

P O L I M E R Y

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

Od Redakcji

Niniejszy zeszyt „Polimerów” w całości poświęciliśmy tematyce biopolimerowej, która dotychczas nie miała w naszym czasopiśmie udziału odpowiadającego jej obecnemu znaczeniu w świecie nauki. Mamy nadzieję, że ten numer przyczyni się do zmiany takiej sytuacji. Za cenną pomoc w realizacji naszego celu serdecznie dziękujemy Panu prof. dr. hab. Andrzejowi W. Lipkowskiemu z Zakładu Biotechnologii Instytutu Chemii Przemysłowej w Warszawie.

JAN CZ. DOBROWOLSKI

Instytut Chemii Przemysłowej
ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Węzły i sploty DNA

DNA KNOTS AND LINKS

Summary — A review of DNA knots and links (catenanes) is presented. Knots are interlaced cyclic structures while links are at least two cyclic structures mutually interlaced, as chain links are, which no projection on a plane without crossing points exists for. The examples of DNA knots and links, that are produced by replication and recombination processes, have been given as well as the methods of their investigations have been brought. Model research works focused on determining the probability of topological structures creations, with using molecular mechanics methods, have been discussed. An idea of ideal knots and links, allowing to find the correlations between electrophoretic mobility and sedimentation coefficient of real DNA knots and links and parameters of ideal ones, was discussed.

Key words: knots, links (catenanes), ideal knots.

Od 1830 roku, kiedy to Berzelius wprowadził pojęcie izomerii [1], poznano bardzo wiele jej typów [2—4]; jedną z najpóźniej odkrytych była izomeria topologiczna. Na początku lat 60. dokonano pierwszych syntez tego rodzaju izomerów, mianowicie katenanów (splotów),

czyli związków o dwóch lub większej liczbie składowych, połączonych ze sobą tak jak ogniwa łańcucha [5—7]. Gdy zaś pod koniec lat 60. izomerię topologiczną odkryto w związkach naturalnych — kwasach nukleinowych — nastąpiła eksplozja zainteresowania topolo-

gicznymi strukturami DNA. Pierwsze syntezy chemicznych wstęg Möbiusa opisano na początku, a węzłów — pod koniec lat 80. [8, 9]. Więcej informacji o chemicznych strukturach topologicznych można znaleźć w pracach przeglądowych odnoszących się do katenanów [10—15] oraz węzłów [16—20].

Celem tej pracy jest omówienie badań dotyczących naturalnie występujących węzłów i splotów DNA. Dlatego też pomijam tu, zasługujące na osobny przegląd, prace Seemana i wsp. [21—30], w których DNA stanowi jedynie substrat do syntezy „sztucznych” struktur topologicznych. Wybór omawianych prac jest pochodną moich zainteresowań modelowymi strukturami o nietrywialnej topologii [31—40] i z tego względu ma charakter dość subiektywny.

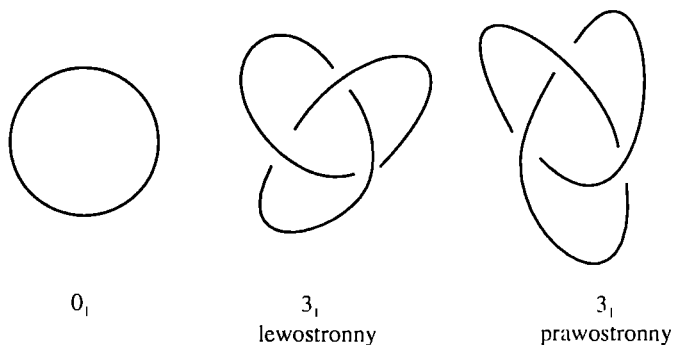
POJĘCIA PODSTAWOWE

W sensie potocznym węzłem nazywamy strukturę, która powstaje dzięki przepleceniu w różny sposób dwóch końców (np. liny [41], nici [42], krawata [43, 44] itp.), gwarantując połączenie ich w trwały w danych warunkach układ. Natomiast w sensie matematycznym węzłem nazywa się krzywą zamkniętą w przestrzeni trójwymiarowej, która nie ma punktów podwójnych. Tego typu krzywe miały w wielu kulturach znaczenie symboli mistycznych i dekoracyjnych [45, 46].

Murasugi, matematyk zajmujący się teorią węzłów (por. [78]), określa węzły jako wielokąty przeplecione w przestrzeni trójwymiarowej. Z kolei polski matematyk Przytycki (por. [50]) mówi o klasycznej teorii węzłów

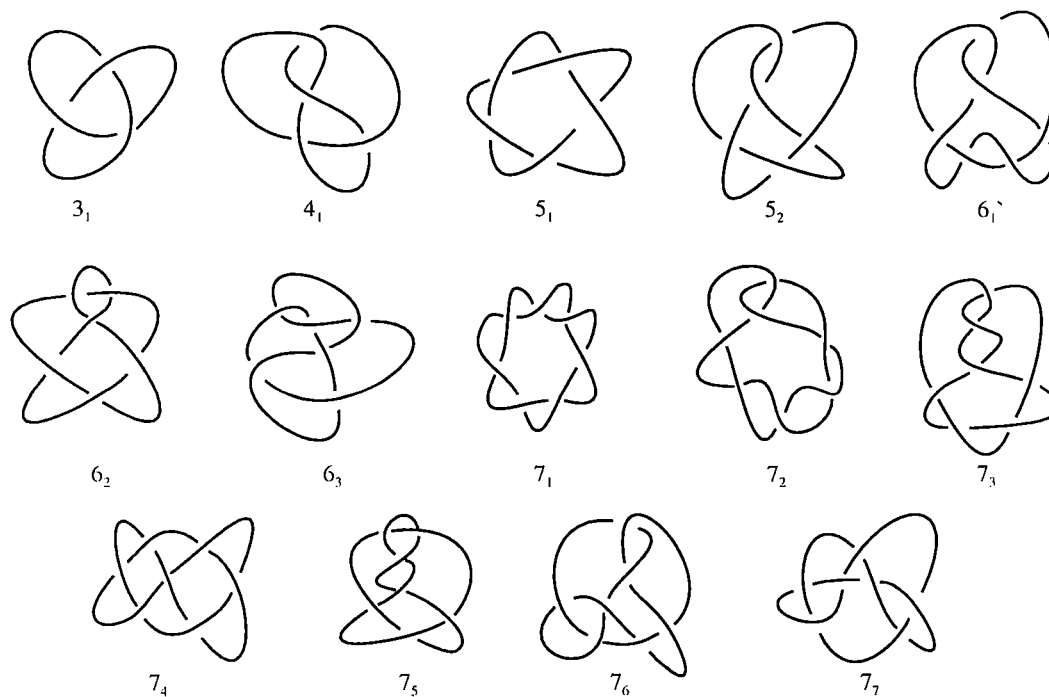
zajmującej się położeniem okręgu (węzły) lub kilku okręgów (sploty) w S^3 lub R^3 (gdzie S^3 oraz R^3 oznaczają odpowiednio powierzchnię czterowymiarowej kuli oraz trójwymiarową przestrzeń kartezjańską).

Mislow i Liang zajmowali się strukturami nazywanymi węzłami w chemii, biochemii i biologii [47]. Przyjęli oni, że „węzeł jest wielokątem lub gładką krzywą zamkniętą w przestrzeni 3-wymiarowej, która nie przecina samej siebie w żadnym punkcie, lecz która nie może być zanurzona w płaszczyźnie bez przecięć (zwanymi skrzyżowaniami)”. Słowo „zamknięta” jest konieczne, aby zdefiniować węzeł z punktu widzenia topologii, ponieważ gdy zawężona krzywa nie jest zamknięta, to wtedy w wyniku ciągłych deformacji, można ją rozplątać.



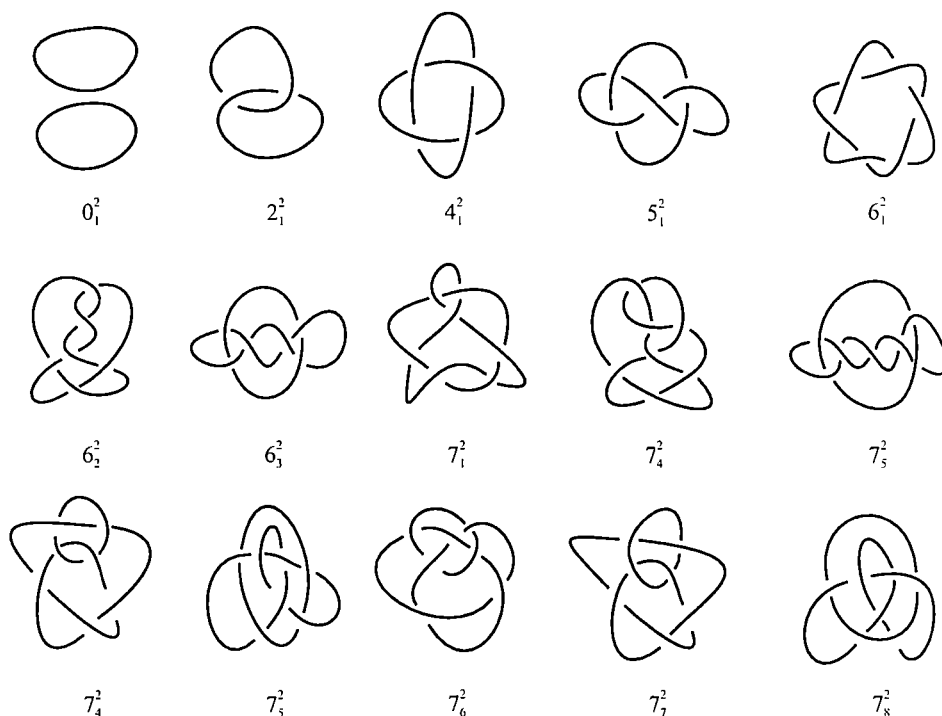
Rys. 1. Diagramy struktury cyklicznej oraz prawostronnego i lewostronnego węzła trójlistnego (3₁)

Fig. 1. Diagrams of cyclic, right-hand, and left-hand trefoil knot (3₁) structures



