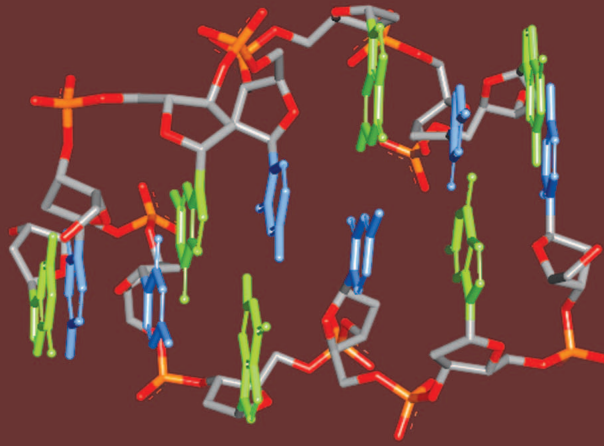


3



Η δομή των νουκλεϊκών οξέων

3.1 Μέγεθος και ευθραυστότητα του DNA

Το DNA των ευκαρυωτών εντοπίζεται στον κυτταρικό πυρήνα, ενώ το DNA των βακτηρίων και των αρχαίων εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Τα μόρια DNA διαφέρουν σε μέγεθος και σύσταση βάσεων. Τα μόρια DNA είναι εύθραυστα.

3.2 Αναγνώριση της αλληλουχίας στις μεγάλες και μικρές αύλακες

Ορισμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζουν ειδικά πρότυπα στη μεγάλη και στη μικρή αύλακα.

3.3 Η κάμψη του DNA

Ορισμένες αλληλουχίες βάσεων προκαλούν κάμψη του DNA.

3.4 Αποδιάταξη και επαναδιάταξη του DNA

Το DNA μπορεί να υποστεί αποδιάταξη.

Δεσμοί υδρογόνου σταθεροποιούν το δίκλωνο DNA.

Η στοιβαξη των βάσεων επίσης σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA.

Η ιοντική ισχύς επηρεάζει τη δομή του DNA.

Το μόριο DNA βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση.

Τα αλκαλικά διαλύματα αποδιάτassουν το DNA χωρίς διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Συμπληρωματικές αλυσίδες μπορούν να αναδιαταχτούν για να σχηματίσουν δίκλωνο DNA.

3.5 Οι ελικάσες

Οι ελικάσες είναι πρωτεΐνες-κινητήρες που χρησιμοποιούν την ενέργεια των τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων για να αποπεριελίσσουν νουκλεϊκά οξέα.

3.6 Πρωτεΐνες που προσδένονται σε μονόκλωνο DNA

Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA σταθεροποιούν το DNA στη μονόκλωνη μορφή του.

3.7 Τα τοποϊσομερή

Το DNA μπορεί να είναι κυκλικό.

Το γονιδίωμα των βακτηρίων συνήθως είναι ένα ομοιοπολικό κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA.

Το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιείται για την *in vitro* μελέτη του ομοιοπολικό κλειστού, κυκλικού δίκλωνου DNA.

Τα ομοιοπολικό κλειστά, κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA συχνά έχουν υπερελικωμένες δομές.

3.8 Οι τοποϊσομεράσες

Οι τοποϊσομεράσες καταλύουν τη μετατροπή ενός τοποϊσομερούς σε ένα άλλο.

3.9 Δομές διαφορετικές από το B-DNA

Το A-DNA είναι μια δεξιόστροφη διπλή έλικα με βαθιά μεγάλη αύλακα και πολύ ρηχή μικρή αύλακα.

Το Z-DNA είναι αριστερόστροφο.

Είναι πιθανό το DNA να εμφανίζει κι άλλες δομές *in vivo* εκτός από τη δομή B.

3.10 Η δομή του RNA

Το RNA επιτελεί πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες.

Η δευτεροταγής δομή του RNA καθορίζεται κυρίως από το ζευγάρισμα βάσεων κατά Watson-Crick.

Η τριτοταγής δομή ενός μορίου RNA σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής του.

3.11 Η υπόθεση του κόσμου του RNA

Οι πρώτες μορφές ζωής στη Γη πιθανόν να χρησιμοποιήσαν RNA τόσο ως γενετικό υλικό όσο και ως απαραίτητους βιολογικούς καταλύτες.

ΠΛΑΙΣΙΟ 3.2 ΕΜΒΑΘΥΝΟΝΤΑΣ: Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ

ΠΛΑΙΣΙΟ 3.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Ερωτήσεις και προβλήματα

Προτεινόμενη βιβλιογραφία

Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου εξετάζεται η δομή του B-DNA. Ειδικότερα, εξετάζεται το μέγεθος, η ευαισθησία στη θραύση, οι αύλακες, η αναδίπλωση, η αποδιάταξη, η επαναδιάταξη και η υπερελίκωση του DNA. Οι πληροφορίες αυτές χρησιμοποιούνται στη μελέτη ενζύμων που αποπεριελίσσουν το δίκλωνο DNA, πρωτεϊνών που σταθεροποιούν το μονόκλωνο DNA και ενζύμων που καταλύουν αλλαγές στις υπερελικωμένες δομές. Το B-DNA είναι η κυρίαρχη στερεοδιαμόρφωση του DNA μέσα στα κύτταρα. Ωστόσο, το DNA συναντάται και με άλλες στερεοδιαμορφώσεις, ορισμένες από τις οποίες καθώς και η πιθανή τους σημασία θα συζητηθούν παρακάτω.

Στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου εξετάζονται ορισμένες σημαντικές πτυχές της δομής του RNA. Οι δομικές μονάδες των ριβονουκλεοτιδίων συνδέονται με 5' → 3' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς για να σχηματίσουν γραμμικές πολυριβονουκλεοτιδικές αλυσίδες. Τα κύτταρα παράγουν αλυσίδες RNA, καθεμία από τις οποίες διαθέτει μοναδική νουκλεοτιδική αλληλουχία (πρωτοταγή δομή) και μέγεθος. Ορισμένα μόρια RNA μπορούν να εκτελέσουν τις λειτουργίες τους ως μονόκλωνες αλυσίδες χωρίς να διαθέτουν συγκεκριμένη ειδική δομή. Πολλά άλλα μόρια RNA διαθέτουν ειδικές δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές απαραίτητες για τη βιολογική τους δράση. Παρότι οι αλυσίδες RNA δεν έχουν την ευελιξία των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και τα νουκλεοτίδια που τις αποτελούν έχουν περιορισμένη ποικιλότητα σε σύγκριση με τις λειτουργικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, ορισμένα μόρια RNA αναδιπλώνονται και σχηματίζουν δομές οι οποίες προσδένονται σε ειδικά υποστρώματα και καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Επίσης, υπάρχουν μόρια RNA τα οποία αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες για να σχηματίσουν σταθερά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.

3.1 Μέγεθος και ευθραυστότητα του DNA

Το DNA των ευκαρυωτών εντοπίζεται στον κυτταρικό πυρήνα, ενώ το DNA των βακτηρίων και των αρχαίων εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

Τα μόρια DNA των ζωντανών οργανισμών και των ιών εμφανίζουν ευρύ φάσμα μεγέθους και σύστασης βάσεων. Τα έμβια όντα κατατάσσονται σε τρεις ομάδες: τους **ευκαρυώτες** (eukaryotes), τα βακτήρια και τα αρχαία. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν ένα διαμέρισμα που περικλείεται σε μεμβράνη, το οποίο ονομάζεται κυτταρικός πυρήνας και περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα του DNA του κυττάρου. Το DNA του κυτταρικού πυρήνα είναι

οργανωμένο σε χρωμοσώματα. Τα μόρια DNA περιεχίζονται γύρω από πρωτεϊνικά σύμπλοκα που αποτελούνται από βασικές πρωτεΐνες, τις **ιστόνες** (histones). Τα βακτήρια και τα αρχαία, τα οποία δε διαθέτουν κυτταρικό πυρήνα, συνήθως φέρουν ένα μόνο μόριο DNA μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα που δε διαθέτουν πυρήνα ονομάζονται **προκαρυώτες** (prokaryotes). Οι βιοχημικοί μηχανισμοί βακτηρίων και αρχαίων μοιάζουν μεταξύ τους στον ίδιο βαθμό που μοιάζουν και με τους αντίστοιχους μηχανισμούς των ευκαρυωτών.

Τα μόρια DNA διαφέρουν σε μέγεθος και σύσταση βάσεων.

Γνωρίζουμε το μέγεθος του DNA (σε ζεύγη βάσεων) πολλών ιών, βακτηρίων και ευκαρυωτών. Τα μόρια DNA που έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς ιούς εμφανίζουν μεγάλες διαφορές μεγέθους, ενώ το DNA των βακτηρίων σχετικά πολύ μικρότερες. Κάθε χρωμόσωμα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου περιλαμβάνει DNA χαρακτηριστικού μεγέθους. Στον **ΠΙΝΑΚΑ 3.1** αναγράφεται το μέγεθος μορίων DNA σε ζεύγη βάσεων από διάφορα είδη οργανισμών ή ιών. Το πραγματικό μήκος των δίκλωνων μορίων DNA μπορεί να υπολογιστεί με δεδομένο ότι δύο διαδοχικά ζεύγη βάσεων απέχουν κατά 0,34 nm. Επομένως τα μόρια DNA

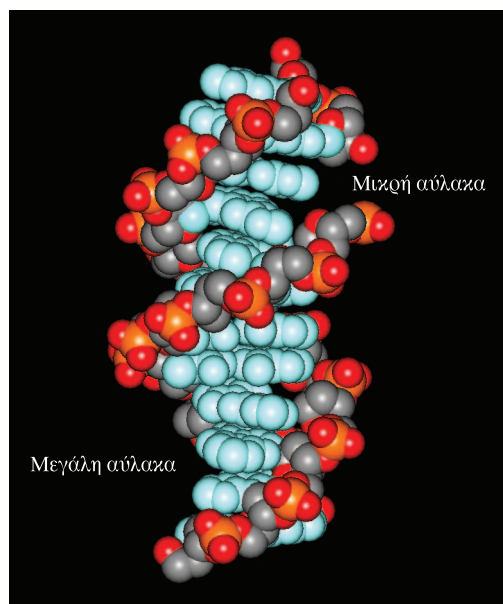
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 Μεγέθη διαφόρων μορίων DNA

Προέλευση του DNA	Μέγεθος σε ζεύγη βάσεων (bp)
Πλασμίδιο pBR322*	4.361
Ιός SV40 (Simian Virus 40)	5.200
Φάγος T7*	39.937
Φάγος λ*	48.502
Πλασμίδιο F*	99.159
Στέλεχος WR ιού δαμαλίτιδας	194.711
Ιός της φλυνκταινώδους νόσου των πτηνών (Fowlpox virus)	266.145
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580.073
Χρωμόσωμα IV του ζυμομύκητα	1.531.929
<i>Escherichia coli</i>	4.639.221
Ανθρώπινο χρωμόσωμα I	245.522.847
Σημείωση: Οι φάγοι (ιοί που μολύνουν βακτήρια) και τα πλασμίδια που επισημαίνονται με αστερίσκο είναι ξενιστές της <i>E. coli</i> . Το <i>Mycoplasma genitalium</i> είναι το μικρότερο γνωστό βακτήριο που επιβιώνει χωρίς ξενιστή. Στην περίπτωση του ζυμομύκητα και του ανθρώπου δίνεται ο αριθμός ζευγών βάσεων ενός χρωμοσώματος.	

του Πίνακα 3.1 ποικίλλουν σε μήκος από 1,48 μm για το DNA του πλασμιδίου pBR322 ως 83.500 μm (8,3 cm!) για το DNA του ανθρώπινου χρωμοσώματος 1. Γενικά, οι πιο σύνθετοι οργανισμοί χρειάζονται πολύ περισσότερο DNA από ό,τι οι απλούστεροι οργανισμοί, αν και αυτός ο κανόνας έχει εξαιρέσεις. Για παράδειγμα, τόσο τα κύτταρα του φρύνου όσο και του δίπνευστου ψαριού της Νοτίου Αμερικής διαθέτουν πολύ περισσότερο DNA από ό,τι τα ανθρώπινα κύτταρα.

Τα μόρια DNA είναι εύθραυστα.

Είναι πολύ εύκολο να προκληθεί θραύση ενός μορίου DNA από υδροδυναμικές δυνάμεις διάτμησης (μικρές δυνάμεις που δημιουργούνται όταν στιβάδες ενός ρευστού κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες) λόγω του μεγάλου μήκους και του σχετικά μικρού πλάτους του (2,0 nm). Απλοί εργαστηριακοί χειρισμοί όπως το πιπετάρισμα, η ροή και η ανάμειξη είναι ικανοί να παράγουν δυνάμεις διάτμησης που προκαλούν τη θραύση του DNA. Μόρια DNA μικρότερα των 300.000 bp (base pairs, ζευγών βάσεων) είναι συνήθως εφικτό να απομονωθούν χωρίς θραύσεις από ιούς. Αν η διαδικασία απομόνωσης δε γίνει πολύ προσεκτικά, τα μεγαλύτερα μόρια DNA σχεδόν πάντα κόβονται και το μέσο μήκος του απομονωμένου DNA είναι συνήθως περίπου 40.000 bp. Το βακτηριακό DNA, για παράδειγμα, διασπάται σε περίπου 50 με 100 κομμάτια κατά τη διαδικασία απομόνωσης.

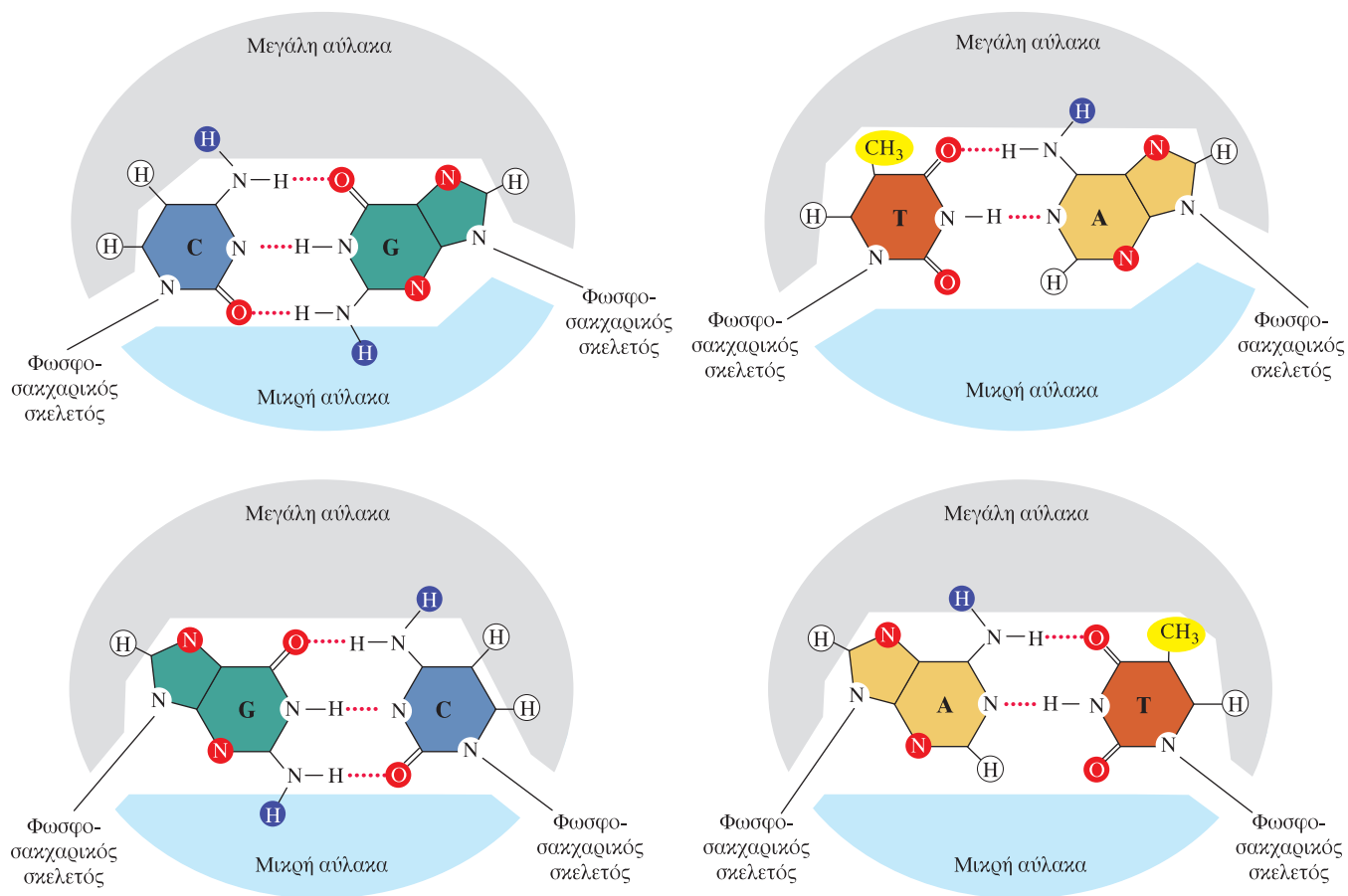


ΕΙΚΟΝΑ 3.1 Μεγάλη και μικρή αύλακα στο B-DNA. Χωροπληρωτική δομή του B-DNA στην οποία οι βάσεις φαίνονται με ανοιχτό μπλε, ενώ ο χρωματισμός των ατόμων του υπολοίπου μορίου ακολουθεί τον κώδικα χρωματισμού χημικών στοιχείων CPK (CPK coloring, Corey, Pauling, Koltun). [Πηγή: Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., and Dickerson, R. E. 1981. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:2179-2183.]

3.2 Αναγνώριση της αλληλουχίας στις μεγάλες και μικρές αύλακες

Ορισμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζουν ειδικά πρότυπα στη μεγάλη και στη μικρή αύλακα.

Με ποιον τρόπο ορισμένες πρωτεΐνες επιτυγχάνουν να αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων του DNA, παρόλο που αυτές βρίσκονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας; Ένας πιθανός τρόπος θα μπορούσε να προϋποθέτει την αποπερίλιξη των δύο αλυσίδων που σχηματίζουν την έλικα του DNA. Ενώ το δίκλωνο DNA πράγματι είναι δυνατόν να αποπεριλίσσεται υπό ορισμένες συνθήκες (βλ. 3.4), διάφορες πρωτεΐνες φαίνεται ότι διαθέτουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν αλληλουχίες βάσεων στη δομή της διπλής έλικας. Από την εξέταση του χωροπληρωτικού μοντέλου της δομής που απεικονίζεται στην **ΕΙΚΟΝΑ 3.1** αποκαλύπτεται ότι οι επιφάνειες

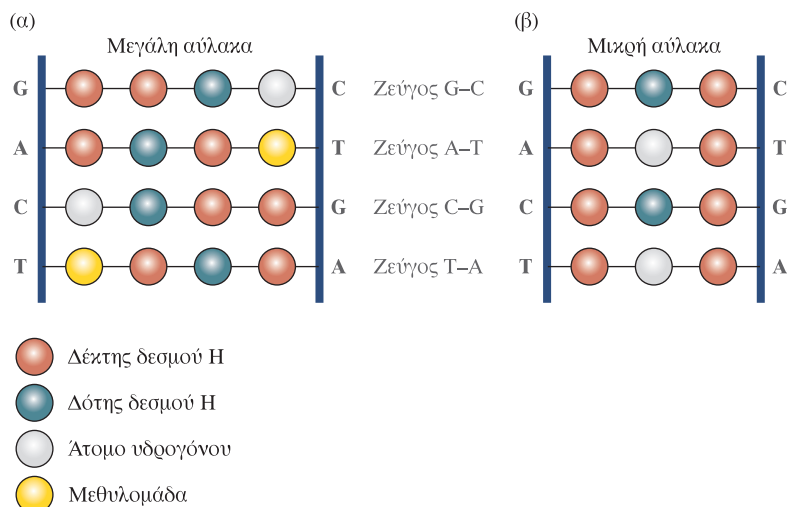


ΕΙΚΟΝΑ 3.2 Αναγνώριση ζευγών βάσεων στις επιφάνειες των μεγάλων και μικρών αυλάκων. Απεικονίζονται τα τέσσερα πιθανά ζεύγη βάσεων. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων απεικονίζονται με στικτή κόκκινη γραμμή. Οι εν δυνάμει δότες δεσμού υδρογόνου απεικονίζονται μπλε και οι εν δυνάμει δέκτες δεσμού υδρογόνου απεικονίζονται κόκκινοι. Η μη πολική μεθυλομάδα της θυμίνης είναι κίτρινη και τα άτομα υδρογόνου που συνδέονται με άτομα άνθρακα, και επομένως δεν μπορούν να σχηματίσουν δεσμό υδρογόνου, είναι λευκά. [Πηγή: C. Branden and J. Tooze, 1999. *Introduction to Protein Structure* (1st ed.).]

