

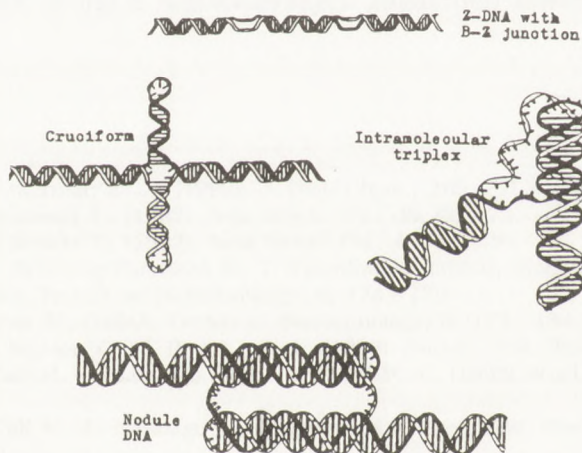
Podwójna helisa DNA

Jan Barciszewski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Poznań

W kwietniu 1953 r. minęło 40 lat od czasu kiedy dr James Watson (25 lat) i Francis Crick (35 lat), pracujący wówczas w laboratorium Cavendish Uniwersytetu w Cambridge, zaproponowali model budowy trzeciorzędowej (przestrzennej) struktury kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA). Okazało się później, że było to jedno z największych osiągnięć w nauce. Zrodziło nowe kierunki w biologii, genetyce i biochemii oraz rozpoczęło dynamiczny rozwój biologii molekularnej.

Odkrycia naukowe nie odbywają się w próżni. W ciągu tych lat, począwszy od roku 1869, kiedy Friedrich Miescher wyodrębnił kwas nukleinowy ze spermy łososia, przypuszczano, że DNA może być materiałem genetycznym. Jeszcze na początku obecnego stulecia znaczna grupa uczonych upatrywała w kwasach nukleinowych jedynie funkcję strukturalną, a w białkach widziało nośnik informacji genetycznej. Poglądy te okazały się całkowicie mylne. W 1944 r. Oswald Avery, Colin McLeod i McLyn McCarty z Anglii zauważyli,



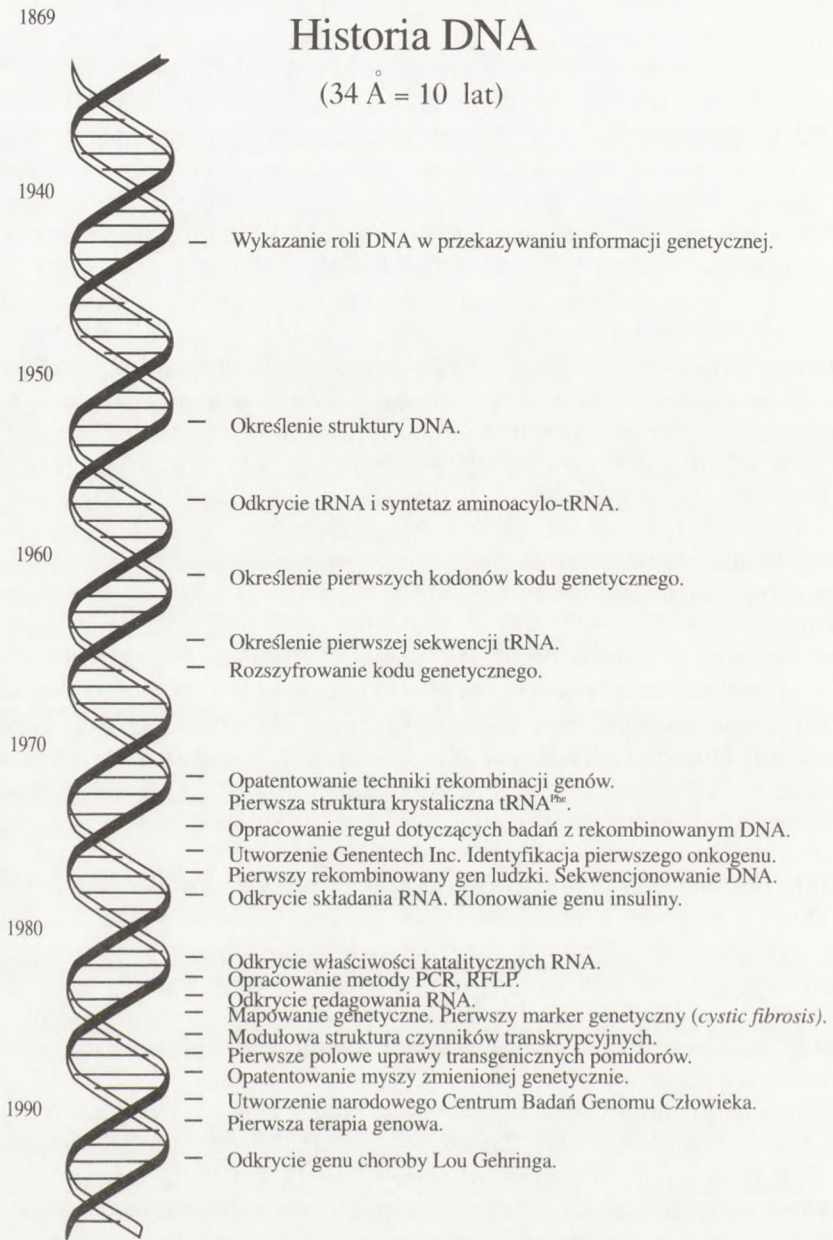
Rys. 1. Struktura typowej podwójnej spirali DNA (B-DNA) oraz alternatywna konformacja DNA i Z-DNA z połączeniami B-Z, krzyżowa (*cruciform*), potrójna wewnętrzcząsteczkowa spirala (*intramolecular triplex*) oraz węzłkowa (*module*).

