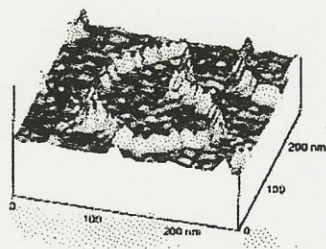
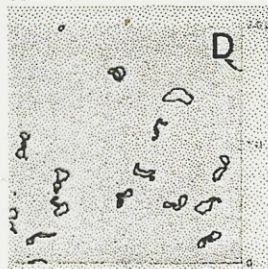
omezení - ztrácí se informace o orientaci molekul

ve třetím rozměru

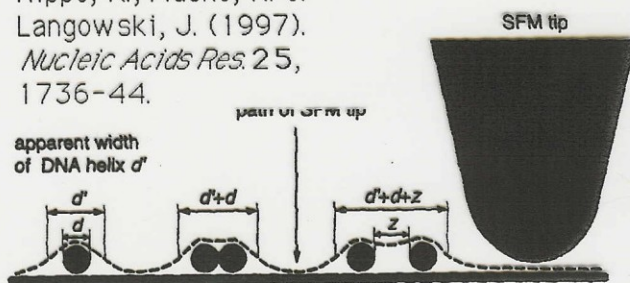
-podložka se vzorkem je řádkována

hrotem

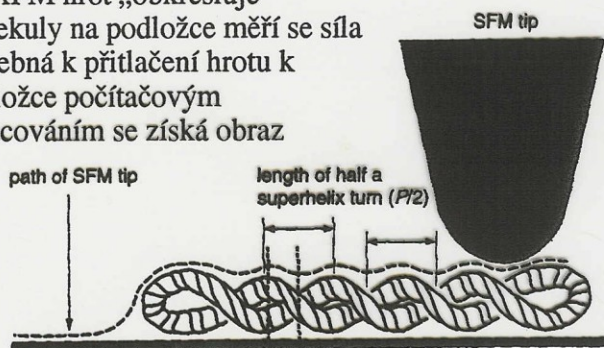
při STM hrot prochází v konstantní výšce nad podložkou a měří se tunelovací proud; ten závisí na vzdálenosti od podložky



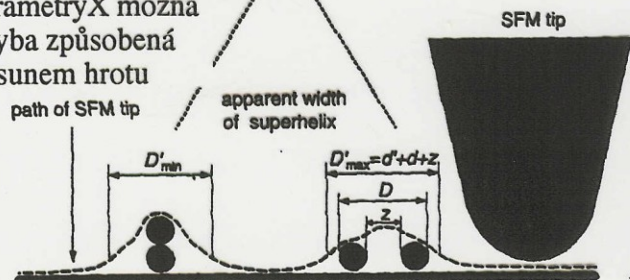
Rippe, K., Mücke, N. & Langowski, J. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25, 1736-44.