των μεγάλων και μικρών αυλάκων είναι προσβάσιμες. Οι αυλάκες αυτές δημιουργούνται επειδή οι δακτύλιοι των σακχάρων βρίσκονται πιο κοντά στη μία πλευρά του ζεύγους των βάσεων από ό,τι στην άλλη. Στις επιφάνειες των αυλάκων υπάρχουν δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου, μη πολικές μεθυλομάδες και άτομα υδρογόνου (**ΕΙΚΟΝΑ 3.2**). Καθένα από τα τέσσερα πιθανά ζεύγη βάσεων εμφανίζει ένα μοναδικό, χαρακτηριστικό «τοπίο» ή πρότυπο στην επιφάνεια της μεγάλης αυλάκας. Αντίθετα, στην επιφάνεια της μικρής αυλάκας τα ζεύγη βάσεων T • A και A • T εμφανίζουν όμοιο πρότυπο, όπως τα ζεύγη C • G και G • C (**ΕΙΚΟΝΑ 3.3**). Τα χαρακτηριστικά αυτά πρότυπα επιτρέπουν σε πρωτεΐνες να αναγνωρίζουν την αλληλουχία του DNA δημιουργώντας επαφές στην εξωτερική επιφάνεια της δίκλωνης έλικας.

ΕΙΚΟΝΑ 3.3 Κώδικας αναγνώρισης του DNA.

Χαρακτηριστικά πρότυπα δοτών δεσμού υδρογόνου, δεκτών δεσμού υδρογόνου, μεθυλομάδων και ατόμων υδρογόνου παρατηρούνται στις πλευρές των ζευγών βάσεων που εκτίθενται στις επιφάνειες της μεγάλης (α) ή της μικρής (β) αύλακας. Καθένα από τα τέσσερα πιθανά ζεύγη βάσεων εμφανίζει ένα μοναδικό πρότυπο δοτών δεσμού υδρογόνου, δεκτών δεσμού υδρογόνου, μεθυλομάδων και ατόμων υδρογόνου στη μεγάλη αύλακα. Ωστόσο, τα ζεύγη T • A και A • T καθώς και τα ζεύγη C • G και G • C παρουσιάζουν αντιστοίχως όμοιες χημικές ομάδες στη μικρή αύλακα. [Πηγή: C. Branden and J. Tooze, 1999. *Introduction to Protein Structure* (1st ed.).]



3.3 Η κάμψη του DNA

Ορισμένες αλληλουχίες βάσεων προκαλούν κάμψη του DNA.

Συνήθως, η νουκλεοτιδική αλληλουχία δεν επηρεάζει τη δομή του DNA. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις συμβαίνει το αντίθετο. Για παράδειγμα, οι σειρές τεσσάρων έως έξι διαδοχικών αδενινών, οι ονομαζόμενες **σειρές A** (A-tracts), προκαλούν κάμψη του DNA. Άλλες αλληλουχίες, όπως η 5'-RGCY-3', όπου R είναι μια πουρίνη και Y μια πυριμιδίνη, μπορούν επίσης να προκαλέσουν κάμψη. Επομένως η δομή του B-DNA μπορεί τοπικά να εμφανίζει μικρές αποκλίσεις από την κλασική δομή της γραμμικής διπλής έλικας.

3.4 Αποδιάταξη και επαναδιάταξη του DNA

Το DNA μπορεί να υποστεί αποδιάταξη.

Όταν προτάθηκε αρχικά το μοντέλο των Watson-Crick, πολλοί ερευνητές πίστεψαν ότι οι μακριές αλυσίδες του DNA δε θα μπορούσαν να αποπεριελιχθούν και επομένως ο πλήρης διαχωρισμός τους θα ήταν αδύνατος. Σε μια προσπάθεια να διασκεδάσουν αυτή την ανησυχία, οι βιοφυσικοί χημικοί επιχειρήσαν να δείξουν ότι η διαδικασία της αποπεριέλιξης μπορεί να πραγματοποιηθεί στον δοκιμαστικό σωλήνα. Η προσέγγιση ήταν να εκτεθεί το DNA σε έναν φυσικό ή χημικό παράγοντα ο οποίος θα διατάρασσε τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (βλ. παρακάτω) που συγκρατούν τα ζεύγη βάσεων συνδεδεμένα χωρίς όμως να διαταράξει τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι αρχικές προσπάθειες του Paul Doty και των συνεργατών του

στα τέλη της δεκαετίας του 1950 έδειξαν ότι, όταν θερμαίνονταν τα διαλύματα του DNA, μειωνόταν δραστικά το ιξώδες τους. Η παρατήρηση αυτή υποδήλωνε ότι η δομή της διπλής έλικας διαταράσσεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Φαινόταν πιθανό ότι η αλλαγή της δομής του DNA οφειλόταν στη μετατροπή της διπλής έλικας σε δύο ξεχωριστές μονές αλυσίδες. Τελικά, χρησιμοποιώντας διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις, αποδείχθηκε ότι, όταν ένα διάλυμα DNA θερμαίνεται, πράγματι οι αλυσίδες αποπεριελίσσονται και προκύπτουν δύο ξεχωριστές αλυσίδες. Για παράδειγμα, ο λόγος της μάζας προς το μήκος του DNA διπλασιάζεται όταν αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος. Επίσης, μια ειδική δεοξυριβονουκλεάση που δεν μπορεί να πέψει δίκλωνο DNA βρέθηκε πως είχε την ικανότητα να κόβει το DNA μετά την αύξηση της θερμοκρασίας του. Η μετάβαση από τη δομή της διπλής έλικας (φυσική κατάσταση, native state) στις τυχαία περιελιγμένες μονές αλυσίδες (κατάσταση αποδιάταξης, denatured state) ονομάζεται **αποδιάταξη** (denaturation).

Ο απλούστερος τρόπος παρατήρησης της αποδιάταξης του DNA είναι μέσω της παρακολούθησης της απορρόφησης υπεριώδους φωτός με μήκος κύματος 260 nm, λ_{260} . Η μέγιστη απορρόφηση των πουρινών και των πυριμιδινών των νουκλεϊκών οξέων παρατηρείται σε μήκος κύματος 260 nm. Η απορρόφηση στα 260 nm, A_{260} , είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση. Η τιμή της απορρόφησης A_{260} ενός διαλύματος δίκλωνου DNA με συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$ είναι 1,00 μονάδα. Επιπλέον, η ποσότητα του φωτός που απορροφάται από τα νουκλεϊκά οξέα εξαρτάται από τη δομή του μορίου. *Όσο μεγαλύτερη είναι η «τάξη» της δομής, τόσο λιγότερο είναι το φως που απορροφάται.* Επομένως το δίκλωνο DNA απορροφά λιγότερο φως από ό,τι απορροφούν οι δύο μεμονωμένες μονόκλωνες αλυσίδες από τις οποίες σχηματίζεται και οι αλυσίδες αυτές με τη σειρά τους απορροφούν λιγότερο φως από τα νουκλεοτίδια, όταν αυτά απελευθερώνονται με υδρόλυση. Για παράδειγμα, τρία διαλύματα δίκλωνου DNA, μονόκλωνου DNA και ελεύθερων νουκλεοτιδίων, συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$ το καθένα, έχουν τις ακόλουθες τιμές A_{260} :

Δίκλωνο DNA:	$A_{260} = 1,00$
Μονόκλωνο DNA:	$A_{260} = 1,37$
Ελεύθερα νουκλεοτίδια:	$A_{260} = 1,60$

Η αύξηση της απορρόφησης A_{260} που παρατηρείται κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA ονομάζεται **φαινόμενο της υπερχρωμικότητας** (hyperchromic effect).

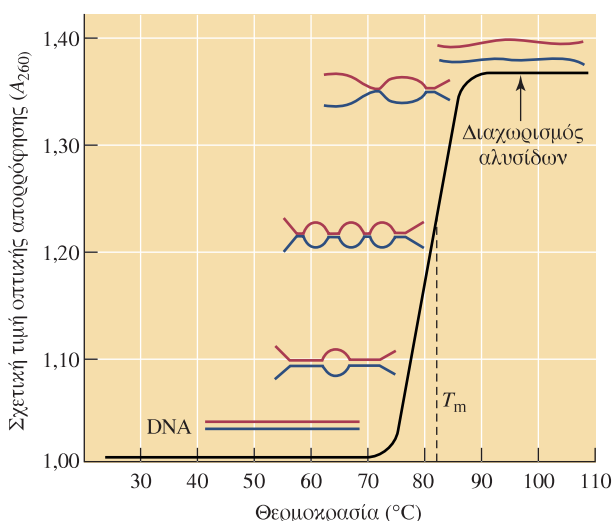
Όταν θερμαίνουμε DNA σε ένα αραιό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (π.χ. 0,15 M), η μεταβολή της οπτικής απορρόφησης A_{260}

σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκφράζει την καμπύλη αποδιάταξης ή τήξης του DNA (**ΕΙΚΟΝΑ 3.4**). Η καμπύλη αυτή έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Η A_{260} παραμένει σταθερή μέχρι να αυξηθεί η θερμοκρασία σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από όσο συναντάμε συνήθως στη φύση.
2. Η A_{260} αυξάνεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών 6 έως 8 °C.
3. Η μέγιστη τιμή A_{260} είναι περίπου 37% υψηλότερη από την αρχική τιμή.

Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται επίσης η κατάσταση των μορίων DNA σε διαφορετικά σημεία της καμπύλης αποδιάταξης. Πριν αρχίσει να αυξάνεται η A_{260} , τα μόρια είναι αποκλειστικά σε δίκλωνη μορφή. Στην περιοχή των θερμοκρασιών όπου παρατηρείται η αύξηση της A_{260} , οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζευγών βάσεων διαταράσσονται προοδευτικά όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Λίγο πριν η καμπύλη φτάσει στη μέγιστη, σταθερή τιμή (πλατό), παραμένουν ελάχιστες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που διατηρούν συνδεδεμένες τις δύο αλυσίδες μέχρι να φτάσει η θερμοκρασία στο κρίσιμο σημείο στο οποίο και οι τελευταίες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις διαταράσσονται, με αποτέλεσμα οι αλυσίδες να διαχωρίζονται πλήρως.

Μια πρακτική παράμετρος της κινητικής αποδιάταξης του DNA είναι η θερμοκρασία στην οποία η A_{260} έχει αυξηθεί κατά το ήμισυ. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται **θερμοκρασία τήξης** (melting temperature) και συμβολίζεται ως T_m .



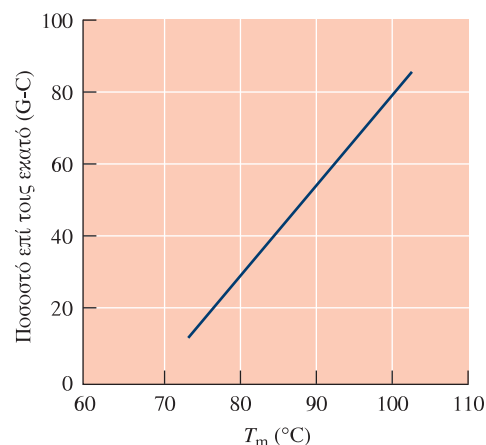
ΕΙΚΟΝΑ 3.4 Καμπύλη τήξης του DNA. Τυπική καμπύλη τήξης του DNA ως συνάρτηση της αύξησης της θερμοκρασίας. Σημειώνεται η θερμοκρασία τήξης (T_m) και οι πιθανές μοριακές στερεοδιαμορφώσεις του DNA στις διάφορες φάσεις της αποδιάταξης.

Κατά τη μελέτη του διαχωρισμού των αλυσίδων προέκυψε και άλλη μια σημαντική αποκάλυψη. Αν ένα διάλυμα DNA θερμανθεί ως ένα σημείο όπου οι περισσότερες αλλά όχι όλες οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις διαταραχτούν και στη συνέχεια αφεθεί να ψυχθεί μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, η A_{260} πέφτει στην αρχική τιμή, η οποία αντιστοιχεί στη μη αποδιαταγμένη μορφή του DNA. Πρόσθετα πειράματα έδειξαν πως με τον τρόπο αυτό αποκαθίσταται η φυσική δομή του DNA. Επομένως, αν ο διαχωρισμός των αλυσίδων δεν είναι πλήρης και σταματήσουν να υφίστανται οι συνθήκες που προκαλούν την αποδιάταξη, υιοθετείται ξανά η φυσική δομή της δίκλωνης έλικας. Κατά παρόμοιο τρόπο, αν δύο διαχωρισμένες αλυσίδες έρθουν σε επαφή και σχηματίσουν έστω και ένα ζεύγος βάσεων στη σωστή θέση στο μόριο, είναι δυνατόν να επανασχηματιστεί το φυσικό μόριο DNA. Θα επανέλθουμε σε αυτό το φαινόμενο παρακάτω, όταν θα περιγράψουμε την αναδιάταξη.

Δεσμοί υδρογόνου σταθεροποιούν το δίκλωνο DNA.

Το 1962 οι Julius Marmur και Paul Doty απομόνωσαν DNA από διαφορετικά είδη βακτηρίων με διαφορετική περιεκτικότητα G + C, η οποία κυμαινόταν από 20% έως 80%. Οι τιμές T_m αυτών των μορίων DNA προσδιορίστηκαν και απεικονίστηκαν σε γράφημα σε συνάρτηση με το ποσοστό G + C (ΕΙΚΟΝΑ 3.5). Να σημειωθεί ότι η T_m αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού G + C. Η σχέση αυτή εξηγείται αν υποθέσουμε ότι οι δεσμοί υδρογόνου ευθύνονται τουλάχιστον μερικώς για τη σταθεροποίηση της δίκλωνης δομής. Χρειάζεται περισσότερη ενέργεια για να διασπαστούν οι τρεις δεσμοί υδρογόνου σε ένα ζεύγος βάσεων G • C από ό,τι για να διασπαστούν οι δύο δεσμοί υδρογόνου σε ένα ζεύγος βάσεων A • T.

Μετρήσεις των τιμών T_m παρουσία ενός αποδιατακτικού παράγοντα ο οποίος μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με βάσεις του DNA, όπως η ουρία (NH_2CONH_2) ή το φορμαμίδιο (HCONH_2), είναι επίσης σύμφωνες με τον ρόλο των δεσμών υδρογόνου στη σταθεροποίηση της δίκλωνης δομής. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων είναι πολύ χαμηλής ενέργειας και διασπώνται σχετικά εύκολα. Ωστόσο, οι δεσμοί υδρογόνου μπορούν και να ξανασχηματιστούν ταχύτατα (βλ. παρακάτω). Οι αποδιατακτικοί παράγοντες μετατοπίζουν αυτή την κατάσταση ισορροπίας σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με μια μη ζευγαρωμένη βάση στη μία αλυσίδα, εμποδίζοντας έτσι τη βάση να ξανασχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τη συμπληρωματική της μη ζευγαρωμένη βάση στην απέναντι αλυσίδα. Επομένως οι αποδιατακτικοί παράγοντες διατηρούν τη μη ζευγαρωμένη κατάσταση ακόμα και σε σχετικά χαμηλές



ΕΙΚΟΝΑ 3.5 Επίδραση του περιεχομένου G-C στη θερμοκρασία τήξης του DNA. Η T_m αυξάνεται με την αύξηση του ποσοστού G + C. Το διάλυμα του DNA περιέχει 0,15 M χλωριούχο νάτριο και 0,015 M κιτρικό νάτριο.

θερμοκρασίες στις οποίες οι συμπληρωματικές μη ζευγαρωμένες βάσεις φυσιολογικά θα αναμενόταν να ξαναζευγαρωθούν. Συνεπώς παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων για την τήξη ενός τμήματος ζευγαρωμένων βάσεων χρειάζεται δαπάνη λιγότερης θερμικής ενέργειας και έτσι η T_m μειώνεται.

Η στοίβαξη των βάσεων επίσης σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA.

Στη δομή της διπλής έλικας τα επίπεδα που ορίζονται από τους δακτυλίους των βάσεων τοποθετούνται παράλληλα το ένα πάνω στο άλλο δημιουργώντας μια στοίβα. Στις δυνάμεις που σταθεροποιούν τη στοίβαξη των βάσεων στη διπλή έλικα συμπεριλαμβάνονται οι δυνάμεις van der Waals και οι υδρόφοβες επιδράσεις. Δε γνωρίζουμε την ακριβή συνεισφορά καθεμιάς από αυτές τις μη ισχυρές αλληλεπιδράσεις ξεχωριστά στη σταθερότητα της έλικας, διότι είναι αδύνατο να τροποποιηθεί η δομή του DNA ώστε να ελεγχθεί με ανεξάρτητο τρόπο καθεμία από αυτές τις αλληλεπιδράσεις.

Τόσο η στοίβαξη των βάσεων όσο και οι δεσμοί υδρογόνου είναι αδύναμες μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και ως εκ τούτου διαταράσσονται εύκολα από τη θερμική κίνηση. Οι δυνάμεις στοίβαξης ενισχύονται στις περιπτώσεις που οι βάσεις δεν μπορούν να αλλάξουν κλίση ή να περιστραφούν έξω από τη στοίβα. Αντίστοιχα, ο μέγιστος βαθμός σύνδεσης με δεσμούς υδρογόνου συμβαίνει όταν όλες οι βάσεις έχουν τον ιδανικό προσανατολισμό. Είναι εμφανές ότι οι μη ισχυρές αλληλεπιδράσεις ενισχύουν η μία την άλλη. Οι στοιβαγμένες βάσεις σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου ευκολότερα και, αντίστοιχα, οι βάσεις που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου αποκτούν σταθερό προσανατολισμό και στοιβάζονται ευκολότερα. Το γεγονός ότι, αν μία από τις αλληλεπιδράσεις εξουδετερωθεί, η άλλη γίνεται πιο αδύναμη εξηγεί τη σημαντική μείωση της T_m από την επίδραση ενός παράγοντα που καταστρέφει οποιονδήποτε από τους δύο τύπους αλληλεπιδράσεων.

Η ιοντική ισχύς επηρεάζει τη δομή του DNA.

Εκτός από τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαδοχικών βάσεων στην ίδια αλυσίδα και μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων στις απέναντι αλυσίδες, η δομή του DNA επηρεάζεται και από την ηλεκτροστατική απώση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων. Η ισχυρή αυτή απωστική δύναμη εξουδετερώνεται όταν το DNA τοποθετηθεί σε ένα διάλυμα ηλεκτρολυτών, όπως είναι το χλωριούχο νάτριο. Το άλας επιδρά στις απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις ως εξής: Απουσία του άλατος

οι αλυσίδες απωθούν η μία την άλλη, προκαλώντας τον εύκολο διαχωρισμό τους. Καθώς προστίθεται το άλας, θετικά φορτισμένα ιόντα, όπως είναι το Na^+ , σχηματίζουν «νέφη» θετικού φορτίου γύρω από τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Τα «νέφη» αυτά δρουν ως μόνωση μεταξύ των φωσφορικών ομάδων των δύο αλυσίδων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η T_m . Τελικά, όλες οι φωσφορικές ομάδες μονώνονται και οι απωστικές δυνάμεις εξουδετερώνονται τελείως όταν η συγκέντρωση του άλατος πλησιάζει σε 0,2 M. Ωστόσο, η T_m συνεχίζει να αυξάνεται σε συνάρτηση με την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου, διότι μειώνεται η διαλυτότητα των πουρινών και των πυριμιδινών, ενισχύοντας έτσι την ένταση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Το μόριο DNA βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της δομής του μορίου DNA παρατηρείται παρουσία φορμαλδεϋδης (HCHO). Η φορμαλδεϋδη αλληλεπιδρά με τις ομάδες NH_2 των βάσεων και εξουδετερώνει την ικανότητά τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Όταν η φορμαλδεϋδη αλληλεπιδρά με δίκλωνο DNA, το DNA αποδιατάσσεται με αργό ρυθμό και μη αντιστρεπτά. Επειδή οι αμινομάδες των βάσεων αντιδρούν με τη φορμαλδεϋδη, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, τα ζεύγη βάσεων πρέπει συνεχώς να χωρίζονται και να ξανασχηματίζονται (δηλαδή οι δεσμοί υδρογόνου πρέπει να σπάνε και να ξαναδημιουργούνται). Ένα σχετικό φαινόμενο παρατηρείται όταν δίκλωνο DNA διαλυθεί σε τριτιωμένο νερό ($[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$). Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε ταχεία ανταλλαγή των πρωτονίων των βάσεων που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου και των ιόντων τριτίου του νερού.