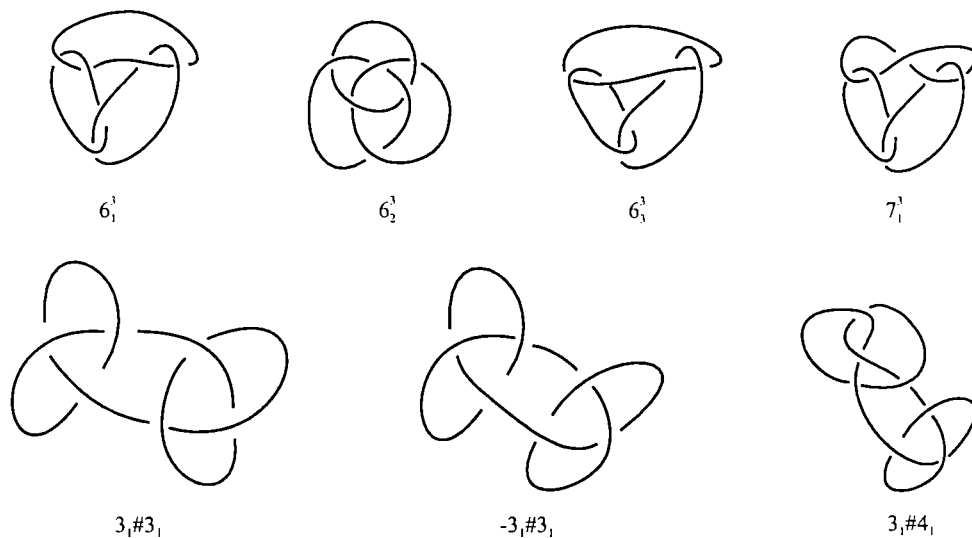
Rys. 2. Diagramy regularne węzłów pierwszych o trzech—siedmiu skrzyżowaniach; oznaczenia symboli w tekście

Fig. 2. Regular diagrams of prime knots exhibiting from three to seven crossings; symbols designations in the text



Rys. 3. Diagramy regularne splotów (katenanów) pierwszych o dwu składowych i co najwyżej siedmiu skrzyżowaniach; oznaczenia symboli w tekście

Fig. 3. Regular diagrams of two component prime links (catenanes) exhibiting not more than seven crossings; symbols designations in the text



Rys. 4. Diagramy regularne splotów (katenanów) pierwszych o trzech składowych i co najwyżej siedmiu skrzyżowaniach oraz węzłów złożonych z sześcioma i siedzioma skrzyżowaniami; oznaczenia w tekście

Fig. 4. Regular diagrams of three component prime links exhibiting not more than seven crossings and complex knots with six or seven crossings; symbols designations in the text

Walba [48] porównał izomerię topologiczną struktury cyklicznej oraz struktur typu trójlistnego węzła lewo- i prawostronnego (rys. 1), które wykazują identyczne połączenia wiązań, jednak nie dają się nałożyć na siebie w każdym punkcie w temperaturze pokojowej. Zatem, żadna „konformacyjna” zmiana lub jakakolwiek ciągła deformacja grafu wiązań nigdy nie pozwoli na wzajem-

ne przekształcenie. Takie izomery nazywamy «topologicznymi stereoizomerami» [48].

Schematycznie węzły przedstawia się w postaci tzw. diagramów regularnych [49], czyli takich rzutów struktury trójwymiarowej na płaszczyznę, w których wszystkie występujące w strukturze skrzyżowania dające się rozplątać zostały rozplątane, a w związku

z tym struktury te wykazują minimalną liczbę skrzyżowań.

W dalszej części artykułu są stosowane symbole o ogólnym wzorze N_l^k oznaczające bardziej złożone typy węzłów lub splotów, gdzie N — liczba skrzyżowań w diagramie regularnym, k — liczba składowych (pominiana w przypadku węzłów, gdyż $k = 1$), l — liczba porządkowa w tablicach węzłów i splotów. W przypadku węzłów i splotów złożonych z dwóch lub większej liczby struktur pierwszych stosuje się symbol # oznaczający sumę.

Diagramy regularne przykładowych struktur topologicznych o co najwyżej siedmiu skrzyżowaniach przedstawiają rys. 2—4 wg [49] i [50].

WĘZŁY I SPLOTY DNA

Informacje wstępne^{*)}

W 1953 roku Watson i Crick rozwiązali strukturę przestrzenną DNA na podstawie jego dyfraktogramów uzyskanych przez Franklin i Wilkinsa. Według modelu Watsona i Cricka najważniejsze cechy struktury DNA to:

— skręcanie dwu helikalnych nici polinukleotydowych wokół wspólnej osi, co prowadzi do powstania tzw. dupleksu;

— obecność zasad purynowych (adeniny i guaniny) oraz pirymidynowych (cytozyny i tyminy) wewnątrz podwójnej helisy o płaszczyznach pierścieni prostopadłych do osi helisy, a grup fosforanowych i dezoksyrybozy na zewnątrz helisy o płaszczyznach pierścieni cukrowych równoległych do osi helisy;

— średnica helisy wynosi 20,0 Å, odległość między zasadami mierzona wzdłuż osi helisy — 3,4 Å, na całkowity skręt (obrót) helisy przypada 10 nukleotydów, czyli 34 Å, a zasady są skręcone względem siebie pod kątem 36°;

— dwie skręcone helisy DNA łączą się ze sobą za pomocą dwóch wiązań wodorowych (C=O...H-N oraz N-H...N) pomiędzy adeniną i tyminą oraz trzech — pomiędzy cytozyną i guaniną;

— kolejność występowania zasad w łańcuchu nie jest ograniczona, a sekwencja ich występowania niesie informację genetyczną.

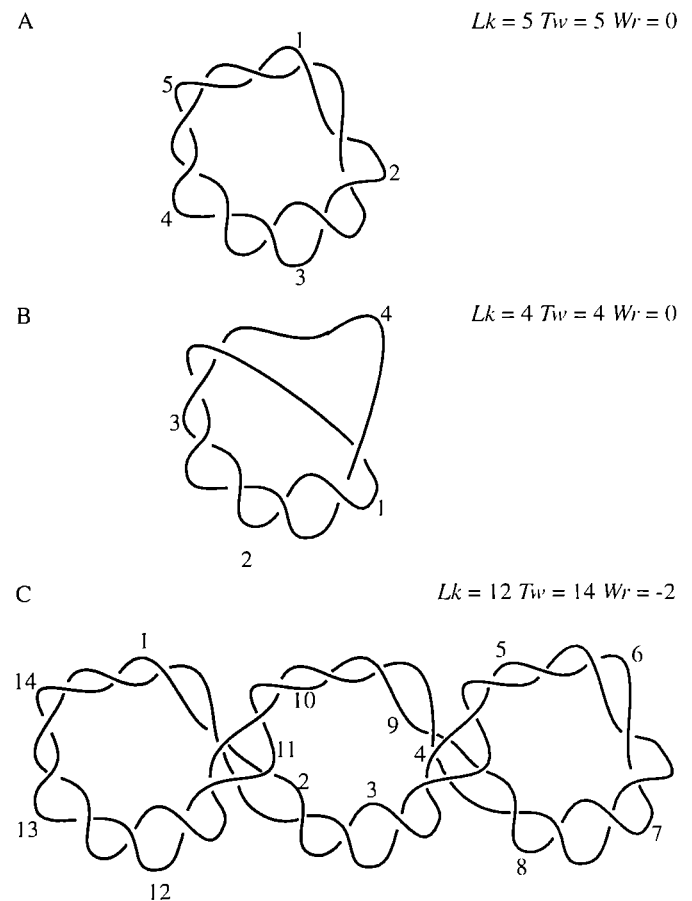
Watson i Crick postulowali, że po rozdzieleniu każda z nici stanowi matrycę służącą do powielenia w replikacji.

Długość nici DNA różnych organizmów wynosi od 5,1 tysiąca par zasad w przypadku wirusa SV40, poprzez 4 miliony par zasad w nici DNA bakterii *Eshcherichia coli*, do ok. 2,9 miliarda par zasad u człowieka. DNA może być bądź liniowy jak u faga T7 lub w jądrach komórkowych ssaków, bądź też cykliczny (kolisty) jak DNA faga λ w zainfekowanej komórce gospodarza;

może on również występować w postaci jednoniciowej, jak ma to miejsce w ciągu części cyklu życiowego wirusa ϕ X174 infekującego bakterię *Eshcherichia coli*. Także w podwyższonej temperaturze nici DNA łatwo się rozplatają, a po schłodzeniu spontanicznie reasocjują.

Początki badań topologii cyklicznego DNA

Na początku lat 60. stwierdzono [51, 52], że DNA cykliczny może występować w postaci rozluźnionej cząsteczki cyklicznej (*relaxed*) (rys. 5a), odwiniętej (częściowo) cząsteczki cyklicznej (rys. 5b) albo w postaci superhelikalnej (*supercoiled*, *superhelical*) (rys. 5c). W rozluźnionej cząsteczce cyklicznej liczba skrzyżowań nici



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie rozluźnionej (A), częściowo odwiniętej (B) i superhelikalnej (C) postaci cyklicznej DNA

Fig. 5. Schematic presentation of relaxed (A), partially unreeled (B), and superhelical (C) forms of cyclic DNA

dupleksu jest większa niż w odwiniętej cząsteczce, w której jedna z nici zostaje przecięta, częściowo odwinięta i połączona ponownie; w strukturze superhelikalnej cykliczny dupleks DNA dodatkowo zwiija się [53]. Cykliczny DNA występuje powszechnie, np. w chloroplastach roślin jako chromosomalny DNA oraz w wielu

^{*)} Por. [53].

wirusach i bakteriach. Charakteryzuje się on tym, że nici nukleotydów nie mogą się rozplątać bez przecięcia jednej z nich.

Wang i Schwartz [54] jako pierwsi (w czerwcu 1967 r.) donieśli o katenanach złożonych z dwóch składowych ([2]-katenanach, pierwszy diagram struktury 2_1^2 na rys. 3) powstałych w wyniku cyklizacji *in vitro* pojedynczych nici DNA faga 186 z DNA faga λ . Zasugerowali także, że katenany DNA mogą powstawać *in vivo* w toku replikacji cyklicznego DNA. W październiku tegoż roku Hudson i Vinograd [55] oraz Clayton i Vinograd [56] opisali sploty liczące od dwu do siedmiu cyklicznych dupleksów w mitochondrialnym DNA komórek ludzkich. Przedstawili oni fotografie splotów wykonane metodą mikrografii elektronowej, potwierdzającą istnienie nietrywialnej topologii struktur DNA. W jednym z omawianych przypadków [56], cykliczna postać stanowiła 26% DNA izolowanego z leukocytów, [2]-katenany — ok. 3%, a [3]- i wyższe katenany — ok. 2%. Mitochondrialny DNA występuje w postaci cyklicznych dupleksów u większości eukariota i zazwyczaj ma długość ok. 5 μm , a jego ciężar cząsteczkowy wynosi ok. 10^6 daltonów [55]. Do połowy lat 70. katenany DNA wykryto u większości organizmów — od wirusów poprzez bakterie zawierające plazmidy, koliste chromosomy salamander, do mitochondriów ssaków i ludzkich leukocytów [57].