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

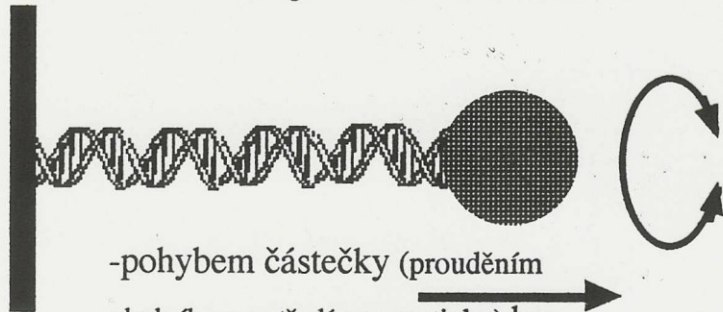


lze odečíst parametry X možná chyba způsobená posunem hrotu



Manipulace s jednou molekulou DNA

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



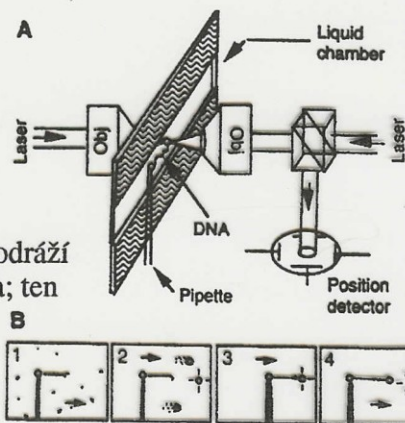
-pohybem částičky (prouděním okolního prostředí, magneticky) lze molekulu DNA **napínat dobře definovanou silou**

-rotací částičky (magneticky) lze v molekule DNA indukovat dobře definovanou ΔLk

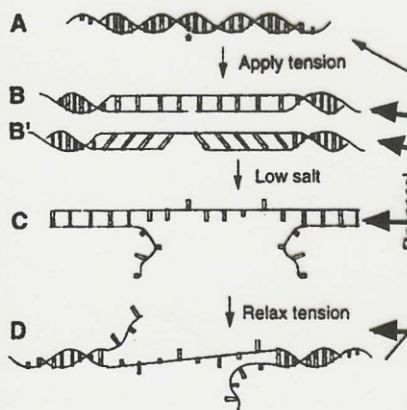
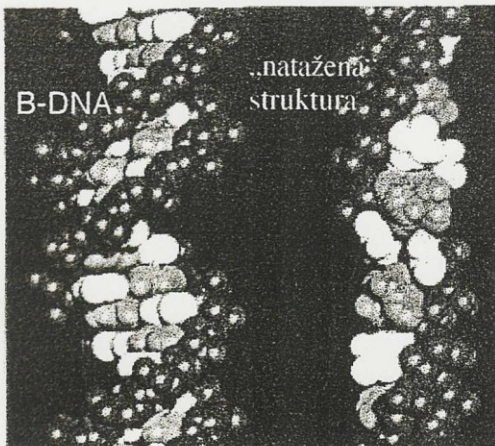
Cluzel, P. et al.,
Science 271, 792-5
(1996)

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 kontrované superhelicitě



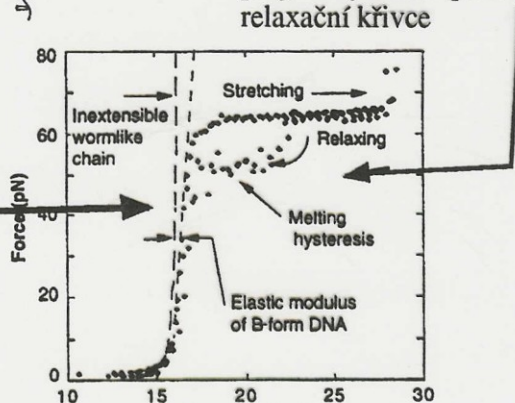
☞ molekula obsahující zlomy v řetězcích: „natahování“ indukuje -odvíjení v okolí zlomů, -přechod do „natažené“ konformace -a lokální denaturaci

☞ 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 ν s. délkou při konstantní σ nebo délkou ν s. σ 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:

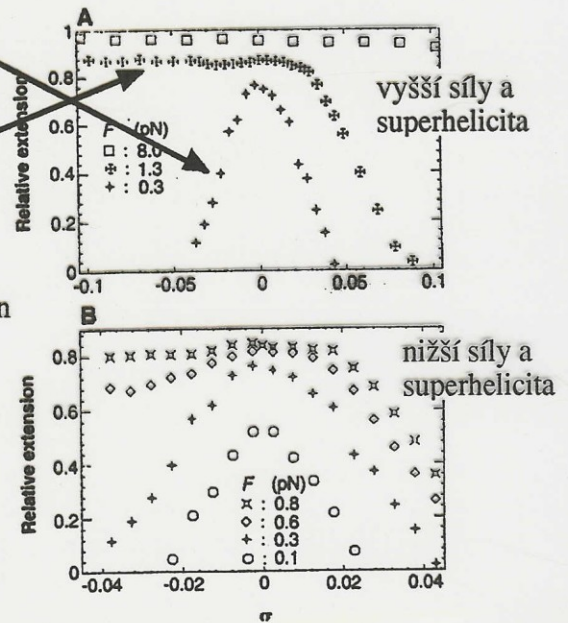
- symetrie chování při **malém napětí** (zkracování molekuly s rostoucí $|\sigma|$ při obou znaménkách superhelicity) souvisí se změnami ve „writu“