Οι δύο παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι το DNA είναι μια δυναμική δομή όπου οι δίκλωνες περιοχές συχνά ανοίγουν για να σχηματίσουν μονόκλωνες θηλιές και στη συνέχεια ξανακλείνουν. Αυτή η παροδική τοπική τήξη ονομάζεται «αναπνοή» του DNA (DNA breathing). Επειδή ένα ζεύγος βάσεων $G \cdot C$ διαθέτει τρεις δεσμούς υδρογόνου ενώ ένα ζεύγος βάσεων $A \cdot T$ μόνο δύο δεσμούς υδρογόνου, η παροδική τήξη συμβαίνει συχνότερα σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη $A \cdot T$ από ό,τι σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη $G \cdot C$.

Τα αλκαλικά διαλύματα αποδιατάσσουν το DNA χωρίς διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών.

Η επίδραση υψηλής θερμοκρασίας συχνά χρησιμοποιείται για την παρασκευή αποδιαταγμένου DNA, απαραίτητου σε πολλά

πειραματικά πρωτόκολλα. Ωστόσο, η έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία μπορεί να προκαλέσει τη διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών, με αποτέλεσμα το προϊόν να είναι συχνά ένα σύνολο τεμαχισμένων μονόκλωνων αλυσίδων. Το πρόβλημα της αποδόμησης του DNA μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας μια άλλη μέθοδο για την αποδιάταξη του DNA. Η επίδραση ενός αλκαλικού διαλύματος, όπως του υδροξειδίου του νατρίου, απομακρύνει πρωτόνια από τα άτομα αζώτου των δακτυλίων γουανίνης και θυμίνης, προκαλώντας την αποδιάταξη του DNA. Επειδή το DNA είναι αρκετά ανθεκτικό στην αλκαλική υδρόλυση, η διαδικασία αυτή είναι η βέλτιστη μέθοδος για να προκληθεί αποδιάταξη στο DNA. Όξινα αντιδραστήρια επίσης προκαλούν αποδιάταξη του DNA, αλλά σπάνια χρησιμοποιούνται γι' αυτόν τον σκοπό, διότι προκαλούν την αποκοπή των πουρινικών ομάδων από την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως **αποπουρίνωση** (depurination).

Συμπληρωματικές αλυσίδες μπορούν να αναδιαταχτούν για να σχηματίσουν δίκλωνο DNA.

Ένα διάλυμα αποδιαταγμένου DNA μπορεί να υποστεί την κατάλληλη μεταχείριση ώστε να ξανασχηματιστεί η φυσική δομή του DNA. Η διαδικασία ονομάζεται **επαναδιάταξη του DNA** (DNA renaturation) ή **αναδιάταξη του DNA** (DNA reannealing) και το δίκλωνο μόριο που προκύπτει ονομάζεται **αναδιαταγμένο DNA** (renatured DNA). Η απορρόφηση A_{260} ενός διαλύματος DNA μειώνεται κατά την επαναδιάταξη, αλλαγή που είναι γνωστή ως **φαινόμενο της υποχρωμικότητας** (hypochromic effect). Η επαναδιάταξη αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στη μοριακή βιολογία. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί η γενετική συγγένεια μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, να ανιχνευτούν ορισμένα είδη RNA, να προσδιοριστεί αν κάποια αλληλουχία συναντάται περισσότερες από μία φορές στο γονιδίωμα ενός οργανισμού και να εντοπιστεί η ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλουχιών σε ένα μόριο DNA. Για να συμβεί η επαναδιάταξη, πρέπει να ισχύουν δύο προϋποθέσεις:

1. Η συγκέντρωση ιόντων πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε να εξουδετερώνεται η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ των φωσφορικών ομάδων των δύο αλυσίδων. Συνήθως χρησιμοποιείται NaCl σε συγκέντρωση 0,15 έως 0,50 M.
2. Η θερμοκρασία πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε να μην είναι σταθεροί οι μη ειδικοί δεσμοί υδρογόνου που είναι πιθανό να σχηματιστούν μεταξύ βάσεων της ίδιας ή διαφορετικών αλυσίδων (ενδομοριακοί ή διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου). Ωστόσο, η θερμοκρασία δεν μπορεί να είναι πάρα πολύ υψηλή, ειδικά το ζευγάρι των βάσεων

μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων δε θα είναι σταθερό. Η ιδανική θερμοκρασία για την επαναδιάταξη είναι 20-25 °C κάτω από την τιμή T_m .

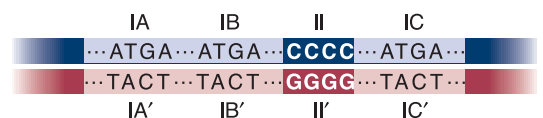
Η αναδιάταξη είναι μια αργή διεργασία σε σύγκριση με την αποδιάταξη. Το βήμα που επιβραδύνει τη διεργασία δεν είναι η επαναπεριέλιξη, η οποία συμβαίνει περίπου με την ίδια ταχύτητα όπως και η αποπεριέλιξη, αλλά η δημιουργία επαφών μεταξύ των συμπληρωματικών αλυσίδων με ακρίβεια, έτσι ώστε να σχηματιστούν με σωστό τρόπο τα ζεύγη βάσεων. Επειδή η επαναδιάταξη είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά τυχαίων κινήσεων, είναι μια διεργασία που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Στις συγκεντρώσεις που συνήθως χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο, η επαναδιάταξη διαρκεί αρκετές ώρες.

Οι λεπτομέρειες της διαδικασίας της επαναδιάταξης μπορούν να κατανοηθούν αν παρουσιάσουμε ένα υποθετικό μόριο το οποίο περιλαμβάνει μια αλληλουχία που επαναλαμβάνεται πολλές φορές (**EIKONA 3.6**). Ας υποθέσουμε ότι η κάθε μονή αλυσίδα αποτελείται από 50.000 νουκλεοτίδια και ότι οι αλληλουχίες των βάσεων τους είναι συμπληρωματικές. Σε ένα τέτοιο μόριο, οποιαδήποτε μικρή αλληλουχία βάσεων (ας πούμε 4-6 βάσεων) είναι βέβαιο ότι θα εμφανίζεται πολλές φορές, παρέχοντας εναλλακτικές θέσεις για ζευγάρωμα βάσεων. Η τυχαία επαφή μεταξύ μη συμπληρωματικών αλληλουχιών, όπως της IA με την II', θα είναι αναποτελεσματική, αλλά μια επαφή της IA με την IC' θα καταλήξει σε ζευγάρωμα βάσεων. Ωστόσο, αυτό το ζευγάρωμα θα είναι παροδικό, διότι οι βάσεις που περιβάλλουν αυτές τις βραχείες συμπληρωματικές αλληλουχίες δεν μπορούν να ζευγαρωθούν και επομένως δε θα επιτευχθεί η στοίβαξη βάσεων που προσδίδει σταθερότητα στη δομή της διπλής έλικας. Στη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για την επαναδιάταξη, αυτές οι ζευγαρωμένες περιοχές διαταράσσονται ταχύτατα. Όταν όμως ζευγαρώσουν δύο αλληλουχίες, για παράδειγμα η IB και η IB', οι παρακείμενες βάσεις επίσης θα ζευγαρώσουν ταχύτατα και ολόκληρο το δίκλωνο μόριο DNA θα κλείσει σαν φερμουάρ σε λίγα δευτερόλεπτα.

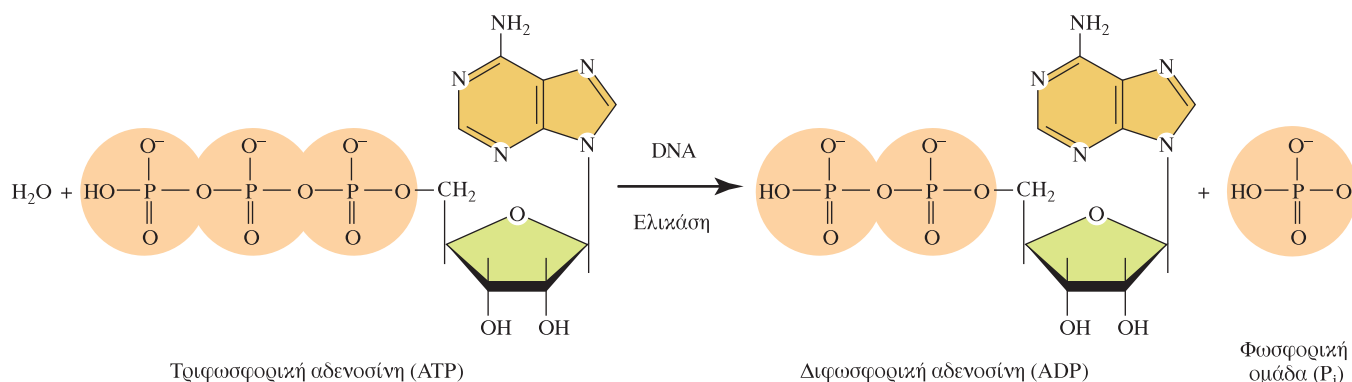
3.5 Οι ελικάσες

Οι ελικάσες είναι πρωτεΐνες-κινητήρες που χρησιμοποιούν την ενέργεια των τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων για να αποπεριελίσσουν νουκλεϊκά οξέα.

Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής το δίκλωνο DNA πρέπει να αποπεριελιχθεί. Στα κύτταρα υπάρχουν ειδικά ένζυμα που δρουν



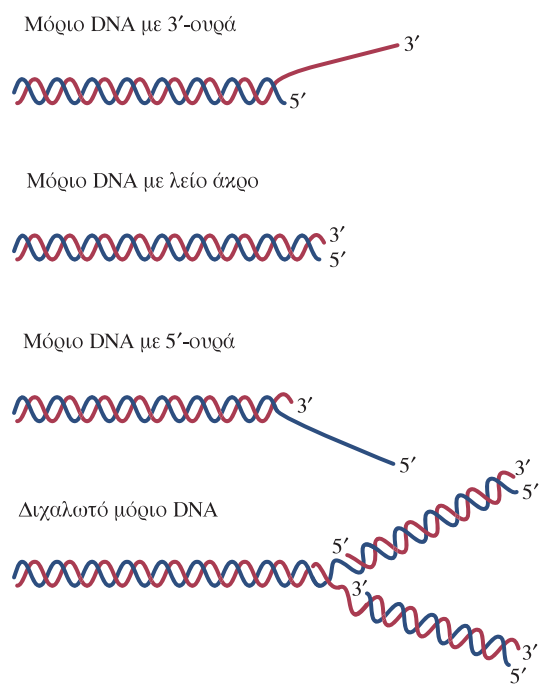
EIKONA 3.6 Ανάλυση του μοριακού μηχανισμού της επαναδιάταξης ενός υποθετικού μορίου DNA. Έστω ένα υποθετικό μόριο DNA που φέρει πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας I (IA, IB και IC) και ένα μοναδικό αντίγραφο της αλληλουχίας II. Ο μηχανισμός αναδιάταξης συζητείται στο κείμενο.



ΕΙΚΟΝΑ 3.7 DNA-εξαρτώμενη υδρόλυση του ATP από μια ελικάση.

ως «μοριακοί κινητήρες» και ονομάζονται **ελικάσες** (helicases). Αυτά καταλύουν την αποπεριέλιξη του δίκλωνου DNA σε μια αντίδραση που εξαρτάται από τριφωσφορικά νουκλεοσίδια. Οι ελικάσες συχνά περιλαμβάνονται σε μεγαλύτερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και η ενεργότητά τους επηρεάζεται από άλλες πρωτεΐνες του συμπλόκου.

Η ανίχνευση ενεργότητας φωσφατάσης τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων εξαρτώμενης από το DNA σε ένα εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων αποτελεί ισχυρή ένδειξη παρουσίας ελικάσης. Μια φωσφατάση τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων καταλύει τη μετατροπή τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων σε διφωσφορικά νουκλεοσίδια και ανόργανο φώσφορο (**ΕΙΚΟΝΑ 3.7**). Μια πιο αξιόπιστη ένδειξη είναι η εξαρτώμενη από τριφωσφορικά νουκλεοσίδια αποπεριέλιξη δίκλωνου DNA. Από αυτή την ενεργότητα προκύπτει μονόκλωνο DNA, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να ανιχνευτεί από την ευαισθησία του σε νουκλεάσες ειδικές για μονόκλωνο DNA. Οι ελικάσες δείχνουν προτίμηση για νουκλεϊκά οξέα με ειδικά δομικά χαρακτηριστικά (**ΕΙΚΟΝΑ 3.8**). Ορισμένες, για να δράσουν, χρειάζονται διχάλα στο μόριο DNA, άλλες δρουν σε DNA με προεξέχοντα άκρα 3' ή 5', ενώ άλλες δρουν σε λεία άκρα DNA. Ορισμένες ελικάσες του DNA μετακινούνται κατά μήκος της αλυσίδας DNA με κατεύθυνση 3' → 5', ενώ άλλες μετακινούνται με κατεύθυνση 5' → 3'.



ΕΙΚΟΝΑ 3.8 Διαφορετικοί τύποι ελικάσων προτιμούν ως υπόστρωμα διαφορετικές δομές DNA.

Τουλάχιστον 14 διαφορετικές ελικάσες έχουν απομονωθεί από βακτήρια *Escherichia coli*, 6 από ιούς βακτηρίων, 15 από ζυμομύκητες, 8 από φυτά και 24 από ανθρώπινα κύτταρα. Μια ATP-εξαρτώμενη ελικάση της *E. coli* αποτελούμενη από έξι όμοιες υπομονάδες εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αντιγραφή του βακτηριακού DNA. Η ελικάση αυτή ονομάζεται **ελικάση DnaB** (DnaB helicase) από το γονίδιο *dnaB* που την κωδικοποιεί. Η *DnaB* σχηματίζει δακτύλιο γύρω από τη μία αλυσίδα στη διχάλα αντιγραφής ενός

μορίου DNA και, καθώς μετακινείται με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$ κατά μήκος αυτής της αλυσίδας, την αποσπά από την άλλη αλυσίδα, αποδιατάσσοντας έτσι το DNA (**ΕΙΚΟΝΑ 3.9**).

3.6 Πρωτεΐνες που προσδένονται σε μονόκλωνο DNA

Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA σταθεροποιούν το DNA στη μονόκλωνη μορφή του.

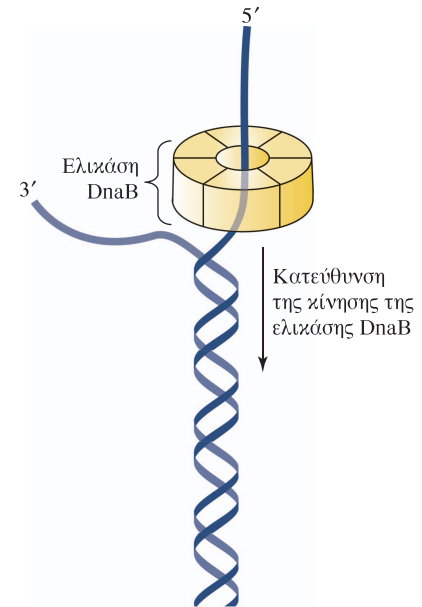
Οι **πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA** (SSB proteins, Single-Stranded Binding proteins) σταθεροποιούν τις μονόκλωνες περιοχές που σχηματίζονται από την επίδραση των ελικασών στο δίκλωνο DNA. Οι πρωτεΐνες SSB είναι απαραίτητες στον μεταβολισμό του DNA και απαντώνται σε όλα τα είδη κυττάρων. Ορισμένες SSB αποτελούνται από ένα πολυπεπτίδιο, άλλες περιλαμβάνουν δύο ή περισσότερες όμοιες πολυπεπτιδικές υπομονάδες και άλλες αποτελούνται από διαφορετικές πολυπεπτιδικές υπομονάδες. Παρά τη δομική τους ποικιλότητα, όλες οι SSB διαθέτουν μια κοινή ιδιότητα: προσδένονται πιο ισχυρά σε μονόκλωνο DNA από ό,τι σε δίκλωνο DNA ή RNA.

Ο Bruce Alberts και οι συνεργάτες του απομόνωσαν την πρώτη βακτηριακή πρωτεΐνη SSB, ένα ομοτετραμερές με μοριακή μάζα 75 kDa, από την *E. coli* το 1972. Κάθε υπομονάδα διαθέτει μία επικράτεια πρόσδεσης σε ολιγονουκλεοτίδια. Το κύτταρο του βακτηρίου διαθέτει περίπου 800 τετραμερή σύμπλοκα SSB. Όταν μία τετραμερής πρωτεΐνη SSB της *E. coli* προσδεθεί σε αποδιαταγμένο DNA, διευκολύνεται η πρόσδεση στο DNA και άλλων τετραμερών πρωτεϊνών SSB (**ΕΙΚΟΝΑ 3.10**). Δηλαδή οι τετραμερείς πρωτεΐνες SSB της *E. coli* προσδένονται με συνέργεια. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών SSB αποσταθεροποιεί τη διπλή έλικα και προκαλεί μείωση της θερμοκρασίας τήξης. Οι ευκαρυώτες διαθέτουν ένα διαφορετικό είδος πρωτεΐνης SSB. Η ευκαρυωτική πρωτεΐνη SSB αποτελείται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες και ονομάζεται **πρωτεΐνη αντιγραφής A** (RPA, Replication Protein A).

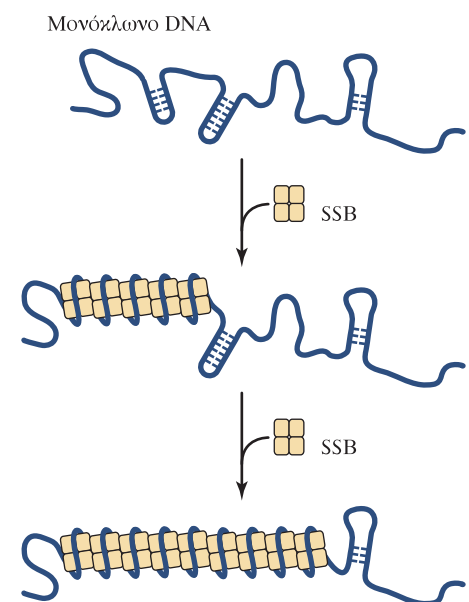
3.7 Τα τοποϊσομερή

Το DNA μπορεί να είναι κυκλικό.

Τα άκρα ενός γραμμικού δίκλωνου μορίου DNA μπορούν να συνδεθούν με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς για να σχηματιστεί ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA



ΕΙΚΟΝΑ 3.9 Αποπεριέλιξη από τη βακτηριακή ελικάση DnaB.

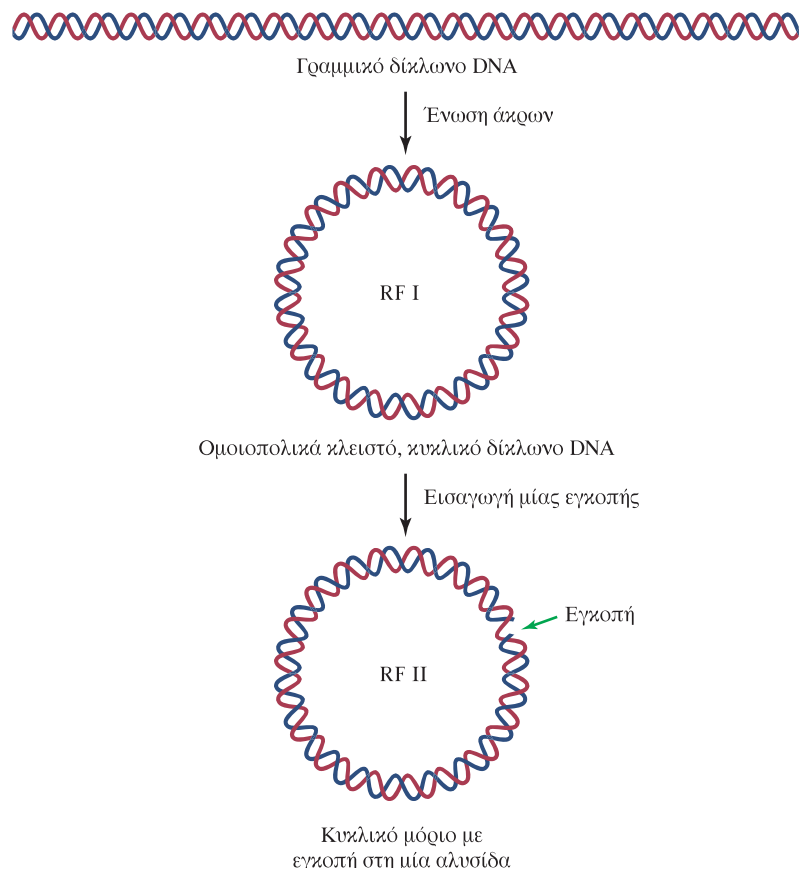


ΕΙΚΟΝΑ 3.10 Πρόσδεση πρωτεϊνών SSB της *E. coli* σε μονόκλωνο DNA με συνέργεια.

