

Bogactwo polimeraz DNA chroni nasze geny

Wierni kopiści



WOJCIECH KUBAN

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

Odpowiedzialną pracę kopiowania materiału genetycznego wykonują białka zwane polimerazami DNA. Tylko wielkie bogactwo typów polimeraz zapewnia niezwykłą precyzję i tempo tego fundamentalnego dla życia komórki procesu

Mgr inż. Wojciech Kuban w ramach pracy doktorskiej bada mechanizmy wierności replikacji DNA w komórkach bakterii *Escherichia coli* w zespole prowadzonym przez prof. dr hab. Iwonę Fijałkowską oraz doc. dr. hab. Piotra Jonczyka

Kiedy przy porannym goleniu lekko się zacynam, nie zastanawiając się długo wklepuję odrobinę wody kolońskiej i wyruszam z domu do pracy. Podczas gdy beczynnienie jadę kolejką podmiejską, mój organizm nie pozwala na przerwę: od razu przystępuje do odbudowy uszkodzonego naskórka. Tak jest każdego dnia, nasze komórki muszą się dzielić, a potomne mają od razu sprawnie zastępować te starsze i uszkodzone. Dziś wiemy, że informacja o ich budowie i działaniu zapisana jest w jądrze komórkowym, w sekwencji genów zbudowanych z kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Aby powstawały nowe komórki, niezbędne jest wierne i szybkie kopiowanie informacji genetycznej. Jest to możliwe dzięki swoistej budowie DNA. Jego cząsteczki składają się z dwóch nici, które „spięte” są ze sobą dzięki wiązaniom wodorowym. DNA zbudowane jest z czterech rodzajów nukleotydów, symbolicznie oznakowanych literami: A, C, G oraz T. Istnieje bardzo istotna dla przepisywania informacji genetycznej reguła: A z jednej nici zawsze tworzy parę z T na drugiej, a G z C. Zatem maszyna komórkowa, stosując tę zasadę, może wierne kopiować geny: rozplątuje nici DNA i, traktując jedną nici jako wzorzec, „dopisuje” drugą.

Molekularni skrybowie odpowiedzialni za tę najbardziej fundamentalną dla organizmów funkcję, to enzymy zwane polimerazami DNA. Dwie nici „drabinki” DNA są rozdzielane, a cząsteczki polimerazy wiążą się z po-

jedynczymi łańcuchami DNA. Dzięki dokładnemu dopasowaniu przestrzennemu, „odczytują” kolejne nukleotydy i na podstawie tego wzorca dobudowują nową nici. Obie rozdzielone matrycowe nici są kopiowane jednocześnie, a struktura, którą przyjmuje DNA wraz z kompleksami białkowymi w trakcie replikacji, nazywana jest widełkami replikacyjnymi.

Cały genom człowieka to ok. 6 miliardów nukleotydów. Liczba ta jest dość abstrakcyjna, spróbujmy więc ją urealnić. Zaczniemy liczyć, wypowiadając jedną liczbę na sekundę. Do miliona dojdziemy dopiero po 11 dniach.

Odpowiedzialną pracę „przepisywania” genów wykonywaną przez polimerazy DNA można porównać do mozolnego rękopiśmiennictwa skrybów - od ich precyzji i bezbłędności zależy wierne kopiowanie bezcennego dla kolejnych pokoleń materiału