Klasyfikacja i określenie topologii cyklicznego DNA jest ważne, gdyż różne procesy komórkowe generują odmienne struktury topologiczne [58]. Katenany dwóch cyklicznych dupleksów powstałe w wyniku replikacji powinny być prawostronne i równoległe. Te tworzone dzięki enzymom rekombinacji, takim jak fagowa integraza (Int), są prawostronne i antyrównoległe, natomiast sploty powstające w procesie katalizowanym przez topoizomerazę I mogą być z równym prawdopodobieństwem prawo- i lewostronne.

Cykliczny dupleks

Każdy cykliczny dupleks DNA jest sam w sobie nietrywialną strukturą topologiczną — splotem dwu tworzących go nici [57, 58]. Przekształcenia izomerów topologicznych DNA następują w procesie replikacji i rekombinacji i są katalizowane przez topoizomerazy typu 1 (np. topoizomerazę I) lub typu 2 przecinające odpowiednio jedną albo dwie nici cyklicznego dupleksu DNA [59]. W wyniku takich trzyetapowych procesów (przecięcie nici, przenoszenie segmentu DNA przez przerwę w nici oraz ponowne łączenie) zmienia się liczba skrzyżowań DNA.

Cykliczne struktury DNA określa się za pomocą trzech liczb [53], które po raz pierwszy wprowadził Fuller [60, 61]. Rozważał on strukturę DNA jako zorientowaną wstęgę homeomorficzną z $S^1 \times [-1, 1]$, której brzegi charakteryzują się liczbą przepleceń Lk (*linking*) (równą dwukrotnej liczbie skrzyżowań dwóch nici dupleksu),

liczbą skręceń Tw (*twisting*) (liczbą obrotów brzegów wstęgi wokół osi helisy) i liczbą zwojów Wr (*wirthing*) (liczbą skrzyżowań osi helisy ze sobą). Lk jest niezmiennikiem topologicznym^{*)} a Tw i Wr są niezmiennikami geometrii różniczkowej^{**)}.

Taki model DNA pozwolił na wyznaczenie następującej zależności $Lk = Tw + Wr$ [53, 61], która została wprowadzona także przez White'a [62]. W przypadku dupleksu niecyklicznego Tw może być liczbą rzeczywistą, a w przypadku dupleksu cyklicznego musi być całkowita (podobnie jak Lk i Wr) oraz zgodnie z konwencją — tak jak Lk — jest dodatnia w odniesieniu do prawoskrętnej wstęgi. Liczba przepleceń jako niezmiennik topologiczny ulega zmianie tylko po przecięciu jednej z nici DNA, zatem wszystkie ciągłe deformacje konformacji dupleksu wywierają wpływ na liczby skręceń i zwojów. Jeśli helisa leży w płaszczyźnie, na kole, lub na jakiejś achiralnej powierzchni, to $Lk - Tw = 0$, lecz gdy ulega wykręceniu i staje się chiralną (tak jak np. w układzie superhelikalnym), wtedy $Lk - Tw \neq 0$. Co więcej, gdy DNA jest nawinięty na białko enzymu można wprowadzić wywodzące się z geometrii różniczkowej i topologii dodatkowe niezmienniki, które dokładniej opisują taką sytuację [63].

Jeśli nacięty cykliczny dupleks DNA (*nicked circular DNA duplex* — cykliczny dupleks z przeciętą jedną nicią DNA) potraktuje się ligazą (enzym łączący końce naciętej nici DNA) powstaje niehomogeniczny roztwór, z którego można wydzielić metodą elektroforezy wiele izomerycznych struktur [64, 65]. Gdy założy się, że nacięty cykliczny dupleks ma naturalną liczbę opleceń $Lk_0 = N/10,5$ (N jest tu liczbą par zasad w dupleksie, a 10,5 odpowiada typowej liczbie par na jeden całkowity skręt helisy), to stężenie izomerów o liczbie opleceń $Lk = Lk_0; Lk_0 \pm 1; Lk_0 \pm 2; Lk_0 \pm 3 \dots$ dupleksu powstałego po działaniu ligazy wynika z rozkładu Boltzmanna (zależnego od długości DNA i temperatury) [64—67].

Liczbę skrzyżowań cyklicznego dupleksu można kontrolować. Wiadomo, że bromek etydyny interkaluje pomiędzy nici DNA, powodując odwinięcie nici dupleksu (naciętego za pomocą DNAazy) pod kątem ok. 26° . Zatem na każde 14 par zasad cyklicznego dupleksu związanych bromkiem etydyny liczba skrzyżowań zmniejsza się o jeden. Po łączącym działaniu ligazy bromek etydyny zostaje usunięty. W ten sposób grupa Cozzarelliego [68] otrzymała 25 izomerów cyklicznego dupleksu złożonego z 1683 par zasad oznaczonego symbolem pAO3. Izomery miały $160 \pm 0; \pm 1; \pm 2; \pm 3; \dots; \pm 12$ peł-

^{*)} Niezmiennik — cecha nieulegająca zmianie w przekształceniach (np. długość odcinków lub pole figur w izometriach); niezmiennik topologiczny nie zmienia się w homeomorfizmach — wzajemnie jednoznacznych przekształceniach ciągłych, w przypadku których istnieją ciągłe przekształcenia odwrotne.

^{**)} Niezmiennik geometrii różniczkowej nie zmienia się w dyfcomorfizmach — wzajemnie jednoznacznych przekształceniach klasy C^n (mających ciągłe n -te pochodne), które mają wzajemnie jednoznaczne przekształcenia odwrotne klasy C^n .

nych skręceń (320 ± 0 ; ± 2 ; ± 4 ; ± 6 ;... ; ± 24 skrzyżowań) i wszystkie zostały rozdzielone. W tej samej pracy podano również model działania topoiizomerazy I w kierunku tworzenia katenanów dwóch cyklicznych dupleksów, a także relaksacji ujemnie skręconego układu superhelisy. Ponadto porównano dwa modele rekombinacji (zapropozowane w [68] i [69]) prowadzącej do katenanu DNA.

Węzły i sploty cyklicznych dupleksów

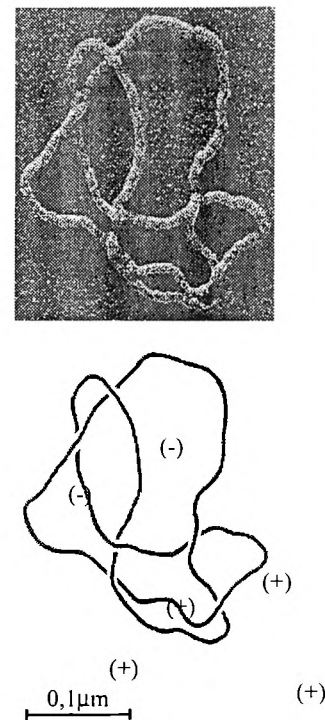
Synteza węzłów i splotów dupleksów DNA *in vitro* jest możliwa m.in. dzięki integrującej rekombinacji (*integrative recombination*) superhelikalnego DNA w miejscu przyłączenia fagów λ [69–74]. Mizuuchi i wspópr. [70] otrzymali w ten sposób 2_1^2 i 4_1^2 katenany DNA z plazmidu pBP86 oraz węzły 3_1 i 5_1 DNA z plazmidu pBP90, a następnie za pomocą gyrazy DNA z *Escherichia coli* rozpletli oba typy topologicznych struktur DNA. Gyraza jest enzymem, który bez obecności ATP (adenozyno trójfosforan) zmienia ujemny skręt superhelisy na dodatni, zmienia liczbę *Lk* o dwa [71], umożliwia też przecięcie cyklicznego dupleksu DNA i przejście przez wytworzoną chwilową przerwę podwójnej nici drugiego cyklicznego dupleksu DNA, pozwalając w ten sposób na tworzenie katenanów z rozłączonych cząsteczek cyklicznych albo na proces odwrotny [71]. Kreuzer i Cozzarelli [71] badając działanie gyrazy stwierdzili powstawanie [2]-, [3]- i [4]- katenanów DNA. Mechanizm działania gyrazy w procesie zarówno skręcania (*super-twisting*) i rozluźniania (*relaxation*) superhelisy, jak i katenacji oraz dekatencji może być taki sam [71, 75]. Gyraza najpierw wiąże segmenty DNA tak, aby przecinały się, stabilizując dodatni skręt superhelisy (inne skręty cyklicznej superhelisy są ujemne), a następnie powoduje przecięcie obu nici jednego z segmentów i przeprowadza drugi dupleks przez tę przerwę, zmieniając dodatni skręt w ujemny [75].

O ile działanie gyrazy prowadzi do powstania wielu różnych katenanów cyklicznych dupleksów DNA, to działanie rekombinazy, zwanej rezolwazą **Tn3**, w 99% powoduje powstanie najprostszego katenanu 2_1^2 , a tylko w 1% katenanów o większej liczbie skrzyżowań [74]. Rezolwaza **Tn3** rozpoznaje dokładnie sekwencję nukleotydów powtarzającą się równolegle na dwóch niciach dupleksu — miejsce rekombinacji *res* [74].

Rezolwaza **Tn3**, tak jak topoiizomeraza I, za jednym razem przecina tylko jedną nić dupleksu DNA. Topoiizomeraza I z równym prawdopodobieństwem katalizuje jednak powstanie prawo- i lewostronnych węzłów trójlistnych 3_1 , natomiast rezolwaza **Tn3**, która wiąże się w specyficznym miejscu dupleksu (jest miejscowo specyficzna, *site specific*), generuje powstanie tylko jednego stereoisomeru [76, 77]. W ramach 1% powstałych innych produktów [74], rezolwaza **Tn3** katalizuje tworzenie się prawostronnego splotu typu 5_1^2 (splotu ósemkowego) [76].