(ΕΙΚΟΝΑ 3.11). Στην περίπτωση αυτή, η *κυκλικότητα* δεν έχει την έννοια του γεωμετρικού κύκλου, αλλά σημαίνει ότι το DNA είναι μια συνεχής αλυσίδα δίχως ελεύθερα άκρα. Κατά σύμβαση, ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA έχει καθιερωθεί να ονομάζεται **αντιγραφόμενη μορφή I** (RFI, *Replicating Form I*), ενώ ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA με μια εγκοπή στη μία αλυσίδα έχει ονομαστεί **αντιγραφόμενη μορφή II** (RFII, *Replicating Form II*).

Το γονιδίωμα των βακτηρίων συνήθως είναι ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA.

Η ύπαρξη ομοιοπολικά κλειστών, κυκλικών δίκλωνων μορίων DNA δεν είχε παρατηρηθεί για πολλά χρόνια εξαιτίας της θραύσης των μεγάλων μορίων κατά την απομόνωσή τους. Ο John Cairns ήταν ο πρώτος που εντόπισε κυκλικά μόρια DNA σε βακτήρια. Το πείραμα που διεξήγαγε το 1963 είχε σχεδιαστεί για να απομονωθεί ακέραιο κι όχι σε τμήματα το βακτηριακό DNA. Είχε την προσδοκία ότι με το πείραμά του θα αποκαλυπτόταν αν τα βακτήρια έχουν ένα μοναδικό μεγάλο χρωμόσωμα ή πολλά χρωμοσώματα μικρότερου μεγέθους. Προηγούμενες παρόμοιες



ΕΙΚΟΝΑ 3.11 Ομοιοπολικά κλειστοί κύκλοι και κύκλοι με εγκοπή. Τα άκρα ενός γραμμικού δίκλωνου μορίου DNA μπορούν να συνδεθούν με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς για να σχηματιστεί ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA. Κατά σύμβαση, το ακέραιο κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA ονομάζεται RFI (αντιγραφόμενη μορφή I). Η μορφή RFI μετατρέπεται στη μορφή RFII αν εισαχθεί έστω και μία εγκοπή (πράσινο βέλος) στη μία αλυσίδα του ομοιοπολικά κλειστού, κυκλικού δίκλωνου μορίου DNA.

προσπάθειες άλλων ερευνητών είχαν αποτύχει λόγω της μεγάλης ευθραυστότητας του DNA. Ο Cairns συνειδητοποίησε ότι χρειαζόταν μια πολύ ήπια μέθοδο για να αποφευχθεί η θραύση του DNA. Εκμεταλλεύτηκε το γεγονός ότι, αν το DNA σημανθεί με τρίτιο, εκπέμπει ακτινοβολία β, η οποία επιτρέπει την ανίχνευσή του με τη βοήθεια φωτογραφικού φιλμ. Η τεχνική της χρήσης μιας ραδιενεργά σημασμένης ουσίας για να παραχθεί μια εικόνα σε ένα φωτογραφικό γαλάκτωμα ονομάζεται **αυτοραδιογραφία** (autoradiography). Ο Cairns καλλιέργησε για λίγες ώρες *E. coli* σε ένα θρεπτικό μέσο που περιείχε [³H]θυμιδίνη για να σημανθεί το DNA. Στη συνέχεια απελευθέρωσε το σημασμένο DNA από τα βακτήρια με ήπιο τρόπο, προσθέτοντας λυσοζύμη (ένζυμο από το λεύκωμα αυγών) για τη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων και ένα απορρυπαντικό για τη διάλυση των κυτταρικών μεμβρανών. Συνέλεξε το βακτηριακό DNA στην επιφάνεια ενός φίλτρου εστέρων κυτταρίνης, επικάλυψε το στεγνωμένο φίλτρο με φωτογραφικό γαλάκτωμα και το άφησε να εκτεθεί στην ακτινοβολία β για δύο μήνες στο σκοτάδι, προκειμένου να παραχθεί μια εικόνα. Από την ανάλυση της εικόνας που προέκυψε από την εμφάνιση του γαλακτώματος βρέθηκε ότι το DNA της *E. coli* είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο με περίμετρο περίπου 1 mm, μήκος περίπου 1.000 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος του βακτηρίου.

Το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιείται για την *in vitro* μελέτη του ομοιοπολικά κλειστού, κυκλικού δίκλωνου DNA.

Το γονιδιωματικό DNA του βακτηρίου είναι υπερβολικά μεγάλου μεγέθους για να μελετηθεί με ευκολία *in vitro*. Ευτυχώς, υπάρχουν άλλα κυκλικά μόρια DNA με πολύ μικρότερο μέγεθος, το οποίο μας επιτρέπει να μελετήσουμε τις ιδιότητές τους. Πολλά βακτήρια, εκτός από το μεγάλο χρωμοσωμικό μόριο DNA, φέρουν αντίγραφα αυτόνομα αντιγραφόμενων μικρών κυκλικών μορίων DNA, τα οποία ονομάζονται **πλασμίδια** (plasmids). Τα πλασμίδια, τα οποία ποικίλλουν σε μέγεθος από 0,1% έως 5% του βακτηριακού χρωμοσώματος, αντιγράφονται και μεταβιβάζονται από τη μία γενιά στην άλλη σχετικά ανεξάρτητα από το χρωμοσωμικό DNA. Παρόλο που τα πλασμίδια συνήθως δεν αποτελούν απαραίτητα γενετικά στοιχεία, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή τους. Για παράδειγμα, ορισμένα πλασμίδια προσδίδουν στον ξενιστή τους ανθεκτικότητα σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά, ενώ άλλα πλασμίδια επιτρέπουν στο βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή να παράγει τοξίνες που σκοτώνουν άλλα είδη μικροοργανισμών (**ΠΛΑΙΣΙΟ 3.1 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ: ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ**). Το πλασμιδιακό DNA είναι

ΠΛΑΙΣΙΟ 3.1: ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Πλασμίδια και ασθένειες

Τα πλασμίδια προσδίδουν ειδικές βιολογικές ιδιότητες στα βακτήρια-ξενιστές. Δύο από αυτές τις ιδιότητες έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ορισμένα πλασμίδια φέρουν γονίδια που καθιστούν τα βακτήρια-ξενιστές ανθεκτικά σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά ή αντιβακτηριακά φάρμακα. Τέτοια πλασμίδια ονομάζονται πλασμίδια R (από την αγγλική λέξη *Resistance* = ανθεκτικότητα). Το πρώτο πλασμίδιο R ανακαλύφθηκε στην Ιαπωνία στα τέλη της δεκαετίας του 1950, όταν ένα στέλεχος *Shigella*, το οποίο απομονώθηκε από έναν ασθενή που έπασχε από δυσεντερία, βρέθηκε να είναι ανθεκτικό στη σουλφανιλαμίδα, στη χλωραμφενικόλη, στη στρεπτομυκίνη και στην τετρακυκλίνη. Η ανθεκτικότητα σε έναν μόνο αντιβακτηριακό παράγοντα μπορεί να οφειλόταν σε μια σπάνια μεταλλαγή, αλλά η πιθανότητα να εμφανιστούν τέσσερις ανεξάρτητες μεταλλάξεις στο ίδιο βακτήριο ήταν απειροελάχιστη. Γι' αυτό οι ερευνητές υπέθεσαν ότι το στέλεχος *Shigella* φιλοξενούσε ένα πλασμίδιο που το καθιστούσε ανθεκτικό και στα τέσσερα φάρμακα ταυτοχρόνως.

Η παραπάνω υπόθεση επαληθεύτηκε πειραματικά. Βρέθηκε πως ορισμένα πλασμίδια R δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες που μπορούν να μετακινηθούν από ένα κύτταρο-ξενιστή σε ένα άλλο. Τα μεταβιβάσιμα πλασμίδια R αποτελούν σοβαρή απειλή της δημόσιας υγείας ακόμα και όταν βρίσκονται σε έναν μη παθογόνο ξενιστή. Σε φυσιολογικές συνθήκες, μη παθογόνα βακτήρια με ευαισθησία στα φάρμακα αποικίζουν το δέρμα, το στόμα και το έντερο. Αυτά τα βακτήρια εξοντώνονται όταν εκτεθούν σε αντιβακτηριακούς παράγοντες και τα βακτήρια που φέρουν πλασμίδια R πολλαπλασιάζονται, αφού δεν υπάρχει πλέον ανταγωνισμός για τον οικολογικό θώκο. Σοβαρά προβλήματα δημιουργούνται όταν τα μη παθογόνα βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε φάρμακα μεταβιβάζουν πλασμίδια R σε παθογόνα βακτήρια που τυχάνει να μολύνουν το σώμα, επιτρέποντας στα παθογόνα αυτά βακτήρια να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Τότε η κλινική θεραπεία καθίσταται δύσκολη ή αδύνατη.

Η μεταβίβαση γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να συμβεί μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους, αλλά και μεταξύ βακτηρίων με περιορισμένη συγγένεια, ακόμα και από gram-αρνητικά σε gram-θετικά είδη. Δυστυχώς, το πρόβλημα δεν αφορά μόνο την άσκοπη λήψη αντιβιοτικών από τον άνθρωπο. Χαμηλές δόσεις ορισμένων αντιβιοτικών προστίθενται ενίοτε στις ζωτροφές, για να αποφευχθούν οι μολύνσεις και να βελτιωθεί η ανάπτυξη των ζώων. Τα ζώα που λαμβάνουν αυτά τα αντιβιοτικά συχνά φέρουν βακτήρια με πλασμίδια R, τα οποία μπορούν να μεταβιβαστούν σε βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο.

Μια άλλη κατηγορία πλασμιδίων που απειλούν τη δημόσια υγεία είναι τα λοιμογόνα πλασμίδια. Αυτά διαθέτουν γονίδια που κωδικοποιούν τοξίνες οι οποίες προκαλούν πολλές σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο, όπως είναι η δυσεντερία, ο άνθρακας, η πανώλη, ο τέτανος και η τροφική δηλητηρίαση. Τα λοιμογόνα πλασμίδια μας προβληματίζουν ιδιαίτερα, διότι, όπως και τα πλασμίδια R, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό παθογόνων βακτηρίων με σκοπό τη χρήση τους σε βιολογικό πόλεμο. Λοιμογόνα πλασμίδια επίσης συναντώνται σε βακτήρια που μολύνουν φυτά. Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens*, το οποίο μολύνει οπωροφόρα δέντρα και άλλα πλατύφυλλα φυτά, περιέχει ένα ογκοεπαγωγό πλασμίδιο που ονομάζεται πλασμίδιο Ti (*Tumor-inducing plasmid*). Μόνο ένα τμήμα του πλασμιδίου Ti, το οποίο ονομάζεται T DNA, μεταβιβάζεται στο φυτικό κύτταρο. Το T DNA ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα των φυτικών κυττάρων και ευθύνεται για την επαγωγή σχηματισμού όγκων, οι οποίοι ονομάζονται κορωνωτοί κάλοι (*crown galls*). Το T DNA έχει τροποποιηθεί με γενετική μηχανική, έτσι ώστε να μην είναι ογκογόνο. Με τη διαδικασία αυτή, που είναι γνωστή ως αφοπλισμός (*disarming*), έχει δημιουργηθεί ένα πλασμίδιο με μεγάλη σημασία για την αγροβιοτεχνολογία, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή ξένου DNA σε διάφορα φυτά.

κατάλληλο για τη μελέτη των ιδιοτήτων των κλειστών κυκλικών δίκλωνων μορίων DNA, επειδή το μικρό τους μέγεθος τα καθιστά ανθεκτικά στους εργαστηριακούς χειρισμούς και τους επιτρέπει να παραμένουν άθικτα.

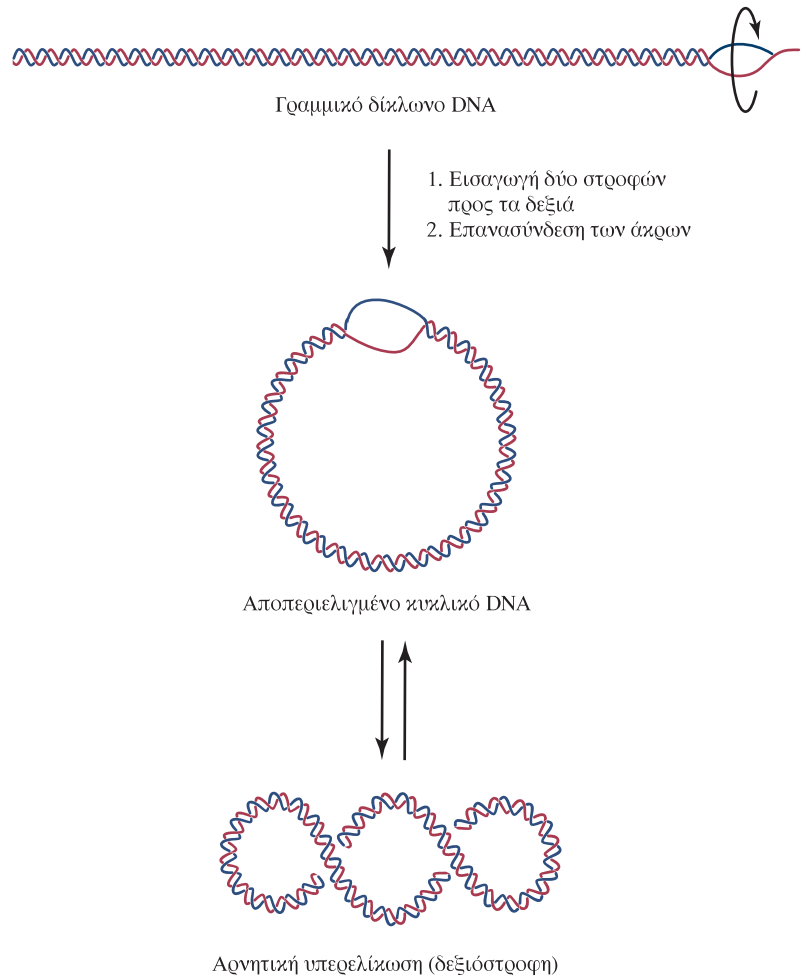
Τα ομοιοπολικά κλειστά, κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA συχνά έχουν υπερελικωμένες δομές.

Μια δομική στρέβλωση σε μια περιοχή ενός γραμμικού δίκλωνου μορίου DNA επηρεάζει τη δομή μόνο τοπικά και όχι σε ολόκληρο το μήκος του μορίου. Αντίθετα, όταν οι αλυσίδες σχηματίζουν ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA, οποιαδήποτε τοπική στρέβλωση επηρεάζει τη δομή του DNA σε ολόκληρο το μήκος του. Η μαθηματική επιστήμη της τοπολογίας μάς βοηθά να κατανοήσουμε αυτό το φαινόμενο, καθώς και άλλες ιδιαιτερότητες του ομοιοπολικά κλειστού, κυκλικού DNA. Βασική αρχή της τοπολογίας είναι ότι, όταν ένα αντικείμενο παραμορφώνεται χωρίς όμως να σπάσει ή να σκιστεί, χωρίς δηλαδή να διαταραχθεί η συνέχεια της δομής του, οι τοπολογικές ιδιότητές του παραμένουν αμετάβλητες. Η εισαγωγή μιας εγκοπής σε ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο DNA αλλάζει τις τοπολογικές ιδιότητες του μορίου.

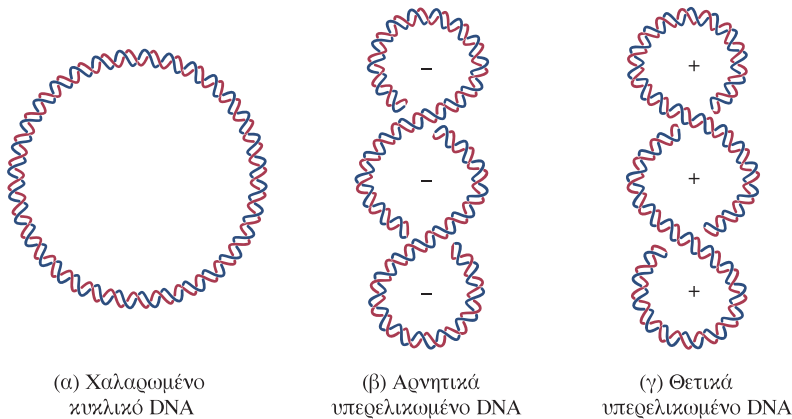
Γνωρίζουμε ότι τα δύο άκρα μιας γραμμικής έλικας DNA μπορούν να έρθουν σε επαφή και να συνδεθούν ομοιοπολικά ώστε και οι δύο αλυσίδες να είναι συνεχείς. Όπως φαίνεται στην **ΕΙΚΟΝΑ 3.12**, αν το ένα άκρο του DNA αποπεριελιχθεί κατά 720 μοίρες (δηλαδή κατά 2 πλήρεις στροφές) πριν συνδεθεί με το άλλο άκρο, τότε στο κυκλικό μόριο θα πρέπει να υπάρχουν περίπου 20 bp σε μη περιελιγμένη μορφή (αφού καθεμία από τις δύο στροφές της έλικας του DNA στο γραμμικό μόριο αντιστοιχεί σε 10,5 bp). Ωστόσο, επειδή το μόριο DNA έχει έντονη τάση να διατηρήσει τη δεξιόστροφη ελικοειδή δομή με περίπου 10,5 bp ανά στροφή, θα παραμορφωθεί και θα σχηματίσει μια αρνητική **υπερέλικα** (superhelix ή supercoil), εξασφαλίζοντας πως θα εξακολουθήσουν να υπάρχουν περίπου 10,5 βάσεις ανά στροφή της έλικας. Αν προβάλουμε το DNA σε ένα επίπεδο (Εικόνα 3.12), παρατηρούμε πως εμφανίζονται δύο σημεία διασκελισμού ή δύο **κόμβοι** (nodes). Ένα κυκλικό μόριο DNA που διαθέτει τέτοιους κόμβους λέγεται ότι **συστρέφεται** (writhe).

Τα άκρα ενός γραμμικού δίκλωνου μορίου θα μπορούσαν επίσης να συνδεθούν χωρίς προηγουμένως να έχει περιελιχθεί κανένα από τα άκρα του ή μετά την περαιτέρω περιέλιξη του ενός άκρου. Όταν τα άκρα του DNA συνδεθούν χωρίς να έχει συστραφεί, το ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο DNA σχηματίζει έναν **χαλαρό κύκλο** (relaxed circle) χωρίς κόμβους και

ΕΙΚΟΝΑ 3.12 Σχηματισμός αρνητικά υπερελικωμένου πλασμιδίου. Ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA αποπεριελίσσεται κατά δύο στροφές (περίπου 20 hr) και τα άκρα του συνδέονται για να σχηματιστεί ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA. Στη συνέχεια το πλασμίδιο που προκύπτει υιοθετεί αρνητικά υπερελικωμένη δομή, προκειμένου να διατηρηθεί το ζευγάρι των βάσεων με περίπου 10,5 hr/στροφή.



μπορεί να απλωθεί σε μια επίπεδη επιφάνεια χωρίς άσκηση εξωτερικής δύναμης. Όταν το γραμμικό δίκλωνο μόριο υπερελικωθεί πριν συνδεθούν τα άκρα του, το ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο DNA που προκύπτει σχηματίζει μια θετική υπερέλικα με συστροφές αντίθετης φοράς από αυτές που παρατηρούνται στην αρνητική υπερέλικα. Δύο ομοιοπολικά κλειστά, κυκλικά δίκλωνα μόρια DNA με όμοιες αλληλουχίες βάσεων αλλά διαφορετικό βαθμό υπερελίκωσης ονομάζονται **τοπολογικά ισομερή** (topological isomers) ή **τοποϊσομερή** (topoisomers). Στην **ΕΙΚΟΝΑ 3.13** παρουσιάζεται η δομή τριών τοποϊσομερών: ένας χαλαρός κύκλος, μια αρνητική υπερέλικα και μια θετική υπερέλικα. Τα μαθηματικά παρέχουν μια ποσοτική μέθοδο για τον χαρακτηρισμό των τοποϊσομερών (**ΠΛΑΙΣΙΟ 3.2 ΕΜΒΑΘΥΝΟΝΤΑΣ: Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ**). Η τάση στρέψης που φέρει ένα υπερελικωμένο, ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA μπορεί να εκτονωθεί αν εισαχθεί σε αυτό μία εγκοπή στη μία αλυσίδα, π.χ. μέσω της επίδρασης ελάχιστης ποσότητας DNάσης. Το πλασμίδιο με την εγκοπή αποπεριελίσσεται σχηματίζοντας έναν χαλαρό κύκλο.