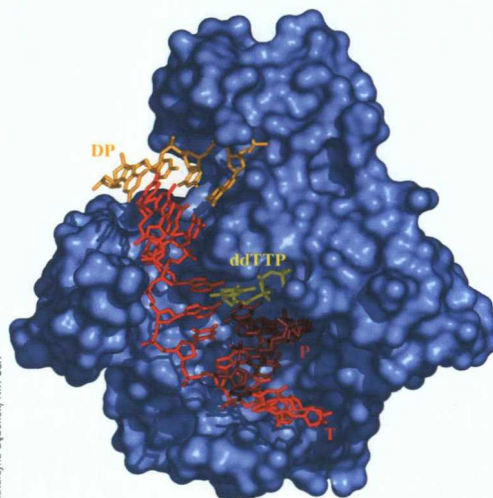
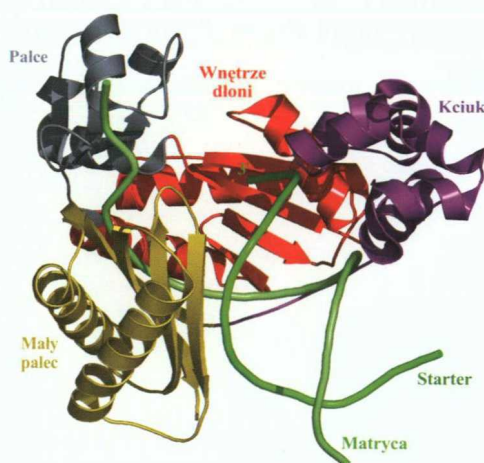


W ludzkim genomie jest jednak aż 6 tysięcy razy więcej nukleotydów do skopiowania, musielibyśmy zatem liczyć przez 180 lat! Praca polimeraz DNA jest utrudniona dodatkowo przez działanie czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, które uszkadzają matrycę DNA. Mogą one blokować syntezę nowo powstających nici lub/i prowadzić do zmiany w zapisie, czyli powodować mutacje. Jak polimerazy mogą temu podołać?

Prawa dłoń

Całość procesu replikacji najłatwiej jest porównać do przepisywania tekstu na komputerze. Pracując staramy się nie popełniać błędów – to pierwsza cecha polimeraz DNA – precyzyjna selekcja właściwego nukleotydu. Polimerazy mylą się rzadko – najbardziej precyzyjne enzymy popełniają błąd raz na 100 tys. poprawnie wstawionych nukleotydów! Błędy jednak się zdarzają. Na szczęście polimerazy dzięki tzw. aktywności „edytorskiej” mogą wycinać błędne nukleotydy, podobnie jak my używamy klawisza „backspace” na klawiaturze. Dzięki temu wierność procesu replikacji zwiększa się 100-krotnie. Co niezwykle, polimerazy DNA są nie tylko bardzo dokładne w swojej pracy, wykonują ją również z imponującą szybkością, kopiując około 1000 nukleotydów na sekundę! Wykonując ostateczną korektę, już po zakończeniu pisania, wybieramy wreszcie funkcję „sprawdź pisownię”. Także komórka ma do dyspozycji trzeci mechanizm zwiększający dokładność replikacji, postreplikacyjny system naprawy błędnie sparowanych zasad (ang. MMR), dzięki któremu precyzja kopiowania wzrasta jeszcze 1000 razy.

Wielką precyzję replikacji DNA zawdzięczamy strukturze polimeraz i cechom, w które zostały wyposażone. Mają one kształt dłoni prawej ręki, w której można wyodrębnić części zwane domenami: domenę wnętrza dłoni, palców i kciuka oraz, w niektórych przypadkach, domenę egzonukleazy. W wewnętrznej części dłoni znajduje się centrum aktywne polimerazy, które wiąże nukleotydy i spina je w łańcuch DNA. Domeny kciuka i palców pomagają utrzymać się enzymowi na łańcuchu DNA we właściwej pozycji, ustawić matrycę w centrum aktywnym i mają znaczący wpływ na tempo replikacji. Do poprawiania błędów służy korektorska domena egzonukleazy, dzięki której następuje przemieszcze-



Katarzyna Bebenek/NIH USA

Obrazy struktury krystalicznej polimeraz Dpo4 i ludzkiej Pol λ uzyskanej metodą dyfrakcji promieniowania Rtg. (Ilustracja dzięki uprzejmości prof. Katarzyny Bebenek, NIH):
A. Struktura Dpo4, polimerazy z rodziny Y, z bakteryjnego wirusa T7. Nici DNA zaznaczone są na zielono.

B. Pol λ DNA z komórek ludzkich, członek rodziny X, w kompleksie z DNA pozbawionym jednego nukleotydu. Obraz polimerazy pokazuje jej powierzchnię (niebieska). Nić matrycowa (T), nić starterowa (P), starter dolny (DP) oznaczone są (odpowiednio) na jasnoczerwono, ciemnoczerwono i złoto. Nadchodzący ddTTP jest żółty

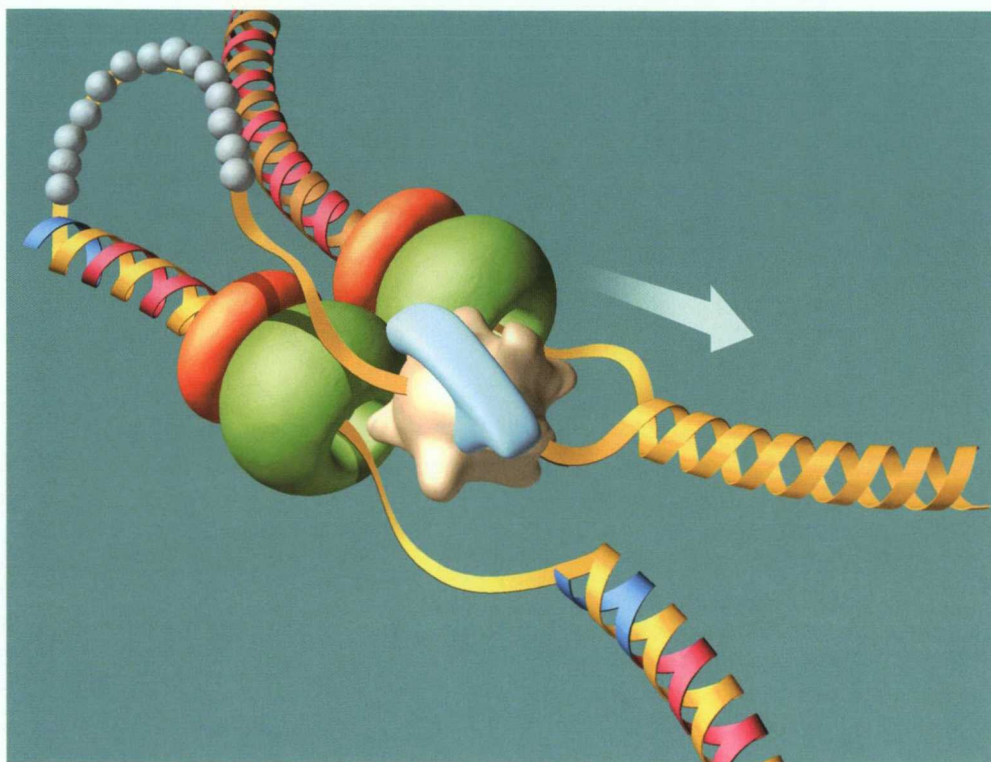
nie łańcucha DNA „wstecz” i wycięcie błędnie wstawionego nukleotydu.

Do niedawna replikacja wydawała się procesem, który przeprowadza zaledwie kilka enzymów. Dziś dowiadujemy się o wielkiej liczbie białek obdarzonych zdolnością syntezy DNA, co wydawać by się mogło znaczną rozrzutnością natury. Czy rzeczywiście tak jest? Po co komórkom tak wielka różnorodność polimeraz DNA?

Olbrzymią przeszkodą dla replikacji i prawidłowego działania genów są modyfikacje i uszkodzenia DNA spowodowane działaniem czynników fizycznych i chemicznych. Stanowią one dramatyczne zagrożenie dla spójności, kopiowania i przekazywania informacji genetycznej komórkom potomnym. Aby uniknąć tego niebezpieczeństwa, komórki dysponują nie jednym, ale całą plejadą różnych rodzajów polimeraz, z których każda posiada specyficzne cechy niezbędne w określonych i wyjątkowych okolicznościach. W ciągu