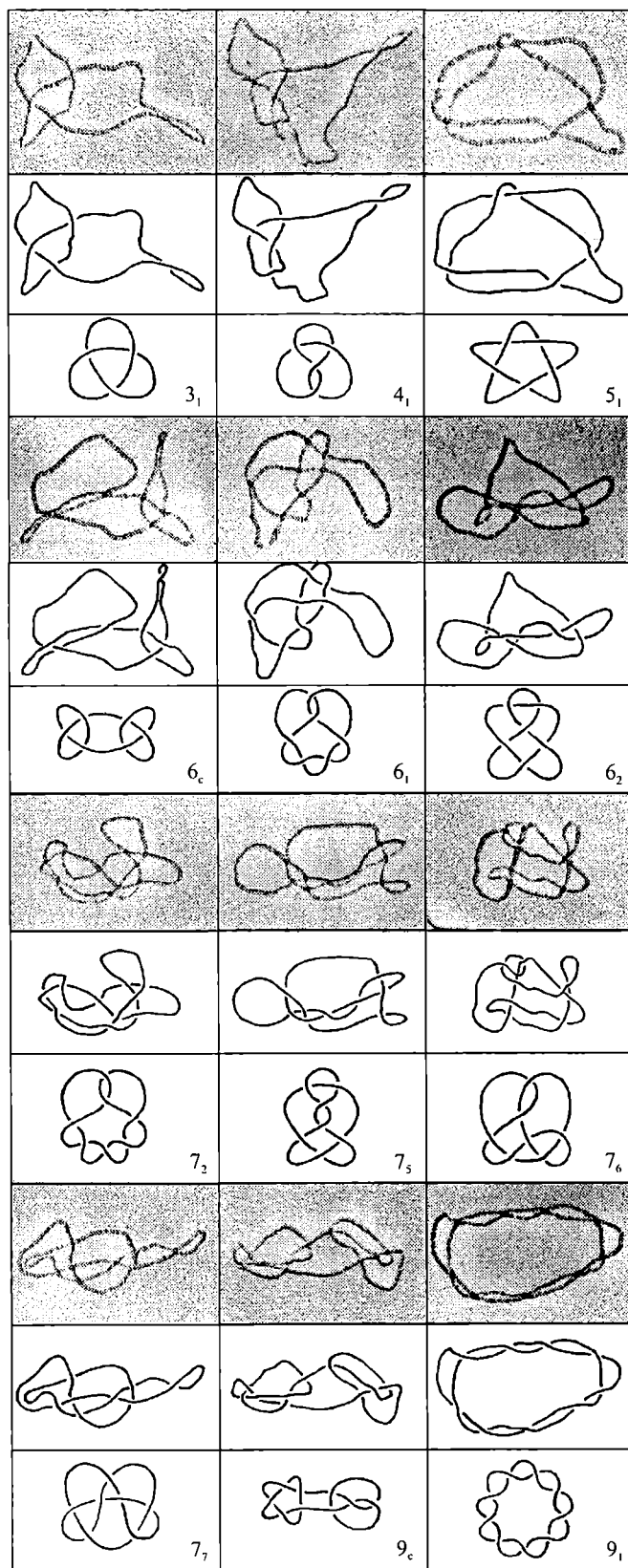
O ile w przypadku cząsteczek dowód ich nietrywialnej topologii jest trudny, to w odniesieniu do cząsteczek cyklicznego DNA udowodnienie ich nietrywialnej topologii nie stwarza żadnych trudności. Dzięki pokryciu DNA białkiem RecA z *Escherichia coli* zwiększającym grubość nici dupleksu do ok. 100 Å, topologię DNA można prześledzić na mikrografiach o dużej rozdzielczości [76, 77].

Kolejne rekombinacje powstałych węzłów lub splotów katalizowane rezolwazą **Tn3** prowadzą w sposób bardzo selektywny do węzłów lub splotów o większej liczbie skrzyżowań [78]. Na przykład, spośród sześciu możliwych stereoisomerów trzech węzłów pierwszych i trzech stereoisomerów węzłów złożonych (jednego stereoisomeru węzła płaskiego: $3_1 \# -3_1$, i dwóch typów węzła babskiego: $3_1 \# 3_1$ i $-3_1 \# -3_1$) powstaje tylko jeden stereoisomer 6_2 [78] (rys. 6). W istocie można było zidentyfikować jeszcze inny produkt o sześciu skrzyżowaniach: splot złożony z niezawęzłonej struktury cyklicznej i węzła 4_1 (zwanego węzłem ósemkowym) [78].



Rys. 6. Mikrografia elektronowa i schemat wydzielonego elektroforetycznie węzła DNA o sześciu przecięciach, powstałego w wyniku działania rezolwazy **Tn3** [78]. Reprodukacja za zgodą American Association for the Advancement of Science
Fig. 6. Electron micrograph and a scheme of electrophoretically isolated DNA knot, with six crossings, formed by resolvase **Tn3** action [78]. Reproduced with permission of American Association for the Advancement of Science

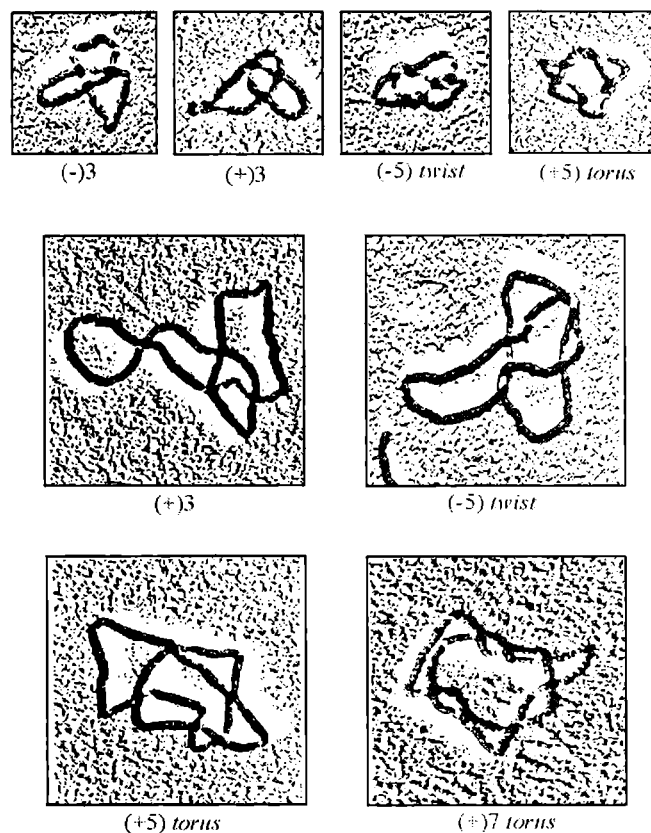
W wyniku oddziaływania topoiizomerazy I na nacięty duplex DNA powstaje większość z możliwych



Rys. 7. Mikrografie elektronowe i schematy wydzielonych elektroforetycznie węzłów DNA powstałych w wyniku działania topoisomerazy [79]. Reprodukacja za zgodą The American Society for Biochemistry and Molecular Biology
 Fig. 7. Electron micrographs and schemes of electrophoretically isolated DNA knots formed by topoisomerase action [79]. Reproduced with permission of The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

węzłów o danej liczbie skrzyżowań [79]. Dean i współpr. [78] zaobserwowali tu następujące węzły: 3_1 , 4_1 , 5_1 , 6_1 , 6_2 , płaski $6_c = 3_1 \# -3_1$, 7_2 , 7_5 , 7_6 , 7_7 , $9_c = 5_1 \# 4_1$ i 9_1 . Świadczy to o tym, że enzym ten działa niespecyficznie [79], niezależnie od orientacji pary nici DNA, pozwala bowiem na ich przejście przez chwilowo utworzoną przerwę jednej nici innego segmentu dupletu DNA. Istotne jest to, że nacięcie dupletu powoduje efektywne przyłączenie topoisomerazy I na nienaciętej nici w miejscu przeciwnie usytuowanym w stosunku do nacięcia. W rezultacie działania topoisomerazy I, znak skrzyżowania zostaje zmieniony na przeciwny [80], przy czym dotyczy to zarówno ujemnego, jak i dodatniego skrzyżowania superhelisy [79].

Dzięki temu, że topoisomeraza I powoduje powstanie tak wielu różnych typów węzłów (od trzech do dziesięciu skrzyżowań, rys. 7) dostrzeżono wzajemną zależność ruchliwości elektroforetycznej i liczby skrzyżowań topologicznych struktur DNA [79]. Okazało się, że większość węzłów w każdym paśmie elektroforetycznym ma taką samą liczbę skrzyżowań, a liczba skrzyżowań DNA sąsiednich pasm różni się o jeden. Co więcej,



Rys. 8. Mikrografie elektronowe wydzielonych elektroforetycznie węzłów DNA (torusowych i skręconych) powstałych w wyniku działania rekombinazy Gin I [81]. Reprodukacja za zgodą Academic Press Ltd.
 Fig. 8. Electron micrographs of electrophoretically isolated (torus and twisted) DNA knots formed by recombinase GIN I action [81]. Reproduced with permission of Academic Press Ltd.

wysokorozdzielcze żełe pozwalają na rozdzielanie węzłów torusowych K_{pq} od nietorusowych węzłów skręconych (*twist knots*) [81] (rys. 8).

Dobrym przykładem elektroforetycznej analizy struktur topologicznych DNA jest rozdział węzłów i splotów powstających po działaniu integrazy w integrującej rekombinacji rozpoznającej miejsce działania — rekombinacja specyficzna miejscowo (*site specific recombination*) [82]. W procesie tym powstają prawostronne węzły torusowe ($3_1, 5_1, 7_1, \dots, 23_1$) i prawostronne sploty torusowe ($4_2^2, 6_1^2, 8_1^2, 10_1^2, \dots, 20_1^2$), które elektroforetycznie migrują proporcjonalnie do liczby skrzyżowań [82]. Węzły DNA ($3_1, 4_1, 5_2, 6_1, 6_2$) powstałe *in vivo* z częściowo replikowanych plazmidów są także izolowane elektroforetycznie, a analiza ich topologii na podstawie mikrografii pozwala na głęboki wgląd w mechanizmy działania enzymów procesów komórkowych [83].

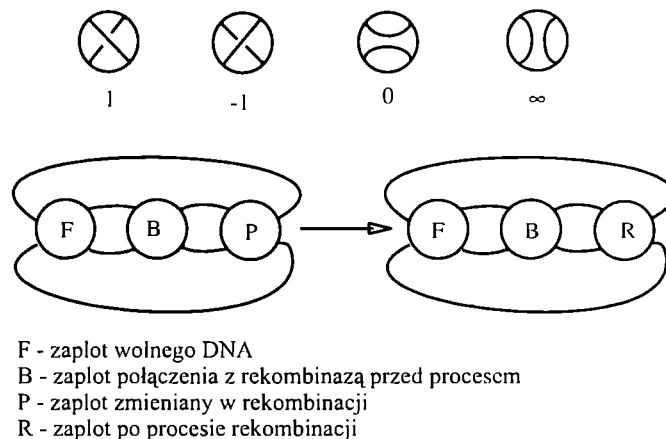
Prawdopodobnie najbardziej uderzającym przykładem katenacji jest DNA kinetoplastów mitochondriów pewnych jednokomórkowych wiciowców — pasożytów z rzędu *Kinetoplastida* obejmującego gatunki: *Carithidia*, *Leishmania*, *Trypanosoma* i *Endotrypanum*, które powodują leiszmaniozę, afrykańską śpiączkę i chorobę Chagas [84]. Kinetoplast jest siecią tysięcy splecionych cykli DNA [85–92]. W splocie DNA kinetoplastów występują cykliczne DNA o dwóch zakresach wymiarów, nazywane maksycyklami i minicyklami (*maxicircles* oraz *minicircles*). Maksycykli jest kilkadziesiąt i są złożone z ok. 20 000 par zasad, a minicykle są liczone w tysiącach i złożone z ok. 1000 par zasad [85, 86, 91]. Maksycykli DNA świdorowców *Trypanosoma equiperdum* tworzą same ze sobą splot (do 45 składowych) kształtu rozety, a cała sieć ma niezwykle topologiczną złożoność, którą tworzy splot wielu wzajemnie różnych katenanów [88].

W przypadku kinetoplastów świdorowca *Carithida fasciculata*, składających się z ok. 25 maksycykli zawierających 37 000 par zasad i ok. 5000 minicykli złożonych z 2500 par zasad mających w 90% tę samą sekwencję, stworzono model struktury oparty na teorii grafów [88]. Splot DNA kinetoplastu jest tak zwarty, że zdjęcia wykonane metodą mikroskopii elektronowej nie pozwalają na rozpoznanie typu skrzyżowań poszczególnych ogniw [89]. Wiadomo jednak, że minicykle nie występują w postaci superhelikalnej i każde dwa są powiązane ze sobą najprostszym splotem Hopfa 2_1^2 [90].

Splot całej dwuwymiarowej struktury minicykli poddano częściowemu enzymatycznemu trawieniu. W wyniku tego otrzymano różne rodzaje $[N \leq 5]$ -katenanów, których topologię można było zinterpretować metodą mikroskopii elektronowej. Następnie strukturę różnych oligomerów minicykli analizowano metodami teorii grafów. Ustalono, że w dwuwymiarowej sieci minicykli jeden minicykl niereplikującego *Carithida fasciculata* spleta się średnio z trzema innymi minicyklami tak, że

każdy minicykl może być umieszczony w wierzchołku sześciokąta [89]. Ostatecznie otrzymano model splecionych minicykli DNA w postaci zwartej „kolczugi”, który wyjaśnia dlaczego 5000 splecionych minicykli nie napręża poszczególnych składowych i łatwo rozpościera się na płaszczyźnie [89]. W toku replikacji minicykle są najpierw odłączane z centralnej części „kolczugi”, potem replikowane w jednym z końców kinetoplastu, a następnie utworzone potomne minicykle są włączane na brzegu „kolczugi” [92]. W ten sposób z sieci 5000 minicykli powstaje struktura 10 000 minicykli, w której prawdopodobnie każdy minicykl łączy się z sześcioma innymi minicyklami i która jest następnie rozdzielana na dwa potomne kinetoplasty [92].

Analiza zmian topologii cyklicznego DNA w postaci węzłów i splotów jest bardzo ważna nie tylko z punktu widzenia identyfikacji różnorodnych struktur DNA, lecz także rozpoznawania mechanizmów działania enzymów. Do tego celu wykorzystuje się metody wywodzące się wprost z topologii, np. model działania rezolwazy Tn3 przedstawiono jako dodawanie (2,2)-zaplotów [lub (2,2)-supłów [50], ang. (2,2)-tangle]: zaplotu substratu, zaplotu powodowanego przyłączeniem enzymu przed reakcją i jednego lub kilku zaplotów utworzonych w wyniku jednokrotnego lub wielokrotnego działania enzymu (rys. 9) [93–95].



Rys. 9. Przykład analizy enzymatycznej transformacji węzła DNA metodą zaplotów (ang. tangles)

Fig. 9. An example of tangles method analysis of DNA knot transformed enzymatically

Dodawanie (2,2)-zaplotów było też podstawą analizy działania integrazy Int faga λ oraz dwóch innych enzymów z rodziny integraz: rekombinazy Cre faga P1 oraz rekombinazy Flp drożdży [96]. Na podstawie topologii doświadczalnie izolowanych węzłów i splotów oraz analizy wielu potencjalnie możliwych (2,2)-zaplotów ustalono, że integrazy działają stereospecyficznie, a działanie nawet na napięty substrat prowadzi do powstania

⁷ Węzły torusowe są homeomorficzne z węzłami opisanymi za pomocą parametrów $x = c \cdot \cos(p \cdot \varphi)$; $y = c \cdot \sin(p \cdot \varphi)$; $z = c \cdot \sin(q \cdot \varphi)$.

tylko jednego enancjomeru [96]. Wyjaśniono także dlaczego chiralna reakcja może prowadzić do zmiany liczby przepleceń ΔLk o ± 2 [96].

Również mniej rygorystyczna analiza zmian topologii cyklicznego DNA pod wpływem enzymu pozwala na wyciąganie istotnych wniosków o mechanizmach reakcji enzymatycznych. Pokazano, że integraza *Int* faga λ w reakcji rekombinacji Xer, może katalizować międzycząsteczkową rekombinację jedynie wtedy, gdy sekwencje miejsc rekombinacji ułożone antyrównolegle (a nie równolegle jak w przypadku *T3n*) znajdują się na dwóch składowych splotu torusowego [97]. W rekombinacji Xer z [2]-splotów o $n = 4, 6, 8$ i 10 skrzyżowaniach powstają sploty o $n + 1$ skrzyżowaniach [97].

Prawdopodobieństwo powstania struktur topologicznych DNA

Wraz ze wzrostem liczby rozpoznanych nietrywialnych topologicznych struktur DNA pojawiło się pytanie o prawdopodobieństwo tworzenia takich struktur. W 1992 r. Vologodskii i współpr. [98] wykazali, że metodą symulacji Monte Carlo uzyskuje się wiarygodną postać cyklicznego DNA w układzie superhelisy (por. też prace przeglądowe [99, 100]). Ustalili oni, że w warunkach małej gęstości superhelisy σ ($\sigma = \Delta Lk/Lk_0$ — miara zwinięcia superhelisy niezależna od długości DNA, gdzie Lk_0 i $Lk_0 - \Delta Lk$ są liczbami przepleceń wyjściowego i częściowo odwiniętego cyklicznego DNA) wkład czynnika entropowego do wolnej energii Gibbsa postaci superhelikalnej jest zaniedbywalnie mały w porównaniu z udziałem czynnika entalpowego, podczas gdy w warunkach dużej wartości σ czynniki entropowy i entalpowy są porównywalne. Przechodzenie superhelisy DNA w układ węzła trójlistnego 3_1 obserwowano w symulacjach powstawania superhelisy metodą dynamiki molekularnej [101].

W 1993 r. prawdopodobieństwo powstawania węzłów DNA wyznaczyli Rybenkov, Cozzarelli i Vologodskii [102] metodą Metropolis Monte Carlo (MMC) i porównali je ze stężeniami węzłów złożonych z ok. 10 000 par zasad powstających w cyklizacji DNA faga P4. Okazało się, że końcowe stężenie węzłów rosło ze stężeniem jonów Na^+ i nie zależało ani od stężenia jonów Li^+ , K^+ lub Cs^+ , ani od temperatury w zakresie 4–50°C. Podobne wyniki częstości powstawania węzłów podczas cyklizacji liniowego dupleksu DNA złożonego z ok. 5600 i 8600 par zasad, w obecności NaCl i MgCl_2 , uzyskali Shaw i Wang [103].

DNA w roztworze jest otoczone jednoimiennymi jonami, które odpychając się wzajemnie zwiększają efektywną średnicę DNA; odpychanie to jest ekranowane. Ze wzrostem mocy jonowej roztworu maleje efektywna średnica DNA i wzrasta prawdopodobieństwo utworzenia węzła. W symulacjach komputerowych generowano cykliczne struktury DNA i porównywano udział frakcji węzłów danego typu w ogólnej liczbie struktur cyklicz-

nych [102]. Zaobserwowano, że prawdopodobieństwo powstania węzłów rośnie liniowo z długością DNA, a maleje ze wzrostem stosunku grubości do długości segmentów składowych, z których zbudowany był model DNA [102].

Wpływ solwatacji na zachowanie węzłów DNA również modelowano metodą Monte Carlo z założeniem, że struktura węzła polimerowego ma postać zamkniętej łańcuchowej w kubicznej sieci oraz z przyjęciem określonego potencjału oddziaływania monomerów, którego parametry symulowały różne właściwości elektryczne otoczenia [104]. Wykazano, że prawdopodobieństwo utworzenia węzła z trzema przecięciami jest większe niż utworzenia węzła z pięcioma przecięciami, a to ostatnie z kolei jest większe od prawdopodobieństwa powstania węzła z więcej niż siedmioma przecięciami. Ponadto, prawdopodobieństwo utworzenia węzła DNA zwiększa się z długością łańcucha polimeru oraz ze wzrostem właściwości elektrolitycznych rozpuszczalnika i temperatury [104].

Porównano także określony doświadczalnie rozkład stężeń katenanów DNA z prawdopodobieństwem ich powstawania uzyskany metodą Monte Carlo [105]. Wyznaczano przy tym frakcję katenanów różnych typów zsyntetyzowanych na drodze cyklizacji liniowego DNA faga P4 w obecności nadmiaru cyklicznego DNA pAB4. Symulacje Monte Carlo prowadzono z założeniem, że istnieje nadmiar cyklicznego DNA i katenacja dwóch łańcuchów nie jest możliwa, oraz że można zignorować powstawanie $\{n>2\}$ -katenanów. Okazało się, że prawdopodobieństwo katenacji (liniowego DNA z DNA superhelisy, a także dwu superhelis DNA) maleje niemal wykładniczo z gęstością superhelisy σ . Otrzymano też doskonałą zgodność przewidywań teoretycznych z wynikami doświadczalnymi uwzględniającymi zależność prawdopodobieństwa powstawania katenanu od stężenia jonów Na^+ , Mg^{2+} i spermidyny³⁺. Zaobserwowano, że prawdopodobieństwo katenacji maleje ze spadkiem stężenia kationów — z jednej strony rośnie efektywna średnica superhelisy, lecz z drugiej strony rośnie także odległość pomiędzy końcami liniowego DNA. W rezultacie maleje możliwość spotkania zespalających się (lepkich) końców (*cohesive end*) liniowego DNA i prawdopodobieństwo utworzenia splotu. Ponadto, dzięki modelowaniu stwierdzono, że prawdopodobieństwo katenacji zależy nie od liczby zwojów superhelisy, a raczej od jej właściwości lokalnych.

Kształt składowych splotu w mikrograficznych konturach torusowych katenanów DNA (liczba skrzyżowań do 18) nieznacznie zależy od liczby skrzyżowań, natomiast odległość środków ciężkości mas składowych splotu maleje monotonicznie ze wzrostem tej liczby [106]. Doświadczalne funkcje rozkładu odległości rztów środków mas składowych [2]-katenanów [105] były następnie odtworzone teoretycznie [107]. Symulacja splotów DNA metodą MMC udowodniła [108], że uśredniona liczba zwojów $\langle Wr \rangle$ oraz doświadczalna in-

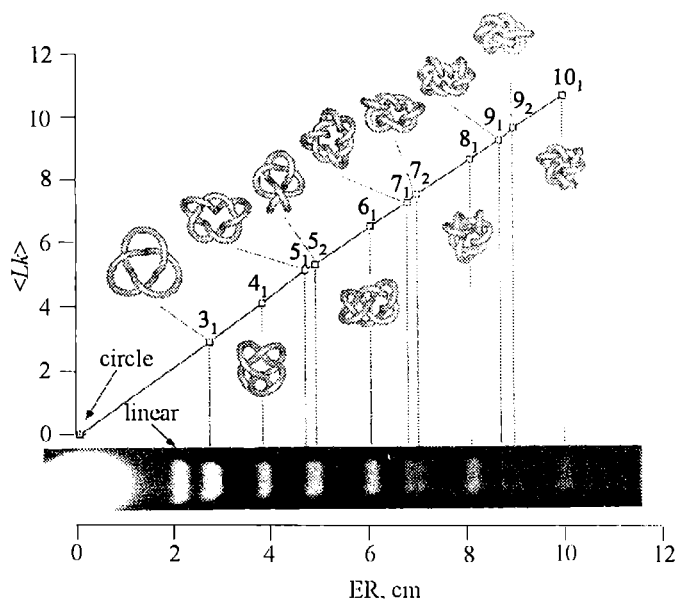
dukowana wartość ΔLk (różnica Lk splotu DNA przed i po częściowym rozpleceniu i ponownym połączeniu nici) zależą liniowo od liczby Lk [109]. Wykazano także, że w przypadku ustalonej długości 3500 par zasad symetrycznych katenanów DNA rozkład średniej liczby zwojów $\langle Wr \rangle$ zależy od Lk ; np. gdy $Lk = 1$ maksimum przypada na $\langle Wr \rangle 0$, a gdy $Lk = 29$ to na $\langle Wr \rangle 10,5$.

Znajomość wartości i znaku ΔLk okazała się przydatnym narzędziem analizy wzajemnych zależności liczb Lk , Wr i Tw superhelisy [110]. Prawostronny (lewostronny) splot DNA ma też prawoskrętny (leuoskrętny) zwój superhelikalny. Jeśli nici składowych katenanu zostaną rozplecione, złączone ponownie i jedna ze składowych zlinearyzowana, to pozostaną superzwoje właściwe dla katenanu, a chiralność splotu będzie widoczna w różnicy ΔLk [110]. Liniowa zależność ΔLk od średniej liczby przepleceń $\langle Lk \rangle$ wskazuje na to, że helisa odkręca się o ok. 2/3 na jeden zwój superhelisy, czyli skręt helisy wzrasta o 0,1 na każde pięć przepleceń katenanu (przyjmuje się, że w przypadku liniowego DNA przypada 10,5 par zasad na jeden obrót helisy) [110].

Koncepcja węzłów i splotów idealnych

Topologię DNA można obserwować metodami mikroskopii elektronowej, jest to jednak metoda droga i wciąż trudno dostępna w laboratoriach biochemicznych. Dlatego też wiele wysiłku włożono w elektroforetyczną charakterystykę topologii DNA. Elektroforetyczna migracja i współczynnik sedymentacji węzłów oraz splotów DNA zostały skorelowane z parametrami opisującymi tzw. węzły i sploty idealne nawiązujące do koncepcji idealnych figur platońskich [111–116] (rys. 10). Charakterystykę geometryczną węzłów fizycznych zastępuje się obrazami torusa w R^3 . Pojęciem węzła idealnego określa się węzeł o najmniejszym stosunku objętości do powierzchni [112], lub inaczej — najkrótszą zawężoną zamkniętą tubę stałej grubości [113]. Wtedy stosunek długości węzła do grubości tuby jest wielkością stałą, niezależną od rzeczywistych wymiarów fizycznego węzła. W przypadku węzła 3_1 stosunek ten wynosi 16,33, a węzła 7_7 ok. dwa razy więcej, czyli 32,76 [116]. Stosunek długości do grubości tuby jest też nazywany względną długością węzła idealnego [113], a w późniejszych pracach także energią grubości węzła (*thickness energy of the knot*) [114]. Identyczny parametr został równocześnie wprowadzony przy okazji rozszerzenia opisu zachowania polimerów liniowych do takiego, który uwzględnia także zachowanie polimerów zawężonych [117].

Węzły idealne mogą być interpretowane jako figury powstałe dzięki uśrednieniu po czasie trajektorii węzłów DNA wykonujących ruchy stochastyczne [113]. Idealne węzły modelowano za pomocą metody MMC [108] stosowanej do modelowania liniowego DNA. Budowano je ze 160 segmentów równej długości i „zamykano” w wirtualnej, nieprzenikalnej tubie stałej grubo-



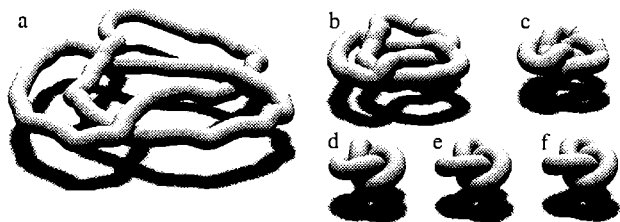
Rys. 10. Korelacja elektroforetycznej ruchliwości (ER) węzłów DNA ze średnią liczbą skrzyżowań węzłów idealnych ($\langle Lk \rangle$) w żelu agarowym [116]. Reprodukacja za zgodą World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Fig. 10. Correlation of electrophoretic mobility of DNA knots in agar gel with averaged crossings number of ideal knots ($\langle Lk \rangle$) [116]. Reproduced with permission of World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

ci. Następnie grubość tuby zwiększano jednorodnie do pierwszego kontaktu ze ścianą jakiegokolwiek innego ramienia węzła (tuby). Nową konfigurację węzła otrzymywano poprzez stochastyczne wstrząsy segmentów składowych węzła aż do chwili osiągnięcia maksymalnej grubości tuby [111–114]. Dotychczas nie znaleziono geometrycznych wzorów określających węzły idealne, chociaż znane są warunki konieczne, jakie musi spełniać ta klasa obiektów [118], a numeryczne znalezienie optymalnego kształtu [119], nawet najprostszego węzła trójlistnego, jest nadal zadaniem bardzo złożonym [120]. Rysunek 11 przedstawia uzyskaną dzięki zastosowaniu algorytmu SONO Pierańskiego ewolucję węzła trójlistnego, aż do osiągnięcia konfiguracji idealnej [116, 119].

Aby scharakteryzować idealne węzły, wprowadzono pojęcia uśrednionej liczby zwojów ($\langle Wr \rangle$) i uśrednionej liczby skrzyżowań ($\langle Lk \rangle$), gdzie liczby skrzyżowań idealnego węzła uśrednia się po wszystkich projekcjach sfery na płaszczyznę. W przypadku liczby $\langle Wr \rangle$ uwzględnia się znaki + oraz -, a w przypadku $\langle Lk \rangle$ uwzględnia się tylko znak + [112]; liczby te nie są całkowite.

Liczba $\langle Wr \rangle$ wskazuje o ile więcej jest średnio zwojów w jedną ze stron: prawą czy lewą [113]. W przypadku węzłów achiralnych (4_1 , 6_3 , 8_{13} , płaski $3_1\#-3_1$, $4_1\#4_1$) liczba $\langle Wr \rangle$ okazała się bliska lub równa zero, natomiast w odniesieniu do rodzin węzłów torusowych (3_1 , 5_1 , 7_1 ,...), skręconych z parzystą (4_1 , 6_1 , 8_1 ,...) lub z nieparzystą (5_2 , 7_2 , 9_2 ,...) liczbą skrzyżowań wykazywała ona



Rys. 11. Uzyskana dzięki zastosowaniu algorytmu SONO Pierańskiego ewolucja węzła trójlistnego aż do osiągnięcia konfiguracji idealnej [116, 119]. Rys. 11 publikowany za zgodą prof. P. Pierańskiego, jest identyczny z tym, który można znaleźć na stronie internetowej <http://fizyka.phys.put.poznan.pl/~pierański/IdealKnots.html>.

Fig. 11. Evolution of a trefoil knot towards its ideal configuration obtained by using Pierański's SONO algorithm [116, 119]. The figure is identical with that at the prof. Pierański's internet site (<http://fizyka.phys.put.poznan.pl/~pierański/IdealKnots.html>). Reproduced with permission of prof. P. Pierański

liniową zmienność z topologiczną liczbą skrzyżowań. Średnie liczby zwojów są statystycznie identyczne w przypadku konfiguracji równowagowych węzłów DNA składających się z 1800 i 5400 par zasad modelowanych metodą MMC [112, 113]. Idealne węzły złożone charakteryzują się liczbą $\langle Wr \rangle$ równą sumie liczb $\langle Wr \rangle$ węzłów składowych [113], aczkolwiek, ogólnie biorąc, liczba zwojów nie powinna być addytywna [61, 113]. Wykazano [114], że istnieje zależność pomiędzy przewidywaną uśrednioną liczbą zwojów idealnego węzła (PWr), doskonale korelującą z $\langle Wr \rangle$, a niezmiennikami topologicznymi węzłów topologicznych, mianowicie $PWr = w + 3/7(w_x - w_y) = 10/7Aw_x + 4/7Aw_y$, gdzie w — suma skrzyżowań wziętych ze znakiem + albo - (liczba Taita lub *topological writhe* [95, 114]), w_x — liczba prowadząca do przekształcenia węzła w cykl [nullifying (smoothing) writhe], $w_y = w - w_x$ — liczba pozostałych zwojów (*remaining writhe*). Czynniki 3/7 był najpierw odgadnięty z procedur statystycznych, a potem wyprowadzony z równań zakładających równość PWr różnych węzłów topologicznych (których wartości $\langle Wr \rangle$ były bliskie sobie) [114]. Zależność pomiędzy PWr , w_x oraz w_y wskazuje także, że PWr musi zmieniać się kwantowo o czynnik 2/7.

Liczba $\langle Lk \rangle$, nieujemna i zawsze większa od uśrednionej liczby zwojów, koreluje liniowo ze stosunkiem długości do grubości węzła idealnego. W przypadku modelowanych metodą MMC konfiguracji równowagowych węzłów DNA składających się z 1800 i 5400 par zasad, liczby $\langle Lk \rangle$ są różne, jednak koreluje liniowo z odpowiednimi liczbami wyznaczonymi w odniesieniu do węzłów idealnych [112, 113]. Liczba $\langle Lk \rangle$ koreluje z ruchliwością elektroforetyczną węzłów DNA [111].

Idealizację postaci geometrycznej katenanów DNA przeprowadza się analogicznie [121]. Udowodniono, że

idealne [2]-katenany DNA wykazują liniowe korelacje pomiędzy ruchliwością elektroforetyczną a liczbą $\langle Lk \rangle$ oraz pomiędzy liczbą $\langle Lk \rangle$ i stosunkiem długości splotu do grubości tuby [121], analogiczne do korelacji występujących w przypadku węzłów [111—114]. Jest rzeczą interesującą, że idealna struktura splotu 5_1^2 to taka, w której stosunek długości jednej składowej do drugiej wynosi 1:1, lecz korelowano w tym przypadku strukturę o najlepszym rozkładzie długości składowych, czyli ok. 2:1 [114]. Stosunek długości 2:1 w odniesieniu do splotów karbynowych 5_1^2 jest bliski stosunkowi, w którym sploty tego typu osiągają minimalną energię [35]. Korelacje zależą od wzajemnej długości składowych — wykazują odmienne nachylenie, gdy stosunek długości składowych splotu wynosi 1:1, a inne gdy jest równy 5:1 [121]. Zaburzenie liniowości korelacji pozwoliło na rozpoznanie układów uznawanych wcześniej [122—125] za najprostsze katenany jako świeżo replikowane DNA w postaci hemikatenanów, w których splecione są tylko pojedyncze nici dwóch cyklicznych dupleksów DNA [121].

Konstruując nieskończone rodziny węzłów, matematycy udowodnili jednak [126], że zależność długości węzła od wartości $\langle Lk \rangle$ może zmieniać się wykładniczo z wykładnikiem od 3/4 do 1 oraz, że 3/4 jest najmniejszym z takich wykładników. Ponadto wykazano [127], że stosunek długości węzła do grubości tuby może zmieniać się proporcjonalnie do 0,75 wartości $\langle Lk \rangle$. Pownowna analiza średniej liczby skrzyżowań w przypadku węzłów idealnych wykazała [112], że zmienia się ona wraz z topologiczną liczbą skrzyżowań wykładniczo z wartością wykładnika 1,2, natomiast w odniesieniu do węzłów giętkich (*flexible knots*) o ustalonej długości, wartość wykładnika wynosi 0,5 [128]. Co więcej, $\langle Wr \rangle$ węzłów idealnych i węzłów giętkich zmienia się liniowo z topologiczną liczbą skrzyżowań, lecz z różnym nachyleniem w zależności od typu węzła [128], analogicznie do przewidywań pracy [114].

PODSUMOWANIE

Na naszych oczach rodzi się nowa dziedzina chemii — chemia struktur topologicznych, która w ciągu wielu lat była traktowana jako czysto spekulatywna i ignorowana przez zasadniczy nurt chemii. Jedną z pierwszych prac dyskutujących możliwość syntezy związków topologicznych czekała ponad 30 lat na publikację [129, 130].

Jak to się zdarzało wcześniej w historii nauki, pomoc przyszła z dziedziny pokrewnej — biologii molekularnej. Pierwsze syntezy katenanów były wprowadzone przeprowadzone przez „czystych” chemików [5—7], mimo to prawdziwie dynamiczny rozwój omawianej dziedziny nastąpił dopiero po odkryciu powszechności struktur topologicznych wśród izomerów cyklicznego DNA. Można powiedzieć, że od tego czasu chemia topologiczna próbuje nadążyć za dynamicznym rozwojem biochemii topologicznej. Błyskotliwa idea pierwszej syn-

tezy związku o strukturze węzła trójlistnego [9] opiera się w istocie na sposobie tworzenia się węzłów DNA. Reakcja ta wykorzystuje efekt helikoidalnego ułożenia ligandów wokół atomu(ów) metali przejściowych, dzięki czemu po cyklizacji otrzymuje się strukturę węzła 3_1 (w razie innej charakterystyki geometrycznej ligandów — także splotów [12]).

Przykładów węzłów i splotów (katenanów) DNA jest nieskończenie wiele [51—97]. Przemiany jednych w drugie są źródłem wiedzy nie tylko o strukturze DNA, ale także o mechanizmach działania enzymów zmieniających topologię DNA — topoizomeraz [9]. Co więcej, dzięki pomocy czysto matematycznej techniki (2,2)-zaplotów można szczegółowo analizować mechanizm działania enzymu [93—96] i przenosić wnioski na jego działanie w przypadku niecyklicznego DNA.

Materiał DNA jest inspirujący także w odniesieniu do fizyki polimerów. Wprawdzie symulacje komputerowe węzłów i splotów DNA mają na celu głównie odtworzenie sytuacji opisywanych w biologii molekularnej, lecz stosują się także do zagadnień niebiologicznych — fizyki polimerów cyklicznych [98—110]. W istocie, tylko na gruncie chemii polimerów można prowadzić syntezę związków topologicznych o takim stopniu złożoności, jaka znana jest z biologii molekularnej. Im większą liczbę skrzyżowań ma struktura topologiczna tym bardziej rośnie jej energia całkowita i tym dłuższa musi być jej cząsteczka, aby nie rozerwała się ona w wyniku naprężeń [31—40]. Dlatego, najprawdopodobniej nigdy nie zostanie zsyntetyzowana cząsteczka węzła pierwszego o 10 skrzyżowaniach, która nie jest jednocześnie makrocząsteczką. Problem taki otwiera też ogromną przestrzeń przed zagadnieniami izomerii gdyż, jeśli zignorujemy chiralność, istnieje 165 różnych węzłów pierwszych o 10 skrzyżowaniach i 14 węzłów złożonych [50].

Na koniec warto wspomnieć o stworzonej przez biologów i fizyków koncepcji węzłów i splotów idealnych [111—116, 118—120, 128], w rozwoju której wiodącą rolę odgrywają naukowcy polscy A. Stasiak i P. Pierański. Koncepcja ta nawiązuje do tradycji figur platońskich — węzły i sploty mają postacie zamkniętych tub o minimalnym stosunku długości do średnicy tuby. Właściwości węzłów i splotów idealnych znakomicie korelują z ruchliwością elektroforetyczną oraz współczynnikiem sedimentacji węzłów DNA [111, 115, 119]. Co więcej, węzły idealne stały się też przedmiotem badań geometrii i fizyki [116, 118, 119, 126—128].

Wyrażam wdzięczność Panu prof. dr. hab. Piotrowi Pierańskiemu z Wydziału Fizyki Politechniki Poznańskiej i Instytutu Fizyki Molekularnej w Poznaniu za umożliwienie mi zapoznania się z treścią książki „Ideal Knots”, jak również za zgodę na publikację rys. 12 z jego strony internetowej.

Dziękuję serdecznie Pani prof. dr. hab. Joannie Sadlej z Wydziału Chemii UW oraz z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Panom prof. dr. hab. Aleksandrowi P. Mazurkowi z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego,

prof. dr. hab. Andrzejowi Lipkowskemu z Instytutu Chemii Przemysłowej oraz z Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, a także Panu doc. dr. hab. Marcinowi Krużewskiemu z Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej oraz z Instytutu — Centrum Onkologii za wnikliwie przedyskutowanie treści artykułu.

LITERATURA

- [1] Berzelius J. J.: *Ann. Phys. Chem.* 1830, 19, 305—335. [2] Slanina Z.: „Contemporary Theory of Chemical Isomerism”, Academia, Praga 1986. [3] Dodziuk H.: „Modern Conformational Analysis, Elucidating Novel Exciting Molecular Structures”, VCH, Nowy Jork 1995. [4] Rouvray D. H.: *Chem. Soc. Rev.* 1974, 3, 355. [5] Wasserman E.: *J. Am. Chem. Soc.* 1960, 82, 4433. [6] Frish H. L., Wasserman E.: *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 3789. [7] Wasserman E.: *Sci. Amer.* 1962, 207, 94. [8] Walba D. M., Richard R. M., Haltiwanger R. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 3219. [9] Dietrich-Buchecker C. O., Sauvage J.-P.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 189. [10] Walba D. M.: *Tetrahedron* 1985, 41, 3161. [11] Dietrich-Buchecker C. O., Sauvage J.-P.: *Chem. Rev.* 1987, 87, 795. [12] Sauvage J.-P.: *Acc. Chem. Res.* 1990, 23, 319. [13] Anieli P. L. i in.: *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 193. [14] Amabilino D. B., Stoddart J. F.: *Chem. Rev.* 1995, 95, 2725. [15] Iohradský M. B., Raymo F. M., Stoddart J. F.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1997, 62, 527. [16] Chambron J.-C., Dietrich-Buchecker C. O., Sauvage J.-P.: *Top. Curr. Chem.* 1993, 165, 131. [17] Suffczynski M.: *Pol. J. Chem.* 1995, 69, 157. [18] Dietrich-Buchecker C. O., Rapenne G., Sauvage J.-P.: *Coord. Chem. Rev.* 1999, 185/186, 167. [19] Breault G. A., Hunter C. A., Mayers P. C.: *Tetrahedron* 1999, 55, 5265. [20] Swiegers G. F., Malefetse T. J.: *Chem. Rev.* 2000, 100, 3483. [21] Mueller J. E., Du S. M., Seeman N. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 6306. [22] Seeman N. C.: *Mol. Eng.* 1992, 2, 297. [23] Du S. M., Seeman N. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 9652. [24] Seeman N. C. i in.: *New J. Chem.* 1993, 17, 739. [25] Du S. M., Seeman N. C.: *Biopolymers* 1994, 34, 31. [26] Du S. M., Wang H., Tse-Dinh Y.-C., Seeman N. C.: *Biochemistry* 1995, 34, 673. [27] Du S. M., Stollar B. D., Seeman N. C.: *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 1194. [28] Seeman N. C.: *Tib. Tech.* 1999, 17, 437. [29] Seeman N. C.: *Nano Lett.* 2001, 1, 22. [30] Yan H., Zhang X., Shen Z., Seeman N. C.: *Nature* 2002, 415, 62. [31] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *J. Phys. Chem. A* 1998, 102, 5260. [32] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *Pol. J. Chem.* 1998, 72, N. 7S, 1593. [33] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *Int. J. Quantum. Chem.* 1998, 70, 1009. [34] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *J. Mol. Struct.* 1999, 482/483, 339. [35] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *Int. J. Quant. Chem.* 1999, 75, 839. [36] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *Int. J. Quantum. Chem.* 2000, 80, 1087. [37] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *J. Mol. Struct.* 2001, 563/564, 309. [38] Dobrowolski J. Cz., Mazurek A. P.: *Chem. Phys. Lett.* 2001, 348, 60. [39] Dobrowolski J. Cz.: *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 2002, 42, 490. [40] Dobrowolski J. Cz., Jamróz M. H.: praca w przygotowaniu. [41] Salecki J., Piechal A.: „Liny, węzły, sploty”, Wyd. Jun-ga, Warszawa 1995. [42] Burda: „Szycie to takie łatwe”, Muza SA, Warszawa 1996. [43] Sacha M., Siewicki A.: „Mały praktyczny poradnik z ilustracjami. Jak wiązać krawaty”, Wyd. Kwiecieński, Kielce 1998. [44] Cieśliński P.: *Gazeta Wyborcza*, 10 marca 1999. [45] Bain I.: „Celtic knotwork”, Constable and Company Ltd., Londyn 1998. [46] Tsultem N.: „Development

of the Mongolian National Style Painting »Mongol Zurag« in Brief”, State Publishing House, Ulan-Bator 1986. [47] Mislow K., Liang C.: *Croat. Chem. Acta* 1996, **69**, 1385. [48] Walba D. M.: „Stereochemical Topology” w „Chemical Application of Technology and Graph Theory” (red. King R. B.), Elsevier, Amsterdam 1983, str. 17—23. [49] Rolfsen D.: „Knot and Links”, Publish or Perish, Inc., Wilmington (USA) 1976. [50] Przytycki J. H.: „Węzły. Podejście kombinatoryczne do teorii węzłów”, SCRIPT, Warszawa 1995.

[51] Vinograd J., Bruner R., Kent R., Weigle J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1963, **49**, 1902. [52] Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R., Laipis P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1965, **53**, 1104. [53] Stryer L.: „Biochemia”, PWN, Warszawa 1999. [54] Wang J. C., Schwartz H.: *Biopolymers* 1967, **5**, 953. [55] Hudson B., Vinograd J.: *Nature* 1967, **216**, 647. [56] Clayton D. A., Vinograd J.: *Nature* 1967, **216**, 652. [57] Wasserman S. A., Cozzarelli N. R.: *Science* 1986, **232**, 951. [58] White J. H., Millett K. C., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1987, **197**, 585. [59] Wang J. C.: *Annu. Rev. Biochem.* 1996, **65**, 635. [60] Fuller F. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971, **68**, 815.

[61] Fuller F. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**, 3557. [62] White J. H.: *Am. J. Math.* 1969, **9**, 693. [63] White J. H., Cozzarelli N. R., Bauer W. R.: *Science* 1988, **241**, 323. [64] Depew R. E., Wang J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, **72**, 4275. [65] Pulleyblank D. E., Shure M., Tang D., Vinograd J., Vosberg H.-P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975, **72**, 4280. [66] Geider K., Hoffman-Berling H.: *Ann. Rev. Biochem.* 1981, **50**, 233. [67] Gellert M.: *Ann. Rev. Biochem.* 1981, **50**, 879. [68] Dean F., Krasnov M. A., Otter R., Matzuk M. M., Spengler S. J., Cozzarelli N. R.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.* 1982, **47**, 769. [69] Mizuuchi K., Gellert M., Weisberg R. A., Nash H. A.: *J. Mol. Biol.* 1980, **141**, 485. [70] Mizuuchi K., Fisher L. M., O’Dea M. H., Gellert M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1980, **77**, 1847.

[71] Kreuzer K. N., Cozzarelli N. R.: *Cell* 1981, **20**, 245. [72] Read R. R.: *Cell* 1981, **25**, 713. [73] Read R. R., Grindley N. D. F.: *Cell* 1981, **25**, 721. [74] Krasnow M. A., Cozzarelli N. R.: *Cell* 1983, **32**, 1313. [75] Brown P. O., Cozzarelli N. R.: *Science* 1979, **206**, 1081. [76] Wasserman S. A., Cozzarelli N. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, **82**, 1079. [77] Krasnov M. A., Stasiak A., Spengler S. J., Dean F. B., Koller T., Cozzarelli N. R.: *Nature* 1983, **304**, 559. [78] Wasserman S. A., Dungan J. M., Cozzarelli N. R.: *Science* 1985, **229**, 171. [79] Dean F. B., Stasiak A., Koller T., Cozzarelli N. R.: *J. Biol. Chem.* 1985, **260**, 4975. [80] Dean F. B., Cozzarelli N. R.: *J. Biol. Chem.* 1985, **260**, 4984.

[81] Crisona N. J., Kanaar R., Gonzalez T. N., Zechiedrich E. L., Klippel A., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1994, **243**, 437. [82] Spengler S. J., Stasiak A., Cozzarelli N. R.: *Cell* 1985, **42**, 325. [83] Sogo J. M., Stasiak A., Martinez-Robles M. L., Krimer D. B., Hernández P., Schvartzman J. B.: *J. Mol. Biol.* 1999, **286**, 637. [84] Brewster S., Aslett M., Barker D. C.: *Parasitology Today* 1998, **14**, 437. [85] Simpson L.: *Annu. Rev. Microbiol.* 1987, **41**, 363. [86] Ryan K. A., Shapiro T. A., Rauch C. A., Englund P. T.: *Annu. Rev. Microbiol.* 1988, **42**, 339. [87] Ryan K. A., Shapiro T. A., Rauch C. A., Griffith J. D., Englund P. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 5844. [88] Shapiro T. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**, 7809. [89] Chen J., Rauch C. A., White J. H., Englund P. T., Cozzarelli N. R.: *Cell* 1995, **80**, 61. [90] Rauch C. A., Perez-Morga D., Cozzarelli N. R., Englund P. T.: *EMBO J.* 1993, **12**, 403.

[91] Shapiro T. A., Englund P. T.: *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, **49**, 117. [92] Chen J., Englund P. T., Cozzarelli N. R.: *EMBO J.* 1995, **14**, 6339. [93] Ernst C., Sumners D. W.: *Math. Proc. Camb. Phil. Soc.* 1990, **108**, 489. [94] Sumners D. W., Ernst C., Spengler S. J., Cozzarelli N. R.: *Quart. Rev. Biophys.* 1995, **28**, 253. [95] Murasugi K.: „Knot Theory and Its Applications”, Birkhäuser, Boston-Bazylea-Berlin 1996. [96] Crisona N. J., Weinberg R. L., Peter B. J., Sumners D. W., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1999, **289**, 747. [97] Bath J., Sherratt D. J., Colloms S. D.: *J. Mol. Biol.* 1999, **289**, 873. [98] Vologodskii A. V., Levene S. D., Klenin K. V., Frank-Kamentskii M., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1992, **227**, 1224. [99] Schlick T.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995, **5**, 245. [100] Olson W. K.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996, **6**, 242.

[101] Schlick T., Olson W. K.: *Science* 1992, **257**, 1110. [102] Rybenkov V. V., Cozzarelli N. R., Vologodskii A. V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**, 5307. [103] Shaw S. Y., Wang J. C.: *Science* 1993, **260**, 533. [104] Tesi M. C., Janse van Rensburg E. J., Orlandini E., Sumners D. W., Whittington S. G.: *Phys. Rev. E.* 1994, **49**, 868. [105] Rybenkov V. V., Vologodskii A. V., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1997, **267**, 312. [106] Levene S. D., Donahue C., Boles C., Cozzarelli N. R.: *Biophys. J.* 1995, **69**, 1036. [107] Otto M., Vilgis T. A.: *Phys. Rev. E.* 1998, **80**, 881. [108] Metropolis N., Rosenbluth A. W., Rosenbluth M. N., Teller A. H., Teller E.: *J. Chem. Phys.* 1953, **21**, 1087. [109] Vologodskii A. V., Cozzarelli N. R.: *J. Mol. Biol.* 1993, **232**, 1130. [110] Wasserman S. A., Cozzarelli N. R.: *Nature* 1988, **334**, 448.

[111] Stasiak A., Katritch V., Bednar J., Michoud D., Dubochet J.: *Nature* 1996, **384**, 122. [112] Katritch V., Bednar J., Michoud D., Scharein R. G., Dubochet J., Stasiak A.: *Nature* 1996, **384**, 142. [113] Katritch V., Olson W. K., Pierański P., Dubochet J., Stasiak A.: *Nature* 1997, **388**, 148. [114] Cerf C., Stasiak A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, **97**, 3795. [115] Vologodskii A. V., Crisona N., Laurie B., Pierański P., Katritch V., Dubochet J., Stasiak A.: *J. Mol. Biol.* 1998, **278**, 1. [116] Stasiak A., Dubochet J., Katritch V., Pierański P.: „Ideal Knots and their Relation the Physics of Real Knots” w „Ideal Knots” (red. Stasiak A., Katritch V., Kauffman L. H.), Series on Knots and Everything t. 19., World Scientific, Singapur-New Jersey-Londyn-Hong Kong 1998. [117] Grosberg A. Y., Feigel A., Rabin Y.: *Phys. Rev. E.* 1996, **54**, 6618. [118] Gonzalez O., Maddocks J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, 4769. [119] Pierański P.: „In Search of Ideal Knots” w książce [116] str. 20 [120] Pierański P., Przybył S.: *Phys. Rev. E.* 2001, **64**, 031801-1.

[121] Laurie B., Katritch V., Sogo J., Koller T., Dubochet J., Stasiak A.: *Biophys. J.* 1998, **74**, 2815. [122] Sundin O., Varshavsky A.: *Cell* 1980, **21**, 103. [123] Sundin O., Varshavsky A.: *Cell* 1981, **25**, 659. [124] Adams D. E., Shekhtman E. M., Zechiedrich E. L., Schmid M. B., Cozzarelli N. R.: *Cell* 1992, **71**, 277. [125] Ullsperger C. J., Vologodskii A. V., Cozzarelli N. R.: „Unlinking of DNA by Topoisomerases During DNA Replication” w „Nucleic Acids and Molecular Biology”, t. 9., str. 115—142 (red. Eckstein F., Lilley D. M. J.), Springer, Berlin-Nowy Jork 1995. [126] Cantarella J., Kusner R. B., Sullivan J. M.: *Nature* 1998, **392**, 237. [127] Buck G.: *Nature* 1998, **392**, 239. [128] Huang J.-Y., Lai P.-Y.: *Phys. Rev. E.* 2001, **63**, 021506-1. [129] Walba D. M.: *New J. Chem.* 1993, **17**, 618. [130] van Gulick N.: *New J. Chem.* 1993, **17**, 619.