ΕΙΚΟΝΑ 3.13 Τοποϊσομερή. (α) Χαλαρός κύκλος – ο άξονας της έλικας δε διασταυρώνεται με τον εαυτό του και η προβολή του DNA σε ένα επίπεδο διαγράφει έναν κύκλο. (β) Αρνητικά υπερελικωμένο DNA – το άνω τμήμα του μορίου DNA διασταυρώνεται με το κάτω τμήμα με κατεύθυνση από δεξιά προς αριστερά. (γ) Θετικά υπερελικωμένο DNA – το άνω τμήμα του μορίου DNA διασταυρώνεται με το κάτω τμήμα από αριστερά προς δεξιά.

ΠΛΑΙΣΙΟ 3.2: ΕΜΒΑΘΥΝΟΝΤΑΣ



Ο αριθμός σύνδεσης

Ο αριθμός σύνδεσης (Lk , Linking number) είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη παράμετρος η οποία μας επιτρέπει την περιγραφή των τοπολογικών μορφών που σχηματίζουν τα ομοιοπολικά κλειστά, κυκλικά δίκλινα μόρια DNA. Ο Lk περιγράφει πόσες φορές ο φωσφοσακχαρικός σκελετός της μιας αλυσίδας περιστρέφεται γύρω από την άλλη αλυσίδα ή πόσες φορές «συνδέονται η μία με την άλλη». Δηλαδή ο αριθμός σύνδεσης εκφράζει πόσες φορές δύο αλυσίδες DNA διπλώνονται η μία γύρω από την άλλη σχηματίζοντας τη διπλή έλικα, καθώς και πόσο συχνά ο άξονας της έλικας συστρέφεται γύρω από τον εαυτό του για να σχηματίσει υπερελίκες. Ως τοπολογική ιδιότητα, ο Lk ενός ομοιοπολικά κλειστού μορίου DNA δεν μπορεί να αλλάξει, εκτός αν προκληθεί ρήξη σε μία τουλάχιστον αλυσίδα του.

Ο Lk είναι το άθροισμα του αριθμού συστροφών (Wr , Writhing number) και του αριθμού στροφών (Tw , Twisting number):

$$Lk = Wr + Tw$$

Ο αριθμός συστροφών δείχνει πόσες φορές ο άξονας της έλικας διασταυρώνεται με τον εαυτό του. Σε κάθε σημείο διασκελισμού σχηματίζεται ένας κόμβος, όπως οι δύο κόμβοι της αρνητικής υπερελίκας που απεικονίζονται στο κάτω μέρος της Εικόνας 3.12. Ο αριθμός στροφών δείχνει τον συνολικό αριθμό των στροφών της έλικας του δίκλινου μορίου. Σε ένα ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό δίκλινο DNA που είναι επίπεδο (έναν χαλαρό κύκλο), ο Tw είναι ο αριθμός των φορών που η μία αλυσίδα περιστρέφεται γύρω από την άλλη. Για παράδειγμα, ο αριθμός στροφών για έναν χαλαρό κύκλο με 1.050 bp είναι 100 (1.050 bp/10,5 bp). Ο αριθμός στροφών είναι θετικός για περιστροφές σε δεξιόστροφες περιοχές της έλικας και αρνητικός για περιστροφές σε αριστερόστροφη έλικα ή τμήμα αυτής.

Ο αριθμός σύνδεσης μας δίνει τη δυνατότητα να ξεχωρίσουμε τη θετική από την αρνητική υπερελίκωση και δεν μπορεί να μεταβληθεί, εκτός αν (1) κοπεί η μία τουλάχιστον αλυσίδα, (2) η μία αλυσίδα περιστραφεί γύρω από την άλλη και (3) γίνει επανασύνδεση. Επομένως η μεταβολή του αριθμού σύνδεσης (ΔLk) μετά από μια διεργασία (π.χ. επίδραση μιας τοποϊσομεράσης) παρέχει πληροφορίες για τον μοριακό μηχανισμό που προκάλεσε την αλλαγή. Για παράδειγμα, η ΔLk μας πληροφορεί για τον τρόπο δράσης των ενζύμων που επηρεάζουν την υπερελίκωση. Οι μεταβολές του αριθμού σύνδεσης σχετίζονται με μεταβολές των αριθμών στροφών και συστροφών ως εξής:

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

Μείωση του Lk αντιστοιχεί σε συνδυασμό αποπεριέλιξης (μείωση του αριθμού βάσεων ανά στροφή της έλικας) και αρνητικής υπερελίκωσης, ενώ αύξηση του Lk αντιστοιχεί σε συνδυασμό υπερπεριέλιξης (αύξηση του αριθμού βάσεων ανά στροφή της έλικας) και θετικής υπερελίκωσης.

Τα περισσότερα βακτηριακά μόρια DNA είναι ελαφρώς υποπεριελιγμένα και κατά συνέπεια σχηματίζουν αρνητικές υπερέλικες. Η υποπεριέλιξη δεν είναι αποτέλεσμα αποπεριέλιξης πριν από τη σύνδεση των άκρων, αλλά εισάγεται σε ήδη σχηματισμένους κύκλους από ένα ένζυμο που ονομάζεται **DNA γυράση** (DNA gyrase) και ανήκει στις τοποϊσομεράσες (βλ. παρακάτω). Περίπου 75% της τάσης στρέψης του DNA που οφείλεται στην υποπεριέλιξη απορροφάται με συστροφές. Ας θυμηθούμε ότι ένα μόριο DNA είναι μια δυναμική δομή στην οποία οι δεσμοί υδρογόνου διασπώνται και ξανασχηματίζονται, με αποτέλεσμα συνεχώς να εμφανίζονται και να εξαφανίζονται θηλιές καθ' όλο το μήκος του υπερελικωμένου μορίου DNA. Σε οποιαδήποτε δεδομένη στιγμή, το ποσοστό ενός αρνητικά υπερελικωμένου μορίου που βρίσκεται σε αποδιαταγμένη μορφή είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ποσοστό ενός χαλαρού κύκλου ίσου μήκους. Σε ένα υπερελικωμένο μόριο, οι αλληλουχίες οι οποίες είναι πιθανότερο να μην είναι ζευγαρωμένες και να σχηματίζουν θηλιές είναι αυτές που περιέχουν περισσότερο από 90% ζεύγη A•T. Οι πλούσιες σε A•T αλληλουχίες διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διεργασίες όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA.

3.8 Οι τοποϊσομεράσες

Οι τοποϊσομεράσες καταλύουν τη μετατροπή ενός τοποϊσομερούς σε ένα άλλο.

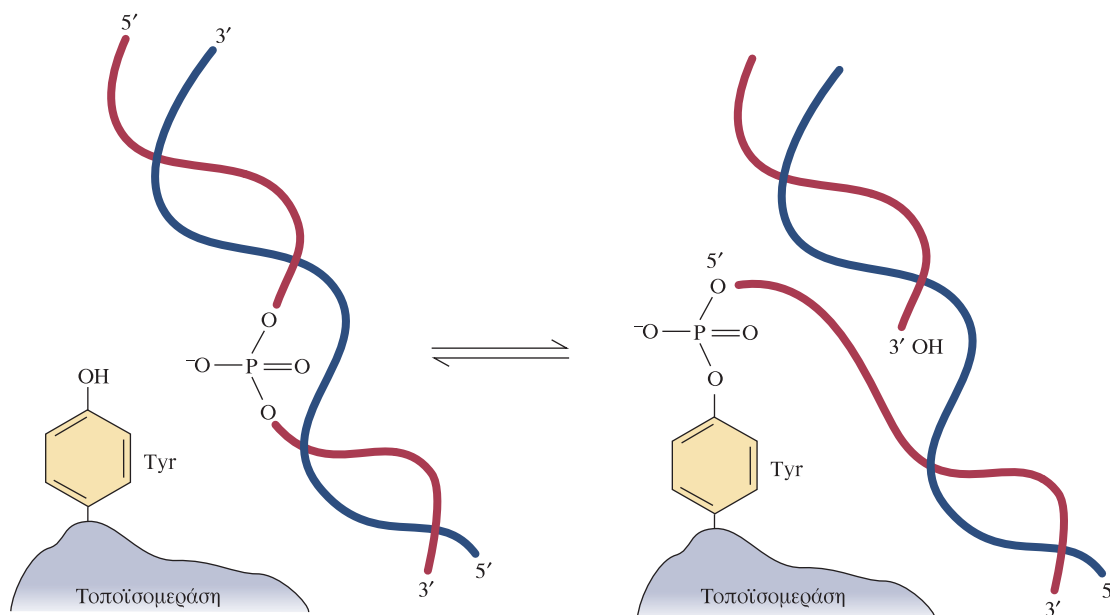
Τα μόρια DNA αντιμετωπίζουν διάφορες προκλήσεις που αφορούν την τοπολογία τους. Θα παρουσιάσουμε δύο παραδείγματα που αφορούν την αντιγραφή του βακτηριακού DNA. Κατά την αντιγραφή, το βακτηριακό DNA πρέπει να αποπεριελιχθεί. Επειδή όμως το βακτηριακό DNA είναι ένας ομοιοπολικός κλειστός κύκλος, η αποπεριέλιξη σε μια περιοχή προκαλεί υπερπεριέλιξη σε κάποια άλλη περιοχή. Η ολοένα αυξανόμενη τάση στρέψης που συσσωρεύεται θα πρέπει να απορροφηθεί, ειδάλλως η διαδικασία της αντιγραφής δε θα μπορεί να εξελιχθεί. Μια άλλη τοπολογική πρόκληση εμφανίζεται κατά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του βακτηριακού DNA, αφού τα δύο θυγατρικά μόρια DNA αποτελούν συνδεδεμένους κύκλους, όπως είναι οι κρίκοι μιας αλυσίδας. Τα συνδεδεμένα με αυτόν τον τρόπο μόρια DNA ονομάζονται **αλυσομερή** (catenanes). Χρειάζεται ένας μηχανισμός που θα επιτρέπει τον διαχωρισμό των δύο κυκλικών μορίων DNA, ώστε να μπορούν να διαχωριστούν στα θυγατρικά κύτταρα.

Οι δύο παραπάνω προκλήσεις που αφορούν την αντιγραφή καθώς και πολλά άλλα προβλήματα περιέλιξης, συστροφής και

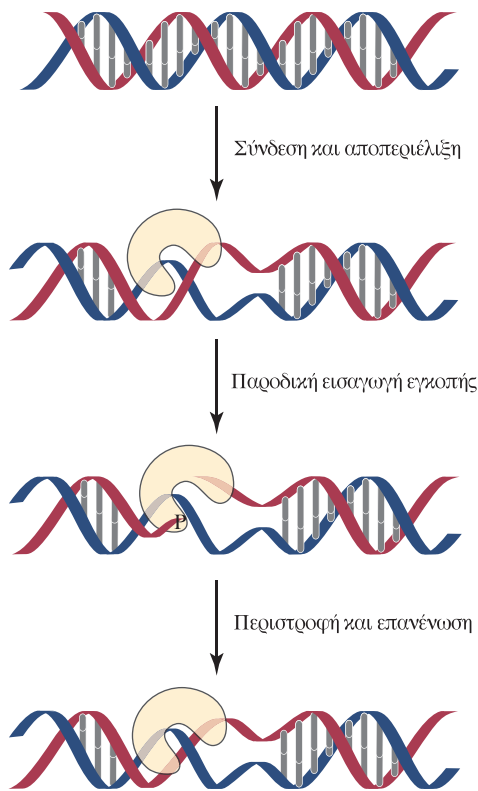
αλυσομερούς σύνδεσης κυκλικών μορίων αντιμετωπίζονται με την παροδική κοπή και επανασύνδεση της ραχοκοκαλιάς του DNA. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτή την παροδική κοπή και επανασύνδεση μετατρέπουν ένα τοποϊσομερές σε ένα άλλο και ονομάζονται **τοποϊσομεράσες** (topoisomerases). Οι τοποϊσομεράσες είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου, αφού διαχειρίζονται την τοπολογία του DNA έτσι ώστε να είναι εφικτή η αντιγραφή, η μεταγραφή και άλλες σημαντικές διεργασίες. Επιπλέον, οι τοποϊσομεράσες έχουν τεράστιο πρακτικό ενδιαφέρον, διότι αποτελούν στόχους για ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

Οι τοποϊσομεράσες κόβουν το DNA και σχηματίζουν με αυτό μεταβατικά σύμπλοκα, αφού μια τυροσίνη στο ενεργό κέντρο τους συνδέεται ομοιοπολικά με τη φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο της εγκοπής (**ΕΙΚΟΝΑ 3.14**). Οι τοποϊσομεράσες διακρίνονται σε δύο γενικούς τύπους, ανάλογα με το αν η παροδική τους σύνδεση στο DNA αφορά τη μία ή και τις δύο αλυσίδες του DNA:

1. **Τοποϊσομεράσες τύπου I:** Οι τοποϊσομεράσες τύπου I σχηματίζουν παροδικές συνδέσεις με μία αλυσίδα. Το 1971, πρώτος ο James Wang εντόπισε μια τοποϊσομεράση τύπου I σε εκχυλίσματα ελεύθερα κυττάρων της *E. coli*. Μια



ΕΙΚΟΝΑ 3.14 Κατάλυση δημιουργίας παροδικής εγκοπής του DNA από τοποϊσομεράσες του DNA. Καταλύεται η μετεστεροποίηση μιας τυροσίνης του ενζύμου και μιας φωσφορικής ομάδας του DNA, η οποία ακολουθεί μια εγκοπή ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού. Έτσι σχηματίζεται παροδικά ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο ενδιάμεσο σύμπλοκο τοποϊσομεράσης-DNA. Η αντίδραση της μετεστεροποίησης είναι αντιστρεπτή και οδηγεί στην αποκατάσταση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, οπότε κλείνει η εγκοπή και απελευθερώνεται το ένζυμο από το DNA χωρίς να καταναλώνεται ATP.



ΕΙΚΟΝΑ 3.15 Μοντέλο του μηχανισμού χαλάρωσης υπερελικωμένου DNA από την τοποϊσομεράση I της *E. coli*. Μια τυροσίνη στο ενεργό κέντρο της τοποϊσομεράσης τύπου I της *E. coli* συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' φωσφορικό άκρο στη θέση της εγκοπής. Το ένζυμο αρχικά αποδιατάσσει ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA και στη συνέχεια εισάγει μια εγκοπή σε μία από τις αλυσίδες στην αποδιαταγμένη περιοχή. Η άλλη αλυσίδα είναι τώρα ελεύθερη να μετακινηθεί μέσα από την παροδική εγκοπή, προτού αυτή ξανακλείσει. [Πηγή: Decker, N. H. et al. 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12126-12131.]

τυροσίνη στο ενεργό κέντρο της τοποϊσομεράσης τύπου I της *E. coli* συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' φωσφορικό άκρο της αλυσίδας DNA που έχει υποστεί την εγκοπή (**ΕΙΚΟΝΑ 3.15**). Το ένζυμο χαλαρώνει το υποπεριελικωμένο DNA (αρνητικά υπερελικωμένο) με τον εξής μηχανισμό: αρχικά αποδιατάσσει ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA και στη συνέχεια εισάγει μια εγκοπή σε μία από τις αλυσίδες στην αποδιαταγμένη περιοχή. Στη συνέχεια η άκοπη αλυσίδα περνάει μέσα από την εγκοπή και τελικά η εγκοπή ξανακλείνεται αποκαθιστώντας τον αρχικό φωσφοδιεστερικό δεσμό (**Εικόνα 3.15**). Η ικανότητα της τοποϊσομεράσης τύπου I της *E. coli* να αποπεριελίσει αρνητικά υπερελικωμένο DNA μειώνεται καθώς το DNA γίνεται χαλαρότερο, με συνέπεια το ένζυμο να γίνεται όλο και λιγότερο αποτελεσματικό όσο προχωράει η αντίδραση.

2. **Τοποϊσομεράσες τύπου II:** Οι τοποϊσομεράσες τύπου II συνδέονται παροδικά και με τις δύο αλυσίδες του DNA και χρειάζονται ATP για να μετατρέψουν ένα τοποϊσομερές σε ένα άλλο. Μία από τις καλύτερα μελετημένες τοποϊσομεράσες τύπου II είναι η ευκαρυωτική τοποϊσομεράση II. Η δράση αυτού του ενζύμου παρουσιάζεται στην **ΕΙΚΟΝΑ 3.16**. Το ένζυμο δημιουργεί μια εγκοπή σε καθεμία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου μορίου DNA, και μία τυροσίνη κάθε ενεργού κέντρου συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο της αντίστοιχης κομμένης αλυσίδας. Στη συνέχεια το ένζυμο αλλάζει στερεοδιαμόρφωση και τα δύο άκρα του κομμένου δίκλωνου DNA απομακρύνονται το ένα από το άλλο ώστε να δημιουργηθεί ένα άνοιγμα. Η περιοχή του DNA που περιλαμβάνει το άνοιγμα ονομάζεται πύλη ή τμήμα G (G-segment, Gated). Μια δεύτερη περιοχή δίκλωνου DNA, είτε του ίδιου μορίου είτε ενός διαφορετικού μορίου, διέρχεται μέσα από το άνοιγμα της πύλης. Η δεύτερη αυτή περιοχή ονομάζεται μεταφερόμενο τμήμα ή τμήμα T (T-segment, Transported). Μια σημαντική βακτηριακή τοποϊσομεράση τύπου II, η DNA γυράση, διαθέτει εκπληκτική καταλυτική ικανότητα. Οι περισσότερες τοποϊσομεράσες τύπου I και τύπου II απελευθερώνουν την τάση στρέψης που περικλείεται στο αρνητικά υπερελικωμένο DNA, το οποίο μετατρέπεται σε ένα τοποϊσομερές με πιο χαλαρή δομή. Η DNA γυράση διαθέτει τη μοναδική καταλυτική ικανότητα, παρουσία ATP, να εισάγει αρνητικές υπερέλικες σε ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό DNA. Η ενεργότητα της DNA γυράσης είναι απαραίτητη για την επιβίωση της *E. coli*, διότι αντισταθμίζει την τάση στρέψης που συσσωρεύεται μπροστά από την αντιγραφική διχάλα

(το σημείο διαχωρισμού των δύο γονεϊκών αλυσίδων DNA) κατά την αντιγραφή του DNA. Το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη (ciprofloxacin), το οποίο ανήκει σε μια κατηγορία αντιβιοτικών που ονομάζονται κινολόνες (quinolones), αναστέλλει τη βακτηριακή DNA γυράση και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ποικίλων βακτηριακών μολύνσεων.

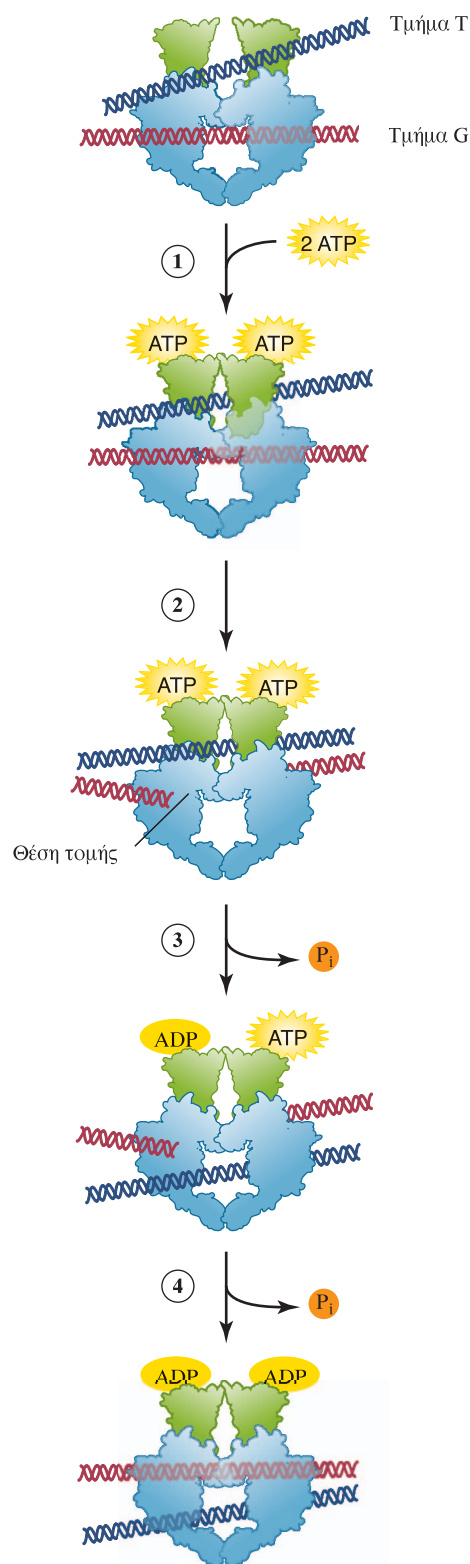
3.9 Δομές διαφορετικές από το B-DNA

Το A-DNA είναι μια δεξιόστροφη διπλή έλικα με βαθιά μεγάλη αύλακα και πολύ ρηχή μικρή αύλακα.

Το B-DNA είναι η κυρίαρχη μορφή DNA σε όλους τους οργανισμούς, αλλά δεν είναι η μοναδική. Πολλές άλλες στερεοδιαμορφώσεις εκτός από το B-DNA συναντώνται στη φύση, αν και συχνά μόνο παροδικά. Η πρώτη διαφορετική στερεοδιαμόρφωση που αναγνωρίστηκε ήταν του A-DNA. Η Rosalind Franklin συνέλεξε δεδομένα περίθλασης ακτίνων X από A-DNA όταν εξέτασε ινίδια DNA σε σχετική υγρασία περίπου 75%. Τόσο το A-DNA όσο και το B-DNA είναι δεξιόστροφες διπλές έλικες, δηλαδή η έλικα φαίνεται περιελιγμένη δεξιόστροφα καθώς ένας παρατηρητής κοιτάζει κατά μήκος του άξονα συμμετρίας της. Παρά την ομοιότητα αυτή, το A-DNA έχει πολλές σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με το B-DNA (**ΕΙΚΟΝΑ 3.17α** και **6**):

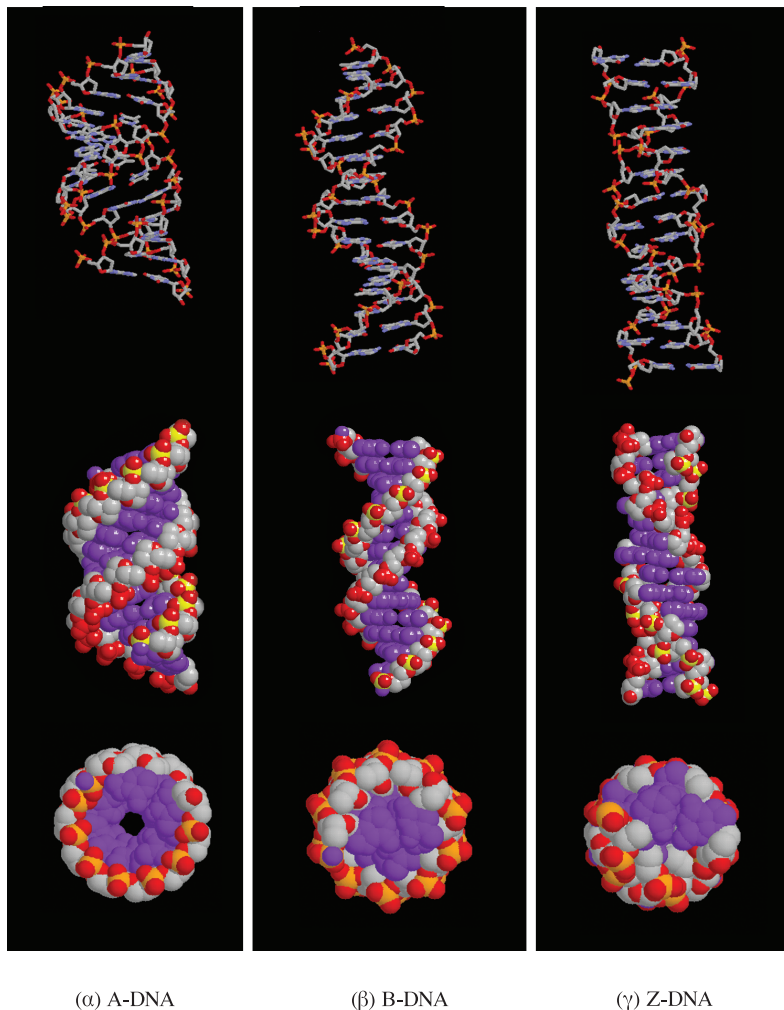
1. Στο A-DNA κάθε στροφή της έλικας έχει 11 bp, ενώ στο B-DNA η στροφή αποτελείται από 10,5 bp.
2. Στο A-DNA το επίπεδο κάθε ζεύγους βάσεων έχει κλίση 20 μοιρών ως προς την κάθετο στον άξονα της έλικας, ενώ η αντίστοιχη τιμή για το B-DNA είναι -6 μοίρες.
3. Αντίθετα με το B-DNA, στο εσωτερικό της δομής του A-DNA υπάρχει ένας κενός κύλινδρος που φαίνεται σαν οπή όταν το κοιτάζει κανείς κατά μήκος του άξονά του.

ΕΙΚΟΝΑ 3.16 Μοντέλο μηχανισμού δράσης της τοποϊσομεράσης II. Σε αυτόν τον μηχανισμό δράσης συμμετέχουν δύο δίκλιωνα τμήματα DNA. Η κατάλυση αρχίζει όταν η τοποϊσομεράση προσδεθεί στα δύο δίκλιωνα τμήματα, στο τμήμα πύλη ή τμήμα G (κόκκινο) και στο μεταφερόμενο τμήμα ή τμήμα T (σκούρο μπλε). Βήμα 1: Ένα μόριο ATP προσδένεται σε κάθε υπομονάδα της τοποϊσομεράσης. Βήμα 2: Το τμήμα G κόβεται. Βήμα 3: Το τμήμα T, είτε από το ίδιο μόριο είτε από ένα άλλο μόριο DNA, διέρχεται από το άνοιγμα του τμήματος G με παράλληλη υδρόλυση ενός μορίου ATP. Βήμα 4: Το τμήμα G επανασυνδέεται και το δεύτερο μόριο ATP υδrolύεται. [Πηγή: Larsen, A. K., et al. 2003. *Pharmacol Ther* 2:167-181.]



ΕΙΚΟΝΑ 3.17 Στερεοδιαμορφώσεις του DNA.

Απεικονίζονται τρεις στερεοδιαμορφώσεις του DNA: (α) A-DNA, (β) B-DNA και (γ) Z-DNA. Άνω τμήμα: Οι δομές απεικονίζονται με το μοντέλο «ράβδων και σφαιρών» (ball and stick), ώστε να φαίνεται ο προσανατολισμός των ζευγών βάσεων ως προς τον άξονα της έλικας. Μεσαίο τμήμα: Οι δομές απεικονίζονται με χωροπληρωτικά μοντέλα, με τη ραχοκοκαλιά χρωματισμένη σύμφωνα με τον κώδικα CPK, ενώ τα ζεύγη βάσεων είναι χρωματισμένα μοβ, ώστε να ξεχωρίζουν οι αύλακες. Κάτω τμήμα: Απεικονίζονται κατόψεις των μορίων DNA, επίσης με χωροπληρωτικά μοντέλα. Κάθε μόριο DNA αποτελείται από 12 ζεύγη βάσεων. [Πηγές: Άνω τμήμα, B. Ramakrishnan and M. Sundaralingman, *Biophys. J.* 69 (1995):553-558. Μεσαίο τμήμα, H. R. Drew, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981):2179-2183. Κάτω τμήμα, A. H.-J. Wang, et al., *Left-handed double helical DNA...*]



4. Το A-DNA διαθέτει μια βαθιά μεγάλη αύλακα και μια πολύ ρηχή μικρή αύλακα, ενώ στο B-DNA η μεγάλη και η μικρή αύλακα έχουν περίπου το ίδιο βάθος.

Στον **ΠΙΝΑΚΑ 3.2** συνοψίζονται οι παραπάνω διαφορές. Το δίκλωνο DNA σπάνια, αν όχι ποτέ, παίρνει τη μορφή A στις φυσιολογικές συνθήκες που βρίσκουμε στα ζωντανά συστήματα. Ωστόσο, το δίκλωνο RNA (βλ. παρακάτω) και τα υβρίδια DNA-RNA (νουκλεϊκά οξέα με μία αλυσίδα DNA και μία αλυσίδα RNA) σχηματίζουν δεξιόστροφες έλικες που μοιάζουν πολύ με το A-DNA.

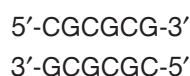
Το Z-DNA είναι αριστερόστροφο.

Η ανάλυση των δεδομένων περίθλασης ακτίνων X ινιδίων DNA δε δίνει πληροφορίες για τις αποστάσεις μεταξύ των ζευγών βάσεων. Οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αποκτηθούν μόνο με τη μελέτη κρυστάλλων DNA. Δυστυχώς όμως, το DNA που

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2 Σύγκριση των κύριων χαρακτηριστικών των μορφών A, B και Z του DNA

Παράμετρος	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Φορά περιέλιξης της έλικας	Δεξιό-στροφή	Δεξιό-στροφή	Αριστερό-στροφή
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή	11	10,5	12
Αξονική απόσταση μεταξύ βάσεων (axial rise)	0,26 nm	0,34 nm	0,45 nm
Κλίση του επιπέδου των ζευγών βάσεων ως προς τον άξονα της έλικας (tilt)	20°	-6°	7°
Διάμετρος της έλικας	2,3 nm	2,0 nm	1,8 nm

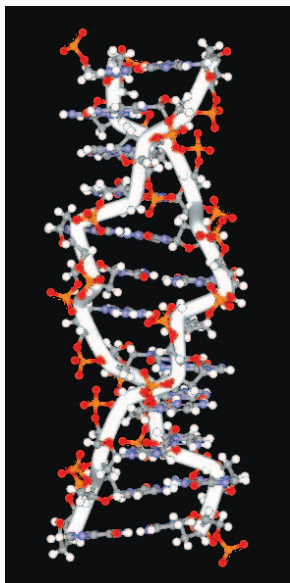
απομονώνεται από φυσικές πηγές είναι πολύ ετερογενές για να κρυσταλλωθεί. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 οι οργανικοί χημικοί είχαν πλέον επινοήσει μεθόδους σύνθεσης DNA που επέτρεπαν τη σύνθεση ομογενών δειγμάτων. Ο Alexander Rich και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν κρυστάλλους του $d(CG)_3$, ενός παλινδρομικού εξαδεοξυριβονουκλεοτιδίου (δηλαδή ενός εξα-νουκλεοτιδίου που μπορεί να σχηματίσει δίκλωνο μόρια, αφού είναι συμπληρωματικό με τον εαυτό του):



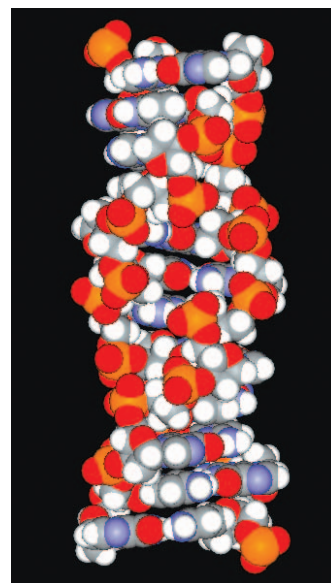
Ο Rich και οι συνεργάτες του εξέτασαν το πρότυπο περίθλασης ακτίνων X του κρυσταλλικού δίκλωνου τμήματος DNA, προκειμένου να απαντήσουν αν αντιστοιχούσε στο πρότυπο περίθλασης A-DNA ή B-DNA. Προς μεγάλη τους έκπληξη, όμως, ανακάλυψαν ένα τελείως νέο πρότυπο περίθλασης, υποδεικνύοντας μια εντελώς νέα στερεοδιαμόρφωση του DNA. Επειδή τα δεδομένα της περίθλασης έδειχναν ότι η φωσφοσακχαρική ραχοκοκαλιά ακολουθούσε μια πορεία ζιγκ ζαγκ (**EIKONA 3.18**), ο Rich και οι συνεργάτες του ονόμασαν αυτή τη νέα μορφή **Z-DNA**.

Αργότερα, σε άλλες μελέτες δείχθηκε ότι οι διαδοχικές επαναλήψεις πυριμιδίνης-πουρίνης, για παράδειγμα στο ολιγονουκλεοτίδιο $d(CA)_3$ και στο συμπληρωματικό με αυτό $d(TG)_3$, ζευγαρώνουν σχηματίζοντας ένα δίκλωνο μόριο το οποίο επίσης μπορεί να πάρει τη στερεοδιαμόρφωση Z. Ωστόσο, το $d(TA)_3$, στη δίκλωνη μορφή του, δεν μπορεί να πάρει τη στερεοδιαμόρφωση Z. Ακόμα και όταν ένα δίκλωνο μόριο μπορεί να πάρει τη στερεοδιαμόρφωση Z, αυτό θα συμβεί μόνο αν βρίσκεται σε ένα διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση άλατος. Για παράδειγμα,

ΕΙΚΟΝΑ 3.18 Z-DNA. (α) Z-DNA με τις ζυγκ ζαγκ ραχοκοκαλιές να απεικονίζονται ως λευκοί σωλήνες. Οι βάσεις, τα σάκχαρα και οι φωσφορικές ομάδες απεικονίζονται με «ράβδους και σφαίρες». (β) Το ίδιο Z-DNA απεικονίζεται ως χωροπληρωτικό μοντέλο. [Πηγή: Protein Data Bank 1D: 2ZNA. Wang, A. H. J., et al. *Science*.]



(α)



(β)

το εξανουκλεοτίδιο 5'-CGCGCG-3' χρειάζεται συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου μεγαλύτερη από 2 M ή συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου μεγαλύτερη από 0,7 M για να πάρει τη στερεοδιαμόρφωση Z. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις άλατος ευνοείται η στερεοδιαμόρφωση B. Αν μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία d(CG) περιέχεται σε μια μακρύτερη αλληλουχία DNA, όπως η:

5'-TGATC**CGCGCGCG**AGTCTT-3'
3'-ACTAG**GCGCGCGC**TCAGAA-5'

το τμήμα που αντιστοιχεί στην επαναλαμβανόμενη αυτή αλληλουχία είναι δυνατόν να πάρει τη στερεοδιαμόρφωση Z σε ένα διάλυμα χλωριούχου νατρίου 2 M, αλλά το υπόλοιπο DNA θα έχει τη στερεοδιαμόρφωση B.

Το Z-DNA είναι μια αριστερόστροφη έλικα. Το αριστερόστροφο Z-DNA και το δεξιόστροφο B-DNA δεν αποτελούν παραδείγματα οπτικού ισομερισμού, αλλά είναι εντελώς διαφορετικές δομές. Η διαφορά τους γίνεται αμέσως αντιληπτή, αν παρατηρήσουμε τις αύλακες. Στο Z-DNA οι δύο αύλακες έχουν τα ίδια γεωμετρικά χαρακτηριστικά, ενώ στο B-DNA υπάρχει μία μεγάλη και μία μικρή αύλακα (συγκρίνετε τις Εικόνες 3.17γ και β). Το ερώτημα που αμέσως προκύπτει είναι αν η αριστερόστροφη δομή έχει κάποια βιολογική σημασία. Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση αλάτων σίγουρα δεν προσεγγίζει ποτέ την τιμή 2 M, άρα η μορφή Z δεν μπορεί να σχηματιστεί *in vivo* εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης άλατος. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που συνάδουν με την ύπαρξη περιοχών μικρής

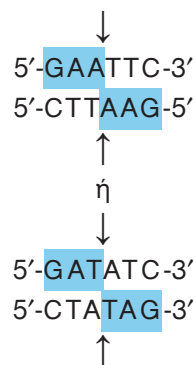
έκτασης μέσα στο γονιδίωμα με μορφή Z-DNA *in vivo*, τουλάχιστον παροδικά. Για παράδειγμα, αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά το Z-DNA προσδένονται ισχυρά στα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων της *Drosophila*. Επιπλέον, έχουν απομονωθεί από βακτήρια, ζυμομύκητες και ζώα πρωτεΐνες πρόσδεσης σε Z-DNA. Παρόλο που οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών πρόσδεσης σε Z-DNA δεν έχουν πλήρως εξακριβωθεί, από τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι στιγμής φαίνεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης ορισμένων ευκαρυωτικών γονιδίων. Ο σχηματισμός Z-DNA μπορεί να έχει και αρνητικές συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι περιοχές του γονιδιώματος με υψηλή πιθανότητα σχηματισμού Z-DNA έχουν αυξημένη πιθανότητα να υποστούν δίκλωνες ρήξεις, οι οποίες είναι δυνατόν να δημιουργήσουν χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που μπορεί οδηγήσουν σε πρόκληση καρκίνου.

Είναι πιθανό το DNA να εμφανίζει κι άλλες δομές *in vivo* εκτός από τη δομή B.

Έχουν παρατηρηθεί αρκετές δομές του DNA εκτός από το B-DNA. Ορισμένες περιοχές DNA μπορεί παροδικά να εμφανίζουν σταυροειδή, τρίκλωνη ή τετράκλωνη δομή.

Σταυροειδής δομή

Σταυροειδής δομή (cruciform structure) μπορεί να σχηματιστεί μόνο σε περιοχή που περιέχει μια αλληλουχία με **ανάστροφη επανάληψη** (inverted repeat), όπως:

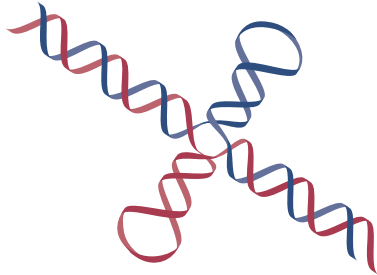


Τα βέλη δείχνουν το κεντρικό σημείο συμμετρίας: το δίκλωνο τμήμα στα δεξιά του κέντρου συμμετρίας μπορεί να τοποθετηθεί πάνω από το δίκλωνο τμήμα στα αριστερά, αν το περιστρέψουμε κατά 180 μοίρες. Επομένως η αλληλουχία από αριστερά προς τα δεξιά στην επάνω αλυσίδα επαναλαμβάνεται από δεξιά προς τα αριστερά στην κάτω αλυσίδα. Οι ανάστροφες επαναλήψεις μπορούν να έχουν μήκος μέχρι περίπου 50 bp.

(α) Ανάστροφες επαναλήψεις



(β) Σταυροειδής δομή



ΕΙΚΟΝΑ 3.19 Σταυροειδής δομή. (α) Τμήμα DNA με ανάστροφες επαναλήψεις. Τα βέλη πάνω και κάτω από τη δομή δείχνουν τις αναστροφes επαναλήψεις. (β) Ένα μόριο DNA που διαθέτει αναστροφή επανάληψη μπορεί να σχηματίσει σταυροειδή δομή. [Πηγή: Bacolla, A., and Wells, R. D. 2004. *J Biol Chem* 279:47411-47414.]

Οι μοριακοί βιολόγοι χρησιμοποιούν τον όρο «**παλίνδρομο**» (palindrome) όταν αναφέρονται σε μια αλληλουχία με αναστροφή επανάληψη. Ωστόσο, οι λεξικογράφοι πιθανόν να μη συμφωνούν με τη χρήση αυτού του όρου, διότι για την ακρίβεια σημαίνει «καρκινικός στίχος», δηλαδή λέξεις ή φράσεις που είναι συμμετρικές και μπορούν να διαβαστούν είτε από τα δεξιά προς τα αριστερά είτε από τα αριστερά προς τα δεξιά, όπως η γνωστότερη καρκινική επιγραφή: «ΝΙΨΟΝ ΑΝΟΜΗΜΑΤΑ ΜΗ ΜΟΝΑΝ ΟΨΙΝ». Θεωρητικά, τα μόρια DNA που διαθέτουν αναστροφes επαναλήψεις είναι δυνατόν να πάρουν δύο εναλλακτικές μορφές: ένα κανονικό δίκλωνο μόριο στο οποίο σχηματίζονται ζεύγη βάσεων μεταξύ των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων ή μια **σταυροειδή δομή** (cruciform structure) στην οποία σχηματίζονται ζεύγη βάσεων μεταξύ συμπληρωματικών περιοχών της ίδιας αλυσίδας, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δίκλωνες διακλαδώσεις (**ΕΙΚΟΝΑ 3.19**). Από την ανάλυση θεωρητικών μοντέλων και από υπολογισμούς της ενθαλπίας συμπεραίνουμε ότι οι σταυροειδείς δομές έχουν αυξημένη τάση στρέψης σε σύγκριση με τη δομή B-DNA. Σταυροειδείς δομές παράχθηκαν αρχικά στο εργαστήριο κάτω από ειδικές συνθήκες, αλλά έχουν ανιχνευτεί και *in vivo*.

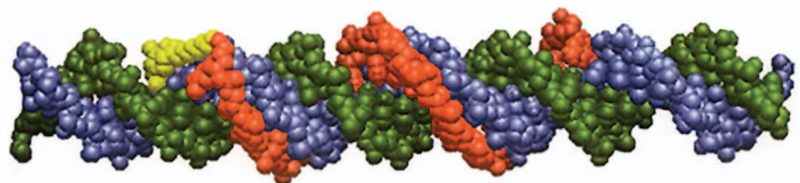
Τρίκλωνες δομές

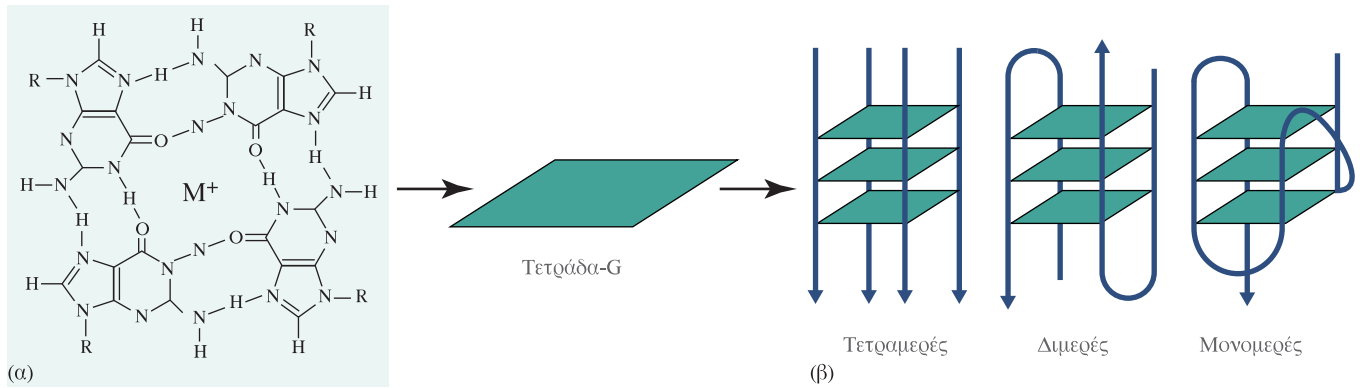
Κάτω από ορισμένες συνθήκες η διπλή έλικα του DNA μπορεί να δεχτεί μια τρίτη έλικα μέσα στη μεγάλη της αύλακα (**ΕΙΚΟΝΑ 3.20**), ώστε να σχηματιστεί μια τρίκλωνη δομή (triplex structure). Όταν σε μια περιοχή σχηματίζεται τρίκλωνη δομή *in vivo*, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης δίκλωνων ρήξεων και μεταλλαγών.

Τετράκλωνη δομή

Μία, δύο ή τέσσερις πλούσιες σε G αλυσίδες DNA μπορούν να σχηματίσουν μια τετράκλωνη δομή (**ΕΙΚΟΝΑ 3.21**). Η θεμελιώδης μονάδα μιας τετράκλωνης δομής είναι η τετράδα γουανινών (G-quartet), μια επίπεδη δομή που περιλαμβάνει τέσσερις γουανίνες οι οποίες συγκρατούνται συνδεδεμένες με οκτώ δεσμούς υδρογόνου. Δύο ή περισσότερες τετράδες στοιβάζονται η μία πάνω στην άλλη για να σχηματίσουν μια τετράκλωνη περιοχή

ΕΙΚΟΝΑ 3.20 Χωροπληρωτικό μοντέλο τρίκλωνου DNA. Οι αλυσίδες της διπλής έλικας κατά Watson-Crick απεικονίζονται με πράσινο και μοβ χρώμα. Το τρίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο (κόκκινο) που έχει σχηματιστεί μέσα στη μεγάλη αύλακα είναι σημασμένο με μια ομάδα ψωραλενίου (κιτρινοπράσινο) στο 5' άκρο του. [Πηγή: Vasquez, K. M., and Glazer, P. M. 2002. Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Quart Rev Biophys* 35:89-107.]





ΕΙΚΟΝΑ 3.21 Τετράκλωνη δομή. (α) Τετράδα γουανινών. (β) Τετραμερής δομή που απαρτίζεται από τρεις τετράδες γουανινών οι οποίες προέρχονται από τέσσερις, δύο ή μία μόνο αλυσίδα DNA. [Πηγή: Bates, P., Megny, J-L., and Yang, D. 2007. Quartets in G-major. *EMBO Rep* 11:1003-1010.]

(quadruplex ή tetraplex). Η δομή σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου και στοίβαξη βάσεων. Επιπλέον, η δομή σταθεροποιείται περαιτέρω από ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στις οκτώ γουανίνες και σε ένα μεταλλικό κατιόν, συνήθως Na^+ ή K^+ , το οποίο συναρμόζεται ανάμεσα σε δύο διαδοχικές τετράδες. Ο σχηματισμός ενδομοριακών τετράκλωνων τμημάτων (στα οποία οι γουανίνες των τετράδων ανήκουν στην ίδια αλυσίδα DNA) είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, διότι τα χρωμοσώματα των ευκαρυωτών διαθέτουν 3' προεξέχοντα μονόκλωνα άκρα πλούσια σε G. Σύμφωνα με ένα μοντέλο, οι τετράκλωνες περιοχές που σχηματίζονται από τα προεξέχοντα άκρα επηρεάζουν την αντιγραφή και τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων. Τετράκλωνο DNA μπορεί επίσης να σχηματιστεί σε περιοχές που ρυθμίζουν την έκφραση ορισμένων ευκαρυωτικών γονιδίων.

3.10 Η δομή του RNA

Το RNA επιτελεί πολλές διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες.

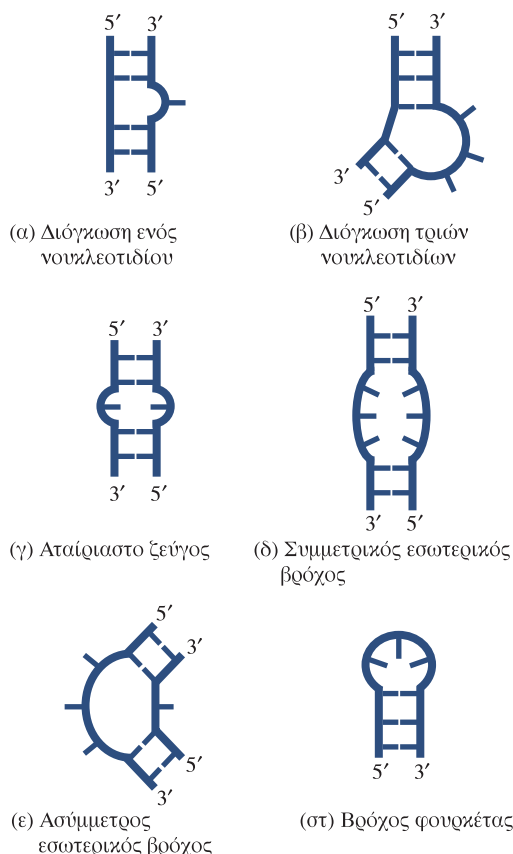
Όταν προτάθηκε το μοντέλο Watson-Crick για το B-DNA το 1953, οι γνώσεις μας για τη λειτουργία του RNA ήταν πολύ περιορισμένες. Ήταν γνωστό ότι μερικοί ιοί χρησιμοποιούσαν RNA ως γενετικό υλικό, αλλά αυτό δε φαινόταν να σχετίζεται με τη λειτουργία ή τις λειτουργίες του RNA στα κύτταρα, αφού τα κύτταρα χρησιμοποιούν ως κληρονομικό υλικό το DNA. Το θέμα των λειτουργιών του RNA φάνηκε να έχει λυθεί όταν βρέθηκε ότι τρία είδη μορίων RNA διαδραματίζουν απαραίτητους ρόλους στη σύνθεση των πολυπεπτιδίων. Το ριβοσωμικό RNA (ribosomal

RNA) δημιουργεί ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που σχηματίζουν τα ριβοσώματα (ribosomes), τα οποία λειτουργούν ως «εργοστάσια» σύνθεσης πρωτεϊνών. Το μεταφορικό RNA (transfer RNA) μεταφέρει ενεργοποιημένα αμινοξέα στα ριβοσώματα, όπου το αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA) καθορίζει τη σειρά με την οποία το ριβόσωμα προσθέτει αμινοξέα στη συντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, οι Sidney Altman και Thomas Cech έδειξαν, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, ότι ορισμένα μόρια RNA λειτουργούν ως καταλύτες οι οποίοι ονομάζονται **ριβοένζυμα** (ribozymes). Μέχρι τότε, οι μοριακοί βιολόγοι θεωρούσαν ότι μόνο οι πρωτεΐνες μπορούσαν να έχουν καταλυτική δράση. Έκτοτε, ο κατάλογος των λειτουργιών του RNA μεγαλώνει χρόνο με τον χρόνο.

Η δευτεροταγής δομή του RNA καθορίζεται κυρίως από το ζευγάρωμα βάσεων κατά Watson-Crick.

Η δομή του RNA, όπως και η δομή των πρωτεϊνών, διακρίνεται σε πρωτοταγή (primary), δευτεροταγή (secondary), τριτοταγή (tertiary) και τεταρτοταγή (quaternary) δομή. Η πρωτοταγής δομή ενός μορίου RNA αναφέρεται στην αλληλουχία των βάσεων του. Η δευτεροταγής δομή του RNA περιγράφει τις περιοχές στις οποίες το RNA βρίσκεται σε δίκλωνα μορφή και σταθεροποιείται με το ζευγάρωμα βάσεων κατά Watson-Crick. Στη δευτεροταγή μορφή περιγράφονται επίσης τα διάφορα είδη βρόχων (loops) και προεξοχών (bulges), καθώς και οι ενδομοριακές και διαμοριακές συνδέσεις (junctions). Η τριτοταγής δομή αφορά την οργάνωση όλων των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής σε μια τρισδιάστατη δομή, η οποία συχνά είναι συμπαγής και σταθεροποιείται από κατιόντα. Η τεταρτοταγής δομή περιγράφει τον τρόπο αλληλεπίδρασης ενός μορίου RNA με άλλα μόρια RNA ή με πρωτεϊνικά μόρια για τη δημιουργία πιο σύνθετων συμπλόκων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ορισμένα μόρια RNA δεν αποκτούν μια συγκεκριμένη σταθερή τρισδιάστατη δομή, αλλά λειτουργούν ως ευέλικτες μονόκλυνες αλυσίδες.

Οι κύριες δομικές μονάδες της δευτεροταγούς δομής του RNA είναι οι δίκλυνες έλικες που σταθεροποιούνται από το ζευγάρωμα συμπληρωματικών βάσεων κατά Watson-Crick και έχουν στερεοδιαμόρφωση παρόμοια με αυτή του A-DNA. Σπάνια αυτές οι δίκλυνες περιοχές ξεπερνούν σε μήκος τα 10 bp, αφού διακόπτονται από έναν ή περισσότερους βρόχους ή προεξοχές (**ΕΙΚΟΝΑ 3.22**). Η μικρότερη δυνατή προεξοχή προκύπτει από την παρουσία μιας μη ζευγαρωμένης βάσης (Εικόνα 3.22α). Αν η μη ζευγαρωμένη βάση στοιβαχτεί στο εσωτερικό της έλικας, η έλικα κάμπτεται. Αν η βάση στραφεί προς το εξωτερικό της



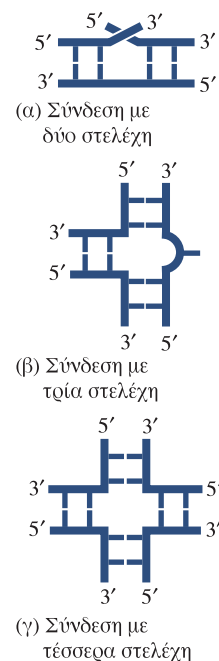
ΕΙΚΟΝΑ 3.22 Στοιχεία δευτεροταγούς δομής του RNA: βρόχοι και προεξοχές. [Πηγή: Nowakowski, J., and Tinoco, I. Jr. 1997. RNA structure and stability. *Semin Virol* 8:153-165.]

έλικας, η έλικά δεν κάμπτεται και η βάση μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα τμήματα του ίδιου μορίου RNA, άλλου μορίου RNA ή με κάποια πρωτεΐνη. Μεγαλύτερες προεξοχές προκύπτουν από την παρουσία επιπρόσθετων μη ζευγαρωμένων βάσεων (Εικόνα 3.22β). Ένας εσωτερικός βρόχος σχηματίζεται όταν ένα ή περισσότερα νουκλεοτίδια σε κάθε αλυσίδα του RNA παραμένουν μη ζευγαρωμένα. Ο μικρότερος βρόχος σχηματίζεται όταν ένα ζεύγος μη συμπληρωματικών βάσεων, δηλαδή ένα αταίριαστο ζεύγος, διακόπτει τη δίκλωνη έλικά (Εικόνα 3.22γ). Μεγαλύτεροι βρόχοι σχηματίζονται όταν η δίκλωνη έλικά διακόπτεται από περισσότερα αταίριαστα ζεύγη βάσεων. Όταν η κάθε αλυσίδα έχει τον ίδιο αριθμό αντικριστών μη ζευγαρωμένων βάσεων σχηματίζεται ένας συμμετρικός εσωτερικός βρόχος (Εικόνα 3.22δ), ενώ, όταν η μία αλυσίδα έχει περισσότερες μη ζευγαρωμένες βάσεις από την άλλη, σχηματίζεται ένας ασύμμετρος εσωτερικός βρόχος (Εικόνα 3.22ε). Μια **δομή φουρκέτας** (hairpin) ή **στέλεχος-βρόχος** (stem-loop) δημιουργείται όταν η ίδια αλυσίδα αναδιπλώνεται για να σχηματίσει ένα στέλεχος (περιοχή με ζευγαρωμένες βάσεις) και έναν βρόχο (περιοχή με αζευγάρωτες βάσεις). Ο βρόχος μιας φουρκέτας μπορεί να έχει μήκος δύο ή περισσότερα νουκλεοτίδια (Εικόνα 3.22στ).

Δίκλωνα στελέχη είναι δυνατόν να σχηματιστούν και από το ζευγάρωμα βάσεων που ανήκουν σε διαφορετικά μόρια RNA ή σε απομακρυσμένα τμήματα του ίδιου μορίου RNA. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας σύνδεσμος (ΕΙΚΟΝΑ 3.23). Οι σύνδεσμοι είναι σημαντικά δομικά στοιχεία, απαραίτητα για τη δημιουργία της συνολικής δομής του μορίου RNA. Όταν τα άκρα δύο δίκλωνων ελίκων RNA συνδέονται δημιουργώντας έναν σύνδεσμο, σχηματίζουν μια ενιαία δομή που μοιάζει με μακριά έλικά. Αυτή η αλληλεπίδραση δίκλωνων ελίκων μέσω των άκρων τους, η οποία ονομάζεται **ομοαξονική στοίβαξη** (coaxial stacking), σταθεροποιεί τον σύνδεσμο.

Η τριτοταγής δομή ενός μορίου RNA σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής του.

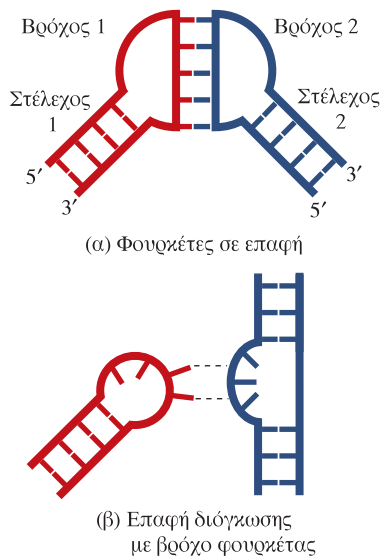
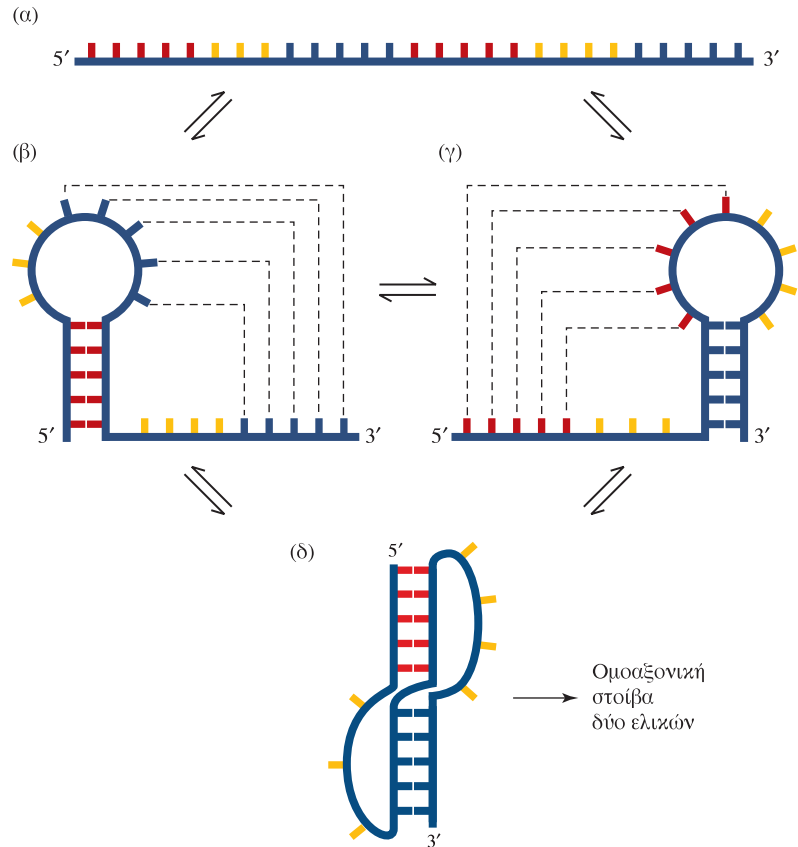
Η τριτοταγής δομή του RNA, δηλαδή η τρισδιάστατη δομή του μορίου, είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων δευτεροταγών δομών. Οι τριτοταγείς δομές σταθεροποιούνται από μεταλλικά ιόντα (π.χ. Na^+ , Mg^{2+}), τα οποία εξουδετερώνουν αρνητικά ηλεκτρικά φορτία του φωσφοσακχαρικού σκελετού. Έτσι, παύουν να υφίστανται απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις οι οποίες θα εμποδίζαν τον σκελετό του RNA να αναδιπλωθεί ώστε να σχηματίσει μια συμπαγή δομή.



ΕΙΚΟΝΑ 3.23 Στοιχεία δευτεροταγούς δομής του RNA που σχηματίζουν ενδομοριακές και διαμοριακές συνδέσεις. [Πηγή: Nowakowski, J., and Tinoco, I. Jr. 1997. RNA structure and stability. *Semin Virol* 8:153-165.]

ΕΙΚΟΝΑ 3.24 Δομή ψευδοκόμπου του RNA.

(α) Η πρωτοταγής δομή ενός RNA με δύο ζευγάρια συμπληρωματικών αλληλουχιών βάσεων. Το ένα ζεύγος απεικονίζεται κόκκινο και το άλλο μπλε. (β) Η δομή φουρκέτας (στέλεχος-βρόχος) σχηματίζεται όταν ζευγαρώσουν οι κόκκινες συμπληρωματικές βάσεις. (γ) Η δομή φουρκέτας (στέλεχος-βρόχος) σχηματίζεται όταν ζευγαρώσουν οι μπλε συμπληρωματικές βάσεις. (δ) Ο ψευδοκόμπος σχηματίζεται όταν οι βάσεις του βρόχου ζευγαρώσουν με μια συμπληρωματική μονόκλωνη περιοχή η οποία βρίσκεται δίπλα στο στέλεχος της φουρκέτας. Οι δίκλωνες περιοχές που προκύπτουν σχηματίζουν μια ομοαξονική στοίβα. [Πηγή: Varani, G. 2001. RNA structure. *Encyclopedia of Life Sciences* pp. 1-8.]



ΕΙΚΟΝΑ 3.25 Αλληλεπιδράσεις που συνδέουν απομακρυσμένα τμήματα RNA. (α) Αλληλεπίδραση σύνδεσης φουρκετών (φίλημα φουρκετών) και (β) αλληλεπίδραση βρόχου φουρκέτας με προεξοχή. [Πηγή: Nowakowski, J., and Tinoco, I. Jr. 1997. RNA structure and stability. *Semin Virol* 8:153-165.]

Παρακάτω περιγράφονται ορισμένα ειδικά δομικά στοιχεία που συνεισφέρουν στην τριτοταγή δομή.

Ένας **ψευδοκόμπος** (pseudoknot) σχηματίζεται όταν μια αλληλουχία βάσεων στον βρόχο μιας φουρκέτας ζευγαρώνει με μια συμπληρωματική μονόκλωνη περιοχή που βρίσκεται δίπλα στο στέλεχος της φουρκέτας (**ΕΙΚΟΝΑ 3.24**). Στην περίπτωση αυτή, οι δύο δίκλωνες περιοχές σχηματίζουν μια ομοαξονική στοίβα.

Διάφορες μορφές δομικών αλληλεπιδράσεων μπορούν να φέρουν σε επαφή απομακρυσμένες περιοχές ενός μεγάλου μορίου RNA. Δύο από αυτές τις αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται στην **ΕΙΚΟΝΑ 3.25**. Κατά την αλληλεπίδραση που ονομάζεται «επαφή φουρκετών» (kissing hairpins), δύο φουρκέτες συνδέονται μεταξύ τους, καθώς μη ζευγαρωμένα νουκλεοτίδια της μιας φουρκέτας ζευγαρώνουν με συμπληρωματικές βάσεις μιας άλλης φουρκέτας (**Εικόνα 3.25α**). Σε μια άλλη περίπτωση, ο βρόχος μιας φουρκέτας συνδέεται με μια προεξοχή, όταν μη ζευγαρωμένα νουκλεοτίδια της προεξοχής ζευγαρώνουν με συμπληρωματικές βάσεις της φουρκέτας (**Εικόνα 3.25β**).

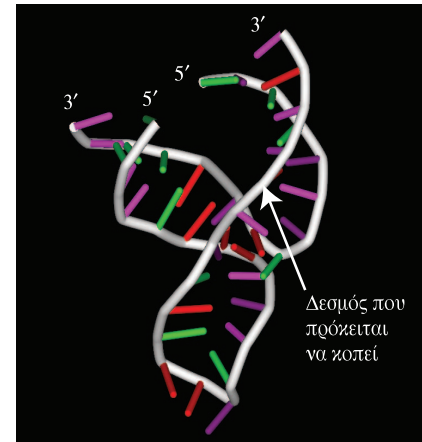
Σήμερα γνωρίζουμε την κρυσταλλική δομή πολλών μορίων RNA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δομές των καταλυτικών RNA. Το μικρότερο γνωστό καταλυτικό RNA είναι το σφυροκέφαλο ριβοένζυμο (hammerhead ribozyme), το οποίο πήρε το

ονομά του από την ομοιότητα του σχήματος της δευτεροταγούς δομής του με την κεφαλή του ομώνυμου καρχαρία (**ΕΙΚΟΝΑ 3.26**). Αρχικά απομονώθηκε από ιούς φυτών, αλλά ανάλογα μόρια έχουν βρεθεί σε όλα σχεδόν τα είδη οργανισμών. Έχει την ικανότητα να καταλύει το κόψιμο συγκεκριμένων φωσφοδιεστερικών δεσμών και αποτελεί μοντέλο μελέτης της λειτουργίας των ριβοενζύμων.

3.11 Η υπόθεση του κόσμου του RNA

Οι πρώτες μορφές ζωής στη Γη πιθανόν να χρησιμοποιήσαν RNA τόσο ως γενετικό υλικό όσο και ως απαραίτητους βιολογικούς καταλύτες.

Η ανακάλυψη των καταλυτικών ιδιοτήτων του RNA είχε πολύ σημαντικές επιπτώσεις στον τρόπο που αντιλαμβανόμαστε την εξέλιξη των βιοχημικών αντιδράσεων. Για πολύ καιρό, οι βιολόγοι διατύπωναν διάφορες υποθέσεις για το αν οι πρώτες μορφές ζωής που εμφανίστηκαν στη Γη περιείχαν DNA ή πρωτεΐνη. Ήταν δύσκολο να φανταστεί κανείς με ποιον τρόπο καθένα από τα δύο αυτά είδη μακρομορίων θα μπορούσε να λειτουργήσει απουσία του άλλου. Τα πρωτεϊνικά μόρια αναδιπλώνονται σε σταθερές τριτοταγείς δομές για να σχηματίσουν καταλυτικά κέντρα, αλλά δε μεταβιβάζουν γενετικές πληροφορίες. Το DNA αποθηκεύει και μεταβιβάζει γενετικές πληροφορίες, αλλά δεν έχει βρεθεί DNA στη φύση που να μπορεί να δράσει ως καταλύτης. Η φράση «να βρεθεί στη φύση» είναι σημαντικό κριτήριο, διότι στο εργαστήριο έχουν συντεθεί μόρια DNA που μπορούν να δράσουν ως καταλύτες. Τα μόρια RNA είναι περισσότερο ευέλικτα, επειδή η επιπρόσθετη 2' ομάδα υδροξυλίου τους επιτρέπει να σχηματίζουν σταθερές τριτοταγείς δομές που δεν μπορούν να σχηματιστούν στο DNA. Η ανακάλυψη ότι μόρια RNA που συναντώνται στη φύση διαθέτουν καταλυτικές ιδιότητες θα μπορούσε να επιλύσει το αιώνιο ερώτημα αν «η κότα έκανε το αυγό ή το αυγό την κότα». Οι πρώτοι πρόγονοι των σημερινών κυττάρων πιθανόν να περιείχαν RNA, ένα μόριο που μπορεί να αποθηκεύει γενετικές πληροφορίες αλλά και να καταλύει βιοχημικές αντιδράσεις. Άρα οι πρώτες μορφές ζωής μπορεί να ζούσαν σε έναν «κόσμο του RNA», υπόθεση που προτάθηκε αρχικά από τον Walter Gilbert το 1986. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, οι πρωτεΐνες σταδιακά αντικατέστησαν τα μόρια RNA ως καταλύτες για τις περισσότερες βιολογικές αντιδράσεις, επειδή οι πρωτεΐνες παρείχαν περισσότερες εναλλακτικές δομές και αλληλουχίες, ενώ το DNA αντικατέστησε σταδιακά τα μόρια RNA για την αποθήκευση της γενετικής πληροφορίας στα περισσότερα βιολογικά συστήματα, επειδή είναι σταθερότερο και ευκολότερο να επιδιορθωθεί.



ΕΙΚΟΝΑ 3.26 Κρυσταλλική δομή του σφυροκέφαλου ριβοενζύμου. Το βέλος δείχνει τον φωσφοδιεστερικό δεσμό που κόβεται με αυτοκατάλυση. [Πηγή: J. B. Murray, et al. 1988. *Cell* 92:665-673.]

Ερωτήσεις και προβλήματα

1. Δώστε με συντομία έναν ορισμό, μια περιγραφή ή σχεδιάστε τα παρακάτω:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| α. Ευκαρυώτης | ιγ. Αλυσομερές |
| β. Ιστόνες | ιδ. Τοποϊσομερές |
| γ. Αποδιάταξη του DNA | ιε. Τοποϊσομεράση |
| δ. Φαινόμενο της υπερχρωμικότητας | ιστ. Παλίνδρομο |
| ε. Θερμοκρασία τήξης του DNA | ιζ. A-DNA |
| στ. Αποπουρίνωση | ιη. Z-DNA |
| ζ. Επαναδιάταξη του DNA | ιθ. Σταυροειδής δομή |
| η. Ελικάση | κ. Δομή φουρκέτας |
| θ. Πρωτεΐνη SSB | κα. Ψευδοκόμπος |
| ι. Πρωτεΐνη αντιγραφής A | κβ. Ριβοένζυμο |
| ια. RFI | κγ. Ομοαξονική στοίβαξη |
| ιβ. Υπερέλικά | |

2. Δώστε μια σύντομη εξήγηση για καθένα από τα ακόλουθα φαινόμενα.

- Το DNA της *E. coli* είναι μήκους περίπου $4,6 \times 10^6$ bp στο ζωντανό κύτταρο, αλλά όταν το απομονώνουμε, βρίσκουμε DNA μήκους μόνο περίπου 5×10^4 bp.
- Η A_{260} για ένα γραμμικό δίκλωνο DNA σε διάλυμα αυξάνεται κατά περίπου 37% όταν το διάλυμα θερμανθεί από τους 25°C στους 90°C.
- Η T_m ενός γραμμικού δίκλωνου DNA είναι χαμηλότερη όταν το διάλυμα περιέχει NaCl 0,01 M από ό,τι όταν το διάλυμα περιέχει NaCl 0,02 M.
- Ένα γραμμικό δίκλωνο DNA με περιεχόμενο G + C 20% έχει χαμηλότερη T_m από ένα γραμμικό δίκλωνο DNA με περιεχόμενο G + C 80%.
- Η ιδανική θερμοκρασία για την επαναδιάταξη του DNA είναι περίπου 20-25 °C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης του DNA.
- Ένα γραμμικό δίκλωνο DNA δεν είναι ευαίσθητο σε μια DNάση η οποία είναι ειδική για μονόκλωνο DNA, αλλά αυτό το DNA καθίσταται ευαίσθητο στην ενζυμική υδρόλυση από την DNάση, εφόσον προστεθούν στο διάλυμα μια ελικάση και ATP.
- Οι βάσεις σε ένα γραμμικό δίκλωνο DNA αποκτούν ραδιενεργή σήμανση όταν το DNA αναμειχθεί με $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$.
- Η A_{260} ενός γραμμικού δίκλωνου DNA σε διάλυμα αυξάνεται όταν προστεθεί υδροξείδιο του νατρίου.
- Οι πρωτεΐνες SSB μειώνουν τη θερμοκρασία τήξης ενός γραμμικού δίκλωνου DNA.
- Μια νουκλεάση η οποία απομακρύνει ένα νουκλεοτίδιο τη φορά από το 5' άκρο ενός γραμμικού δίκλωνου DNA δεν έχει καμία επίδραση σε πλασμιδιακό DNA που έχει απομονωθεί από την *E. coli*.

3. Ποιες είναι οι διαφορές των πρωτεϊνών SSB από τις ελικάσες;

4. Ποιες είναι οι διαφορές της τοποϊσομεράσης I από την ελικάση DnaB;

5. Αναφέρετε τέσσερις παράγοντες που επηρεάζουν τη θερμοκρασία τήξης ενός γραμμικού δίκλωνου DNA.
6. Συγκρίνετε το B-DNA με το A-DNA και το Z-DNA.
7. Η DNA γυράση διαθέτει μια καταλυτική ενεργότητα που την ξεχωρίζει από τις άλλες τοποϊσομεράσες τύπου II.
 - α. Ποια είναι η διαφορά της DNA γυράσης από τις άλλες τοποϊσομεράσες τύπου II;
 - β. Γιατί ορισμένα αντιβιοτικά, όπως το ναλιδιξικό οξύ και η νοβομιοκίνη, που αναστέλλουν την DNA γυράση παρεμποδίζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη;
8. Πώς οι τοποϊσομεράσες τύπου II μετατρέπουν τα αλυσομερή που σχηματίζονται μετά την αντιγραφή του βακτηριακού DNA σε μεμονωμένα ομοιοπολικά κλειστά, κυκλικά μόρια DNA;
9. Ποιες είναι οι διαφορές των τοποϊσομερασών τύπου I από τις τοποϊσομεράσες τύπου II;
10. Γιατί μια DNάση ειδική για μονόκλωνο DNA κόβει ένα αρνητικά υπερελικωμένο πλασμίδιο (ομοιοπολικά κλειστό, κυκλικό μόριο DNA), αλλά δεν έχει καμία επίδραση στο ίδιο πλασμίδιο μετά τη χαλάρωσή του από την τοποϊσομεράση I;
11. Ανακαλύπτετε μια νέα καταλυτική ενεργότητα που κόβει RNA. Περιγράψτε μερικές απλές εργαστηριακές αναλύσεις που θα μπορούσατε να χρησιμοποιήσετε, για να προσδιορίσετε αν η ενεργότητα που απομονώσατε οφείλεται σε ένζυμο ή σε ριβοένζυμο.
12. Γιατί πολλοί βιολόγοι θεωρούν ότι στους πρώτους προγόνους των σημερινών κυττάρων υπήρχε RNA και όχι DNA ή πρωτεΐνη;

Προτεινόμενη βιβλιογραφία

Γενική βιβλιογραφία

- Bloomfield, V. A., Crothers, D. M., and Tinoco, I. Jr. 2000. *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. Herndon, VA: University Science Books.
- Bowater, R. P. 2005. DNA structure. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–8. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Calladine, C. R., and Drew, H. R. 1997. *Understanding DNA* (2nd ed.). San Diego, CA: Academic Press.
- Sinden, R. R. 1994. *DNA Structure and Function*. San Diego, CA: Academic Press.
- Soukup, G. A. 2001. Nucleic acids: general properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–9. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Κάμψη του DNA

- Harvey, S. C., Diakic, M., Griffith, J., et al. 1995. What is the basis of sequence-directed curvature in DNAs containing A tracts? *J Biomol Struct Dyn* 13:301–307.

Αποδιάταξη και επαναδιάταξη του DNA

Marmur, J., and Doty, P. 1961. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J Mol Biol* 3:585–594.

Marmur J., and Doty, P. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5:109–118.

Ελικάσες

Bailey, S., Eliason, W. K., and Steitz, T. A. 2007. Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science* 318:459–463.

Egelman, E. 2001. DNA helicases. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–5. London: Nature.

Patel, S. S., and Picha, K. M. 2000. Structure and function of hexameric helicases. *Ann Rev Biochem* 69:651–697.

Singleton, M. R., Dillingham, M. S., and Wigley, D. B. 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Ann Rev Biochem* 76:23–50.

Πρωτεΐνες πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA

Bochkarev, A., and Bochkareva, E. 2004. From RPA to BRCA2: lessons from single stranded DNA binding by the OB-fold. *Curr Opin Struct Biol* 14:36–42.

George, N. P., and Keck, J. L. 2009. Slip sliding on DNA. *Nature* 461:1067–1068.

Iftode, C., Daniely, Y., and Borowiec, J. A. 1999. Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB. *Crit Rev Biochem Molec Biol* 34:141–180.

Lohman, T. M., and Ferrari, M. E. 1994. *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Ann Rev Biochem* 63:527–570.

Raghunathan, S., Kozlov, A., Lohman, T., and Waksman, G. 2000. Structure of the DNA binding domain of *E. coli* SSB bound to ssDNA. *Nat Struct Biol* 7:648–652.

Shamoo, Y. 2002. Single-stranded DNA-binding proteins. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. London: Nature.

Wold, M. S. 2001. Eukaryotic replication protein A. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. London: Nature.

Τοποϊσομερή

Bates, A. D. 2001. Topoisomerases. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–9. London: Nature.

Bates, A. D., and Maxwell, A. 1993. DNA Topology. Washington, DC: IRL Press.

- Bauer, W. R., Crick, F. H. C., and White, J. H. 1980. Supercoiled DNA. *Sci Am* 243:100–113.
- Bowater, R. P. 2002. Supercoiled DNA structure. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–9. London: Nature.
- Hardy, C. D., Crisona, N. J., Stone, M. D., and Cozzarelli, N. R. 2004. Disentangling DNA during replication: a tale of two strands. *Phil Trans Royal Soc Lond B* 359:39–47.
- Lebowitz, J. 1990. Through the looking glass: the discovery of supercoiled DNA. *Trends Biochem Sci* 15:202–207.
- Lindsley, J. E. 2005. DNA topology: supercoiling and linking. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Mirkin, S. M. 2002. DNA topology: fundamentals. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–11. London: Nature.

Τοποϊσομεράσες

- Changela, A., Perry, K., Taneja, B., and Mondragón, A. 2002. DNA manipulators: caught in the act. *Curr Opin Struct Biol* 13:15–22.
- Corbett, K. D., and Berger, J. M. 2004. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 33:95–118.
- Nöllmann, M., Crisona, N. J., and Arimondo, P. B. 2007. Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: from *in vivo* function to single-molecule mechanism. *Biochimie* 89:490–499.
- Schoeffler, A. J., and Berger, J. M. 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quart Rev Biophys* 41:41–101.
- Wang, J. C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:430–440.
- Wang, J. C. 2009. A journey in the world of DNA rings and beyond. *Ann Rev Biochem* 78:31–54.

Στερεοδιαμορφώσεις DNA διαφορετικές από το B-DNA

- Armitage, B. A. 2007. The rule of four. *Nat Chem Biol* 3:203–204.
- Arnott, S. 2006. Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix. *Trends Biochem Sci* 31:349–354.
- Bacolla, A., and Wells, R. D. 2009. Non-B DNA conformations as determinants of mutagenesis and human disease. *Mol Carcinog* 48:273–285.
- Bates, P., Megny, J.-L., and Yang, D. 2007. Quartets in G-major. *EMBO Rep* 11:1003–1010.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., and Neidle, S. 2006. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res* 34:5402–5415.
- Dickerson, R. E. 1992. DNA structures from A to Z. *Methods Enzymol* 211:67–111.
- Dickerson, R. E., and Ng, H. L. 2001. DNA structure from A to B. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6986–6988.

- Gagna, C. E., Kuo, H., and Lambert, W. C. 1999. Terminal differentiation and left-handed Z-DNA: a review. *Cell Biol Int* 23:1–5.
- Herbert, A., and Rich, A. 1999. Left-handed Z-DNA: structure and function. *Genetica* 106:37–47.
- Mirkin, S. M. 2008. Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979–1989). *Frontiers Biosci* 13:1064–1071.
- Potaman, V. N., and Sinden, R. R. 2005. DNA: alternative conformations and biology. *DNA Conformation and Transcription*, T. Ohyama, ed. pp. 1–16. New York: Springer-Verlag.
- Rich, A. 2003. The helix: a tale of two puckers. *Nat Struct Biol* 10:247–249.
- Rich, A., and Zhang, S. 2003. Timeline: Z-DNA: the long road to biological function. *Nat Rev Genet* 4:566–572.
- Rogers, F. A., Lloyd, J. A., and Glazer, P. M. 2005. Triplex-forming oligonucleotides as potential tools for modulation of gene expression. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 5:319–326.
- Ussery, D. W. 2002. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA helix families. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–6. London: Nature.
- Vasquez, K. M., and Glazer, P. M. 2002. Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Quart Rev Biophys* 35:89–107.
- Wells, R. D., Dere, R., Hebert, M. L., Napierala, M., and Son, L. S. 2005. Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases *Nucleic Acids Res* 33:3785–3798.
- Wells, R. D. 2007. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. *Trends Biochem Sci* 32:271–278.

Δομή του RNA

- Batey, R. T., Rambo, R. P., and Doudna, J. A. 1999. Tertiary motifs in RNA structure and folding. *Angew Chem Int Ed* 38:2326–2343.
- Bevilacqua, P. C., and Bloise, J. M. 2008. Structures, kinetics, thermodynamics, and biological functions of RNA hairpins. *Ann Rev Biophys* 59:79–103.
- Brierley, I., Gilbert, R. J. C., and Pennell, S. 2008. RNA pseudoknots and the regulation of protein synthesis. *Biochem Society Trans* 36:684–689.
- Carter, R. J., and Holbrook, S. R. 2002. RNA structure: Roles of Me^{2+} . *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Cech, T. R. 2002. Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans* 30:1162–1166.
- Cheong, C., and Cheong, H.-K. 2001. RNA structure: tetraloops. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Cruz, J. A., and Westhof, E. 2009. The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell* 136:604–609.
- Doudna, J. A. and Cech, T. R. 2002. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 418:222–228.
- Draper, D. E. 2004. A guide to ions and RNA structure. *RNA* 10:335–343.
- Draper, D. E., Grilley, D., and Soto, A. M. 2005. Ions and RNA folding. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 34:221–243.

- Gultyaev, A. P., Pleij, C. W. A., and Westhof, E. 2005. RNA structure: pseudoknots. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Hendrix, D. K., Brenner, S. E., and Holbrook, S. R. 2005. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Quart Rev Biophys* 38:221–243.
- Hermann, T., and Patel, D. J. 2000. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure* 8:R47–R54.
- Holbrook, A. R. 2008. Structural principles from large RNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15:302–308.
- Hou, Y.-M. 2002. Base pairing in RNA: unusual patterns. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–7. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Leontis, N. B., and Westhof, E. 2001. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA* 7:499–512.
- Leontis, N. B., and Westhof, E. 2003. Analysis of RNA motifs. *Curr Opin Struct Biol* 13:300–308.
- Leontis, N. B., Lescoute, A., and Westhof, E. 2006. The building blocks and motifs of RNA architecture. *Curr Opin Struct Biol* 16:279–287.
- Nowakowski, J., and Tinoco, I. Jr. 1997. RNA structure and stability. *Semin Virol* 8:153–165.
- Schroeder, E., Barta, A., and Semrad, K. 2004. Strategies for RNA folding and assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:908–919.
- Staple, D. W., and Butcher, S. E. 2005. Pseudoknots: RNA structures with diverse functions. *PLoS Biol* 3:956–959.
- Tung, C.-S. 2002. RNA structural motifs. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–4. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Varani, G. 2001. RNA structure. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–8. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Walter, F., and Westhof, E. 2002. Catalytic RNA. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp. 1–12. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Υπόθεση του κόσμου του RNA

- Cech, T. R. 2009. Crawling out of the RNA world. *Cell* 136:599–602.
- Gesteland, R. F. (ed.). 2005. *The RNA World* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Press.