Bogactwo polimeraz DNA chroni nasze geny

DNA i białka biorące udział w syntezie tworzą tzw. widelki replikacyjne. Jedna z nici kopiowana jest w sposób ciągły („nić prowadząca”), a druga – nieciągły („nić opóźniona”). Polimeraza (zielona) prowadzi syntezę DNA, helikaza (biała) rozplata rodzicielską podwójną helisę, primaza (niebieska) produkuje startery do syntezy, pomarańczowy pierścień β utrzymuje główną polimerazę na nici, a białka wiążące jednoniciowy DNA (białe kuleczki) chronią DNA przed pękaniem. Rodzicielskie nici, nowo syntetyzowane nici i startery RNA mają kolor (odpowiednio) żółty, różowy i niebieski



Wazymiec Świecicki

ostatnich kilku lat odkryto cały szereg nowych białek o aktywności polimerazy DNA. Każdej odkrytej polimerazie nadaje się imię – zwykle literę z greckiego alfabetu. W sumie w bakterii *Escherichia coli* jest ich 5, w komórkach organizmów wyższych scharakteryzowano ich już kilkanaście, a w ludzkich – 16!

Jak w rodzinie

Zasadniczo funkcjonalnie możemy podzielić polimerazy DNA na replikujące (biorące na siebie większość syntezy genomu przed podziałem komórki) oraz naprawcze – uczestniczące w procesach reperacji lub umiejące kopiować DNA, kiedy wzorcem jest uszkodzona matryca. Dokładniejsza charakterystyka tych enzymów umożliwi podzielenie ich na klasy.

Polimerazy DNA z klasy A, podobne (czyli homologiczne) do polimerazy I DNA z *E. coli*, zaangażowane są w naprawę DNA przez wycinanie oraz procesowanie fragmentów Okazaki, które powstają w czasie syntezy tzw. nici opóźnionej DNA. W klasie B zgrupowano enzymy podobne do polimerazy II DNA z *E. coli*, i są to podstawowe komórkowe replikazy. Chociaż polimeraza II nie jest niezbędna do życia bakterii, utrata polimeraz z rodziny B u wyższych organizmów kończy się śmier-

cią komórki. Choć enzymy te są bardzo szybkie i precyzyjne, „nie lubią” napotykać na swej drodze uszkodzeń DNA, a kiedy tak się stanie – zatrzymują się, i w rezultacie często odłączają się od nici DNA. Klasę X stanowią polimerazy homologiczne do ludzkiej pol β , które specjalizują się w naprawach uszkodzeń DNA. Całkiem niedawno wyodrębniono klasę Y, do której zaliczamy polimerazy wysoce wyspecjalizowane w naprawie uszkodzeń DNA. Ich struktura nie pozwala na dokładne dopasowanie do DNA, dlatego są mniej „wrażliwe” na odkształcenia matrycy (uszkodzenia). Jednak z tego powodu często popełniają błędy w trakcie syntezy oraz bardzo łatwo „spadają” z DNA. W rezultacie najczęściej wstawiają pojedyncze nukleotydy naprzeciw uszkodzenia (nawet kosztem błędu), umożliwiając utrzymanie ciągłości nici DNA i kontynuację replikacji przez inne polimerazy.

Bakterie – modele

Tak fundamentalne dla przeżycia komórki procesy, jak replikacja DNA czy podziały komórkowe, stosunkowo mało zmieniały się w trakcie ewolucji. Dlatego można je badać w prostych komórkach bakterii, a wnioski wysnute z doświadczeń mogą być prawdziwe nawet dla komórek ludzkich. W mojej pracy

naukowej komórką modelową była pałeczka okrężnicy *E. coli*. Koncentrowałem się na polimerazie IV DNA (DinB) z rodziny polimeraz Y. DinB nie posiada funkcji korektorskiej, często popełnia błędy i łatwo „odpada” od matrycy DNA. Dotychczas nie było wiadomo jaką rolę pełni ta polimeraza w replikacji chromosomalnego DNA oraz jaki jest jej wpływ na wierność replikacji, mimo że w jednej komórce *E. coli* znajduje się aż 250 jej cząsteczek.