że DNA patogennego szczepu bakterii *Pseudomonas* przeniesiony do normalnego szczepu powoduje jego patogenność. Ta transformacja okazała się genetycznie stabilna i następne pokolenia bakterii charakteryzowały się nowo nabytymi cechami. Obserwacje te potwierdzili Alfred Hershey i Martha Chase na przełomie lat 1951/52 w laboratorium Cold Spring Harbor w USA. Starali się oni poznać mechanizm infekcji bakterii *Escherichia coli* wirusem bakteryjnym T2 (bakteriofagiem T2). Wykorzystali fakt, że białka bakteriofaga T2 zawierają siarkę oraz niewielką ilość fosforu, natomiast DNA zawiera fosfor, ale nie siarkę. W związku z tym znakowali bakteriofag T2 radioizotopami: siarką 35 i fosforem 32. Wykazali oni jednoznacznie, że białko zawiera siarkę i stanowi płaszcz ochronny odpowiedzialny za „adsorbcję” faga do bakterii, a także, iż jest niezbędnym „instrumentem” dla iniekcji fagowego DNA do komórki. Fagowe białko prawdopodobnie nie odgrywa żadnej roli w dalszym rozwoju faga w komórce w przeciwieństwie do DNA, który spełnia określoną i ważną funkcję. Praca ta, jak wspomina J. Watson, stanowiła dowód potwierdzający, że DNA jest podstawowym materiałem genetycznym. Ten argument okazał się niezwykle ważny dla późniejszych badań strukturalnych kwasów nukleinowych, w których starano się odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób olbrzymia informacja genetyczna niezbędna dla funkcjonowania komórki jest zakodowana w DNA oraz w jaki sposób następuje jej odzyskanie, precyzyjna replikacja w komórce?

J. Watson and F. Crick sędzieli, że odpowiedź na to i podobne pytania musi być zawarta w strukturze DNA. Na początku 1953 r. znaleźli oni sposób interpretacji zdjęć obrazujących rozpraszanie promieni X na włóknach DNA (*X-ray diffraction pattern*) wykonanych przez dr Rosalin Franklin (Kings College, London). Obrazy dyfrakcyjne charakteryzowały się pewną regularnością w przestrzeni. Watson i Crick szybko rozpoznali, że uginanie promieni wykazuje obraz charakterystyczny dla struktury helikalnej. Zauważyli, że wielkość warstwy oddzielającej linie wynosi 1/10 powtórzenia obrazu i w związku z tym stało się oczywiste, że 10 nukleotydów przypada na jeden pełen obrót spirali. Dane o gęstości włókien sugerowały, że w jednej helikalnej cząsteczce powinny być dwie nici DNA. Watson i Crick wykazali, że spiralna struktura DNA powstaje na skutek komplementarnych oddziaływań (wiązań wodorowych) między zasadami znajdującymi się w przeciwnie biegnących łańcuchach cząsteczki. Taki system parowania okazał się możliwy, jeśli zasady występują w odpowiedniej (głównej) formie tautomerycznej.