- vyšší **napětí** vede ke konverzi ΔW_r na ΔT_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 σ 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:

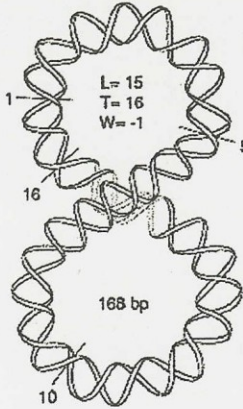
dva základní typy: *topoizomerázy I během reakce vytvoří a spojí jednořetězcový zlom.*
topoizomerázy II během reakce vytvoří a spojí dvouřetězcový zlom.

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	

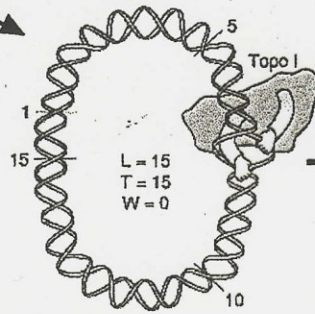
*)toto číselné označení nemá vztah k počtu přerušovaných řetězců během reakce!!!

Relaxace superhelikální DNA topoizomerázou typu I

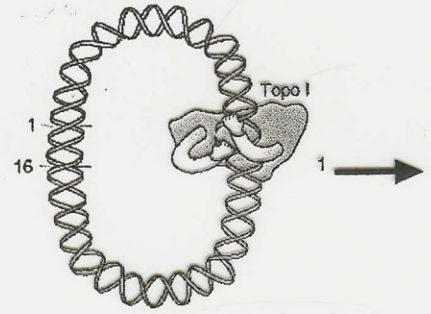
tyto dvě molekuly mají stejný topologický stav, (vlevo je $\Delta Lk = Wr = -1$ a $\Delta Tw = 0$; vpravo je molekula s $Wr = 0$, tj. planární kružnice, a má $\Delta Lk = \Delta Tw = -1$); odvinutí v místě vazby topoizomerázy je naznačeno z ilustrativních důvodů - enzym to takto doslova ve skutečnosti 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

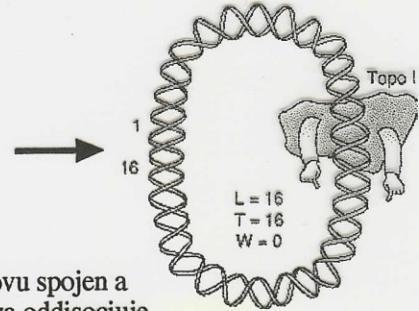


topoizomeráza se naváže kovalentně v místě, kde je vytvořen jednořetězcový zlom (obvykle hydroxylovou skupinou tyrozínu na 5' fosfát)



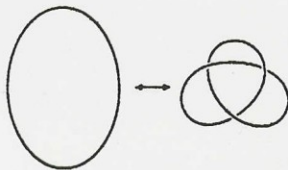
skrz zlom je přenesen druhý řetězec; tím dojde ke změně twistu o 1 (směrem k relaxaci) tj. nyní je $\Delta Wr = 0$ a $\Delta Tw = 0$, $\Rightarrow \Delta Lk = 0 \Rightarrow$ relaxovaná DNA

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

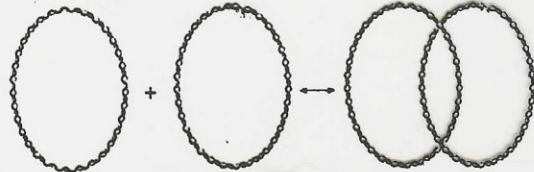


zlom je znovu spojen a topoizomeráza oddisociuje

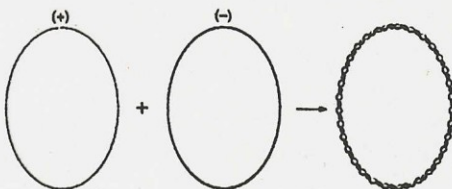
Další reakce katalyzované topoizomerázami typu I



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



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

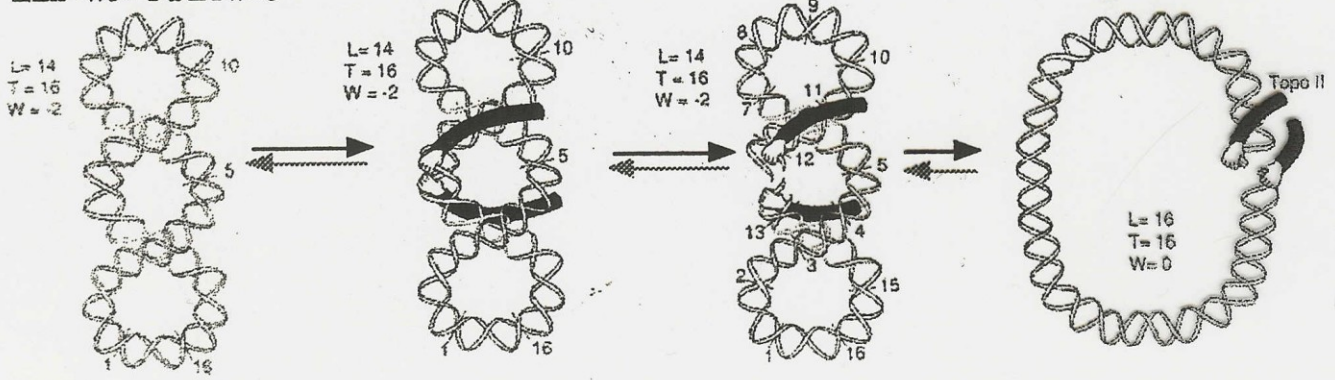


Tvorba duplexu ze dvou komplementárních jednořetězcových kovalentně uzavřených cyklických molekul:

(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

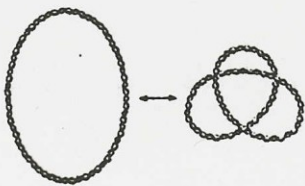


(i ty topoizomerázy typu II, které mohou DNA pouze relaxovat, jsou často ATP-dependentní)

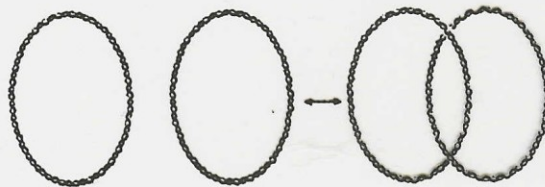
zlom je znovu spojen a topoizomeráza oddisociuje



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..)

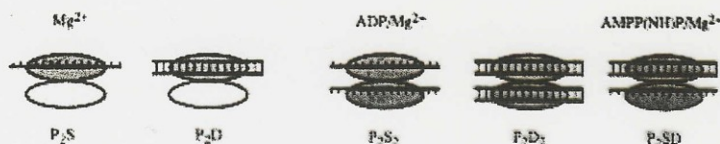
Vazba na DNA:

- aktivní mechanismus vyžaduje specifické interakce *jak s ss, tak ds DNA*
- u Rep je vazba na ssDNA *orientovaná ve směru polarity* cukrfofátového řetězce; polarita ss řetězce na rozhraní ss/ds DNA vázaného v P₂SD 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 P₂S, v přítomnosti ADP P₂S₂ a v přítomnosti nehydrolyzovatelných analogů ATP P₂SD

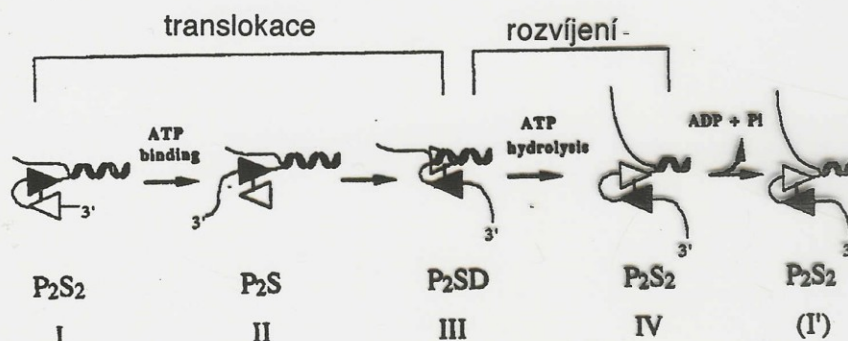
=> viz mechanismus



Mechanismus odvíjení:

I. Rep-helikáza vázaná na rozhraní ss/dsDNA v komplexu P₂S₂

II. vazba ATP indukují uvolnění ssDNA z toho monomeru, který váže ssDNA proti směru translokace, a vytvoření komplexu P₂SD (III).



IV. hydrolyza ATP vyvolá konformační změnu, která vede k odvinutí DNA a vzniku komplexu P₂S₂, 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)

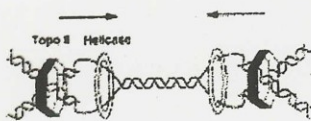
-*přeměňují chemickou energii ATP na energii mechanickou podobně jako „motorové“ proteiny (myosin, dynein), s nimiž mají některé společné strukturní rysy*

Součinnost helikáz a topoizomeráz

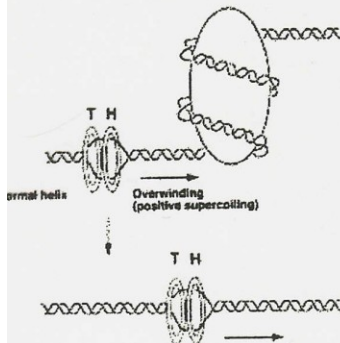
-řada procesů, spojených s rozvíjením DNA, představuje topologický problém, pokud je DNA kovalentně uzavřená kružnice nebo je rozdělena do uzavřených domén; v tom případě *rotace* odvíjených řetězců indukují *superhelicitu*, která musí být relaxována *topoizomerázami*



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



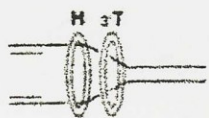
-**segregace replikovaných chromozómů** - ty jsou okolo sebe „omotány“ a jsou separovány topoizomerázou II



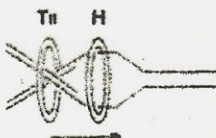
-**zrušení nukleozomové struktury** - vyžaduje zrušení negativní superhelicity, tedy vytvořením pozitivní nadšroubovice. Translokací helikázy podél DNA se vytváří „za“ helikázou negativní a „před“ helikázou pozitivní nadšroubovice (jako při transkripci). Pozitivní sc je absorbována zrušením nukleozomů,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

stejně funguje archaebakteriální reverzní gyráza

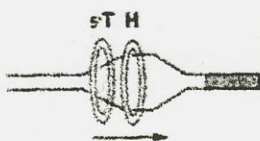
Možné „složené enzymy“ z helikáz a topoizomeráz:



„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