Tajny agent

Celem mojej pracy była zatem próba ustalenia, jaki jest udział DinB w utrzymaniu wierności replikacji. Przeprowadziliśmy serię doświadczeń, w których wykorzystaliśmy wcześniej stworzony przez prof. Iwonę Fijałkowską system chromosomalny pozwalający na pomiar częstości pojawiania się błędów w czasie replikacji bakteryjnego DNA. Okazało się, że brak DinB w komórce nie zmienia częstości powstawania badanych mutacji. Może polimeraza IV DNA pełni specyficzne funkcje i jej aktywność jest pod ścisłym nadzorem nie poznanych jeszcze czynników? A może jeśli nie brak, to nadmiar białka zmienia wierność replikacji? Rzeczywiście potwierdziliśmy, że nadprodukcja DinB powoduje duży wzrost liczby mutacji. Co więcej, zastosowany unikatowy system pomiaru częstości zmian pozwolił ustalić, że polimeraza IV DNA częściej bierze udział w replikacji jednej z dwóch replikowanych nici (tzw. nici opóźnionej).

Wcześniej już postulowano, że polimeraza IV może ułatwiać wydłużanie nici, kiedy główna replikaza „ma kłopoty”, wstawia błędny nukleotyd i „odpada” od matrycy. Dla weryfikacji tej hipotezy zbadaliśmy jej udział w replikacji chromosomu, gdy główną część replikacji prowadzi upośledzona wersja głównej replikazy (polimerazy III). Zastosowaliśmy różne mutanty częściej odłączające się od matrycy DNA – takie, które robią więcej błędów w trakcie syntezy DNA (tzw. mutatory) oraz bardziej dokładne, tzw. antymutatory. W założeniu polimeraza IV DNA w tych mutantach ma łatwiejszy dostęp do końca syntetyzowanej nici. Wyniki doświadczeń potwierdzają, że DinB w komórkach z wadliwą polimerazą III DNA częściej bierze udział w replikacji DNA, prawdopodobnie ułatwiając wydłużanie syntetyzowanej nici.

Na skutek zadziałania szkodliwych dla DNA czynników powodujących u bakterii tzw. odpowiedź SOS, liczba cząsteczek polimerazy DinB w komórkach wzrasta gwałtownie do ok. 2500. Dlatego zbadaliśmy również udział polimerazy IV w warunkach indukcji SOS. Pierwsi wykazaliśmy, że wiele mutacji powstających podczas indukcji SOS w komórkach *E. coli* jest efektem aktywności tego białka i że zapewne współdziała ono wtedy z inną polimerazą (V).

Podręcznikowy, statyczny schemat replikacji DNA jest daleki od rzeczywistości. Dziś widziana jest jako dynamiczny, wielowymiarowy proces, w którym uczestniczy grupa kompleksów białkowych, precyzyjnie wykonujących swoje zadania, niczym zgrany zespół lekarzy przeprowadzających skomplikowany, wielogodzinny zabieg operacyjny. Pomyślność tego zabiegu zależy od współdziałania, koordynacji czasowej i przestrzennej oraz szybkich reakcji na zmieniający się stan pacjenta i postęp prac. Detale działania tej maszyny wciąż nie są znane, a napływające nowe dowody na niesłychane bogactwo rozwiązań stosowanych przez naturę nieustannie wprowadzają nas w zdumienie i zachwyt. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Bebenek K., Kunkel T.A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry*, 69, 137–65.
- Shcherbakova P.V., Fijałkowska I.J. (2006). Translesion synthesis DNA polymerases and control of genome stability. *Frontiers in Biosciences*, 11, 2496–517.
- Kuban W., Banach-Orłowska M., Schaaper R.M., Jonczyk P., Fijałkowska I.J. (2006). Role of DNA Polymerase IV in the *E. coli* SOS mutator activity. *Journal of Bacteriology*.

Wojciech Kuban



Fundamentalne procesy komórkowe bada się w prostych organizmach, a uzyskane wyniki mogą być prawdziwe również dla komórek człowieka. W genetycznie zmodyfikowanych bakteriach *Escherichia coli* (na zdjęciu) liczba niebieskich kropek odpowiada liczbie błędów powstałych w trakcie replikacji DNA