Struktura zaproponowana przez Watsona i Cricka bardzo dobrze tłumaczyła wcześniejsze obserwacje Erwina Chargaffa, który analizując zawartość A, T, G i C w DNA wielu organizmów stwierdził, że A i T występują w równych lub prawie równych ilościach. To samo dotyczy również G i C. Jeśli komórkowy DNA występuje w postaci dwuniciowej z systemem parowania zaproponowanym przez Cricka i Watsona to reguły Chargaffa są tego oczywistą konsekwencją.

W modelu Cricka i Watsona pary zasad ułożone są jedna nad drugą w płaszczyznach prawie prostopadłych do osi helisy. Takie ułożenie zasad pozwala



Rys. 2. Historia DNA.

na silne oddziaływanie typu van der Waalsa między nimi. Grupy fosforanowe znajdują się na zewnątrz i mogą oddziaływać z rozpuszczalnikiem. Każda para zasad jest skręcona o 36 stopni w stosunku do następnej i dlatego 10 par zasad mieści się w jednym pełnym obrocie helisy. Ponieważ obraz dyfrakcyjny wykazywał powtarzający się odstęp o około 3,4 nm oznaczało to, że odległość między parami zasad wzdłuż osi symetrii musiała wynosić około 0,34 nm.

Koncepcja Watsona i Cricka nie tylko wyjaśniała strukturę DNA. Istota tego rozwiązania była daleko głębsza. Po rozdzieleniu nici DNA następuje synteza również dwuniciowego DNA, który jest dokładną kopią oryginału.

Model struktury DNA odegrał ważną rolę w biologii, mimo że struktura DNA zaproponowana przez Watsona i Cricka nie była wówczas tak dokładnie rozumiana jak dzisiaj. Analizowane włókna, otrzymane przy udziale dużej ilości wody (wilgotność), charakteryzowały się występowaniem tzw. formy B-DNA. Włókna otrzymywane przy ograniczonym dostępie wody mają inną strukturę tzw. A-DNA. Kilka lat temu określono strukturę kryształów DNA. Okazało się, że pary zasad nie są dokładnie prostopadłe do osi spirali. Ugięcie to wynosi 6 stopni. W strukturze B-DNA zasady ułożone są bardzo blisko osi helisy, która przechodzi między wiązaniami wodorowymi. Natomiast w strukturze A-DNA zasady leżą bardziej na zewnątrz spirali i są wyraźnie skręcone w stosunku do jej osi. Powierzchnie helis A i B są różne. Spirala B-DNA ma dużą i małą brózdę, natomiast w formie A obie brózdy są w przybliżeniu równe i głębokie. Budowa krystaliczna DNA rozwiązana przez R.E. Dickersona wskazuje wyraźnie, że struktura włókien DNA jest nadmiernie uproszczona. Rzeczywista struktura DNA różni się kątem skreću między parami zasad oraz konformacją dezoksyrybozy. Zmienia się ona w zależności od lokalnej sekwencji, a także w wyniku oddziaływania z innymi cząsteczkami np. jonami metali. Nie jest ona homogeniczna. Najnowsze badania budowy kryształów DNA dają możliwość wytłumaczenia dlaczego struktura B-DNA jest faworyzowana w roztworach wodnych. Dzieje się tak dlatego, że forma B-DNA, ale nie A-DNA, umożliwia utworzenie w małej brózdzie łańcucha cząsteczek wody stabilizujących strukturę. Należy pamiętać, że struktura DNA jest niezwykle dynamiczna. Czas życia pary zasad Watsona-Cricka w roztworze wynosi 10^{-2} sekundy (s), czas życia pary zasad nie związanej wiązaniami wodorowymi 10^{-7} s, a prawdopodobieństwo otwarcia pary zasad wynosi 10^{-5} .

Obecnie wiadomo, że istnieją alternatywnie formy DNA. Struktury krzyżowe (*cruciform*), mogą powstawać w negatywnie skręconych regionach DNA posiadających odwrotnie powtarzające się sekwencje nukleotydowe. Inna forma — Z-DNA, powstaje w regionach DNA charakteryzujących się występowaniem naprzemiennych sekwencji purynowych i pirymidynowych, jak np. $(GT)_n$ lub $(GC)_n$. Forma Z-DNA występuje w postaci lewoskrętnej podwójnej helisy, w przeciwieństwie do prawoskrętnego modelu Watsona-Cricka (rