

Dłoń przedząca nić



ANNA BĘBENEK

Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk, Warszawa
aniab@ibb.waw.pl

Dr hab. Anna Bębenek pracuje w Zakładzie Biologii Molekularnej IBB PAN. Kieruje pracownią, która zajmuje się mechanizmami wierności replikacji DNA. Interesuje się zagadnieniami związanymi z oddziaływaniami białek replisomu, a także z przekazywaniem końca startera pomiędzy domenami polimerazy i egz nukleazy.

Powielanie kwasu nukleinowego (RNA lub DNA) ma kluczowe znaczenie dla komórki. Z procesem tym, który musi być niezwykle precyzyjny, doskonale radzą sobie polimerazy. Dzięki specyficznej budowie potrafią zbudować nową nić na podstawie jednoniciowej matrycy

Pierwsze doniesienia o istnieniu enzymów posiadających zdolność syntetyzowania DNA pojawiły się w 1958 roku, kiedy grupa Artura Kornberga opisała polimerazę wyizolowaną z bakterii *Escherichia coli*. Nazwano ją polimerazą I (Pol I). Wkrótce okazało się, że zarówno u bakterii, jak i organizmów eukariotycznych istnieje wiele polimeraz, z których każda odznacza się innymi właściwościami. Intensywny rozwój technik sekwencjonowania przyniósł pod koniec XX wieku nową wiedzę: obecnie znanych jest pięć polimeraz występujących u bakterii, sześć w komórkach drożdży i szesnaście w komórkach ssaków. Na podstawie podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej podzielono je na siedem rodzin.

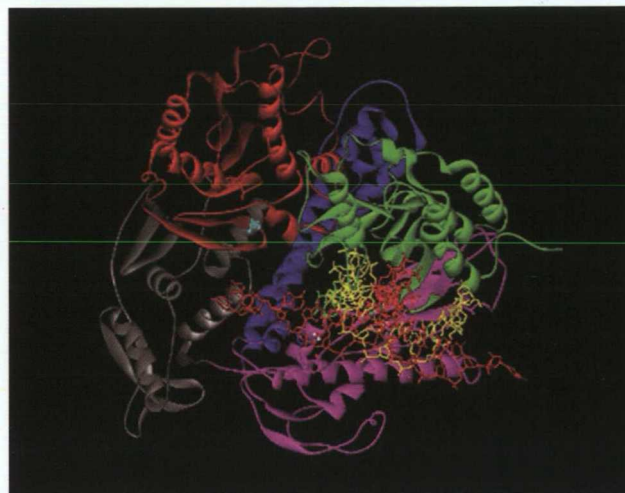
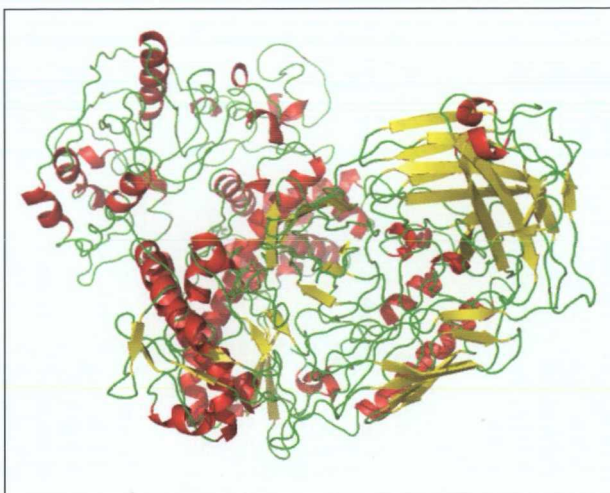
Rodzina A obejmuje wszystkie polimerazy przypominające Pol I. Należy do niej m.in. polimeraza Taq wykorzystywana rutynowo w laboratoriach molekularnych do powielania w próbówce badanych genów. Rodzina B zawiera główne polimerazy powielające genom w komórkach eukariotycznych, takich jak ludzkie, a także polimerazy bakteriofagów, czyli wirusów żerujących na bakteriach. Rodzina C to głównie polimeraza replikacyjna bakterii *E. coli*. Pozostałe rodziny (C, X, Y, RT) zawierają polimerazy o specyficznych funkcjach, na przykład występujące u niektórych wirusów polimerazy zdolne do syntezy nici DNA na matrycy RNA czy też telomerazy do budowy nić DNA na końcu 3'.

Z różnorodnością polimeraz wiąże się szerokie spektrum ich funkcji, na przykład polimerazy z rodziny X i Y, a także niektóre z rodziny A uczestniczą w procesach naprawy DNA. Ich rola polega na wypełnianiu luk powstałych w czasie działania enzymów naprawczych lub też na syntezie uszkodzonego fragmentu DNA. Jednak najważniejszą funkcją polimeraz jest powielanie materiału genetycznego, który następnie przekazywany jest do komórek potomnych. W procesie tym uczestniczą polimerazy z rodziny A i B. Obok domeny polimerazy, czyli podstawowej jednostki strukturalnej, zawierają one dodatkową domenę korektorską, która usuwa nieprawidłowo wstawione nukleotydy z 3' końca nowo syntetyzowanego łańcucha.

Prawie bezbłędnie

Do rozpoczęcia procesu replikacji konieczne jest lokalne rozplecenie helisy DNA w tzw. miejscu inicjacji replikacji. Nić DNA odczytywana jest zawsze w jednym kierunku, od końca 3' do końca 5'. Kiedy struktura helisy ulegnie rozpleceniu, enzym prymaza syntetyzuje krótkie cząsteczki RNA stanowiące starter dla polimerazy. Polimeraza przypomina trochę pod tym względem niewprawną osobę robiącą na drutach – potrafi kontynuować pracę, tylko jeśli ktoś inny ją zacznie. Wtedy polimeraza rozpoznaje koniec nici RNA zaczętej przez prymazę i od tego miejsca zaczyna dobudowywać kolejne nukleotydy, czyli cegiełki stanowiące podjednostki DNA komplementarne do nukleotydów tworzących sekwencję na matrycy, czyli nici DNA stanowiącej wzorzec. Synteza DNA odbywa się zawsze w kierunku 5'-3'. Cząsteczkami, z których budowane jest nowe DNA, czyli substratem dla polimerazy, są trifosforany dezoksyrybonukleotydów (dNTP), które wbudowywane są do rosnącego łańcucha. Pod względem chemicznym reakcja ta polega na stworzeniu wiązania fosfodiesterowego pomiędzy α fosforanem wchodzącego nukleotydu a grupą 3'-OH ostatniego nukleotydu startera. Towarzyszy temu hydroliza wiązania fosforanowego i uwolnienie dwóch grup fosforanowych tzw. pirofosforanu.

Polimeraza nie działa bezbłędnie. Na etapie przyłączania nukleotydu myli się raz na 105-106 replikowanych zasad. Aktywność korektorska pozwala zmniejszyć błąd 100-1000 razy w zależności od rodzaju polimerazy, tak więc ostatecznie podczas replikacji raz na 108-109 zasad do nowo powstającej nici DNA zostaje wstawiony nieprawidłowy nukleotyd.



Wikimedia Commons

Po lewej: Taq – polimeraza najpospoliciej wykorzystywana w laboratoriach molekularnych. Służy do powielania cząsteczek DNA *in vitro*
Po prawej: struktura polimerazy RB69 – kompleks potrójny polimerazy oraz DNA matrycy-startera z wchodzącym nukleotydem. Kolorem niebieskim zaznaczono domenę palców, fioletowym domenę spodu dłoni, zielonym domenę kciuka, czerwonym domenę egzonukleazy, szarym N-końcową domenę. W strukturze tej widać także DNA matrycy (kolor czerwony) i startera (żółty) związane w centrum aktywnym polimerazy. W tym ujęciu nie jest widoczny wchodzący nukleotydy.

Palce polimerazy

Poznanie budowy polimeraz stało się możliwe dzięki pracom Toma Steitza, który w 1985 roku uzyskał pierwszą strukturę krystalograficzną fragmentu Klenowa polimerazy I z *E. coli*. Od tego czasu poznano struktury prawie wszystkich przedstawicieli poszczególnych rodzin polimeraz. Okazało się, że – niezależnie od różnic w sekwencji aminokwasowej – wszystkie polimerazy mają podobną budowę. Przypominają kształtem półotwartą prawą dłoń, a domenom przypisano nazwy „palce”, „spód dłoni” i „kciuk”.

We wszystkich opisanych dotychczas polimerazach centrum aktywne znajduje się na spodzie „dłoni”. Odpowiada ono za wiązanie końca startera i α fosforanu przyłączanego nukleotydu. Miejsce to jest silnie konserwowane, tzn. że w toku ewolucji jego budowa zmienia się bardzo powoli. Mimo pewnych różnic na poziomie sekwencji aminokwasowej struktury domen „spodu dłoni” różnych polimeraz są podobne, co oznacza, że wszystkie polimerazy wykorzystują ten sam mechanizm przekazywania nukleotydu.

Chociaż struktury domen „palców” i „kciuka” różnią się we wszystkich pięciu rodzinach polimeraz, zarówno „palce”, jak i „kciuk” pełnią w nich podobne funkcje. Domena palców uczestniczy w oddziaływaniach polimerazy z jednoniciowym DNA matrycy oraz z dołączanym nukleotydem, czyli cegiełką nowo powstającej nici DNA. W obrębie każdej rodziny polimeraz sekwencja domeny palców jest konserwowana. Z kolei domena kciuka oddziałuje z dwuniciowym DNA i przypuszczalnie odgrywa ona istotną rolę we właściwym ustawieniu matrycowego DNA w centrum aktywnym polimerazy. Ponadto wpływa

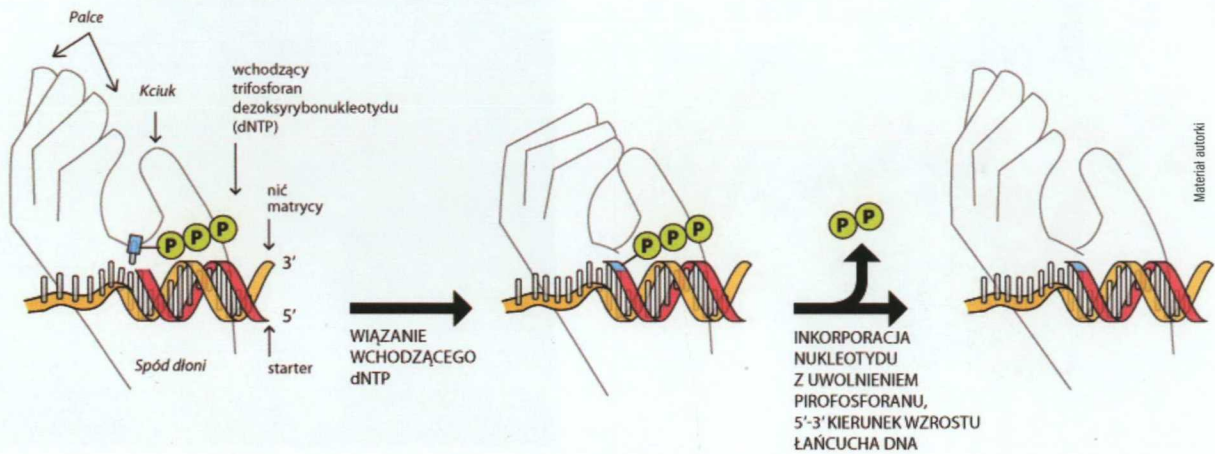
też na procesywność polimerazy i bierze udział w jej przesuwaniu się na matrycy DNA.

Tylko się nie pomył!

Dla zrozumienia działania polimerazy kluczowe znaczenie miały badania kinetyczne oraz porównanie struktur krystalicznych kompleksów złożonych z polimerazy, DNA i dNTP z odpowiadającymi im kompleksami polimerazy związanej tylko z DNA. Dzięki temu odkryto, jak polimeraza odróżnia właściwy nukleotydy od niewłaściwego. Okazało się, że wiązanie dNTP powoduje istotne zmiany w orientacji przestrzennej DNA i domeny palców, dzięki czemu tworzy się miejsce dla nowo przyłączanego nukleotydu i nukleotydu matrycy. „Dłoń” polimerazy zamyka się – domena palców skręca się w kierunku domeny spodu dłoni, tworząc tzw. zamkniętą konformację. Dzięki temu domeny palców mogą teraz kontaktować się z dołączanym dNTP. Zamykają się one wokół niego i komplementarnej zasady matrycy, tworząc „kieszonkę wiążącą nukleotydy”. To geometria tej kieszonki sprawia, że dołączony może zostać tylko właściwy nukleotydy, czyli odpowiadający nukleotydy na matrycy. Jeżeli do startera zostanie przyłączony niewłaściwy nukleotydy, to albo palce polimerazy otworzą się i będzie ona szukała nowego prawidłowego nukleotydu, albo – w przypadku polimeraz posiadających funkcję korektorską – koniec startera trafi do centrum aktywnego egzonukleazy, gdzie niewłaściwy nukleotydy zostanie usunięty.

Ciekawym wyjątkiem są polimerazy rodziny Y. Charakteryzują się one niską wiernością replikacji na nieuszkodzonym DNA, ale za to potrafią powielać DNA o zaburzonej symetrii, które nie może być powie-

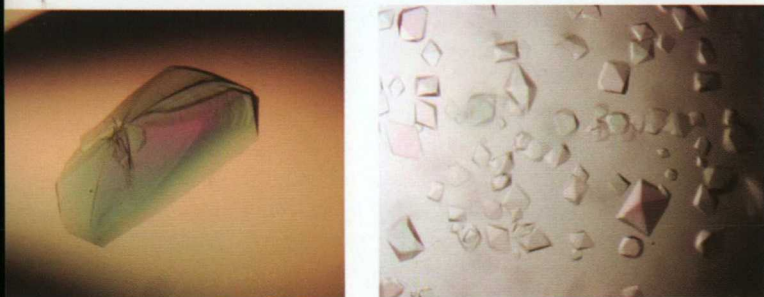
Rola polimeraz w powielaniu kwasu nukleinowego



Reakcja polimeryzacji - włączania komplementarnego do matrycy trifosforanu dezoksyrybonukleotydu (dNTP) do końca startera. Polimeraza przedstawiona jest jako półotwarta prawa dłoń z domenami „palców”, „kciuka” i „spodu dłoni”. Włączeniu nowego nukleotydu towarzyszy zmiana konformacji z otwartej do zamkniętej w czasie wiązania nukleotydu w centrum aktywnym oraz ponownym otworzeniu się polimerazy po zakończeniu inkorporacji nukleotydu

lane przez polimerazy replikacyjne. Centrum aktywne tych polimeraz różni się od pozostałych, a ich kieszonka wiążąca nukleotyd jest znacznie większa i może rozpoznać DNA o zmienionej, zaburzonej strukturze, związać się z nim, a także wstawiać niewłaściwe zasady. Dzięki temu polimerazy z rodziny Y mogą replikować uszkodzone DNA. Kosztem zmniejszonej wierności powielania DNA zachowana jest ciągłość replikacji DNA w komórkach.

merazą RB69, która stanowi model dla polimeraz rodziny B. Za pomocą ukierunkowanej mutagenyzy zmieniamy te aminokwasy, które wydają się istotne dla oddziaływań polimerazy z DNA lub wchodzącego dNTP i charakteryzujemy tak otrzymane mutanty pod kątem ich właściwości. Badamy także wierność prowadzonej przez nie replikacji w testach genetycznych, zarówno in vivo, jak i in vitro. Wyniki z naszej pracowni oraz innych laboratoriów pozwoliły na określenie roli aminokwasów domeny palców tworzących część kieszonki wiążącej nukleotyd oraz roli aminokwasów oddziałujących z fosforanem dołączanego przez polimerazę nukleotydu. Określiliśmy także, jakie rejony polimerazy są odpowiedzialne za oddziaływanie z DNA i wiązanie polimerazy do substratu. Badania takie prowadzone są także na polimerazach należących do innych rodzin, a wyniki uzyskane z tych eksperymentów poprawiły znacznie nasze rozumienie funkcji tych polimeraz w komórce. ■



Kryształy polimerazy RB69. Wybrane kryształy poddawane są dalszej analizie przy udziale promieniowania rentgenowskiego. Na podstawie rejestracji obrazów dyfrakcyjnych promieniowania X można ustalić rzeczywistą strukturę polimerazy

Co widzimy

Nasz wiedza o mechanizmach działania oraz biologicznej roli polimeraz bardzo się poszerzyła z chwilą otrzymania struktur krystalograficznych dla tych enzymów. W naszej pracowni prowadzimy badania nad poli-

Chcesz wiedzieć więcej?

- Joyce C.M., Steitz T.A. (1994). Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 777-822.
- Kunkel T.A., Bębenek K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 497-529.
- Bębenek A. (2008). Mechanizmy replikacji DNA. *Postępy Biochemii* 54, 43-56.
- Yang W. (2014). An overview of Y-family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase ϵ . *Biochemistry* 53, 2793-2803.
- Doublé S., Zahn K.E. (2014). Structural insight into eukaryotic DNA replication. *Front. Microbiol* 5, 444.
- Xia S., Konigsberg W.H. (2014). RB69 DNA polymerase, structures, kinetics, and fidelity. *Biochemistry* 53, 2752-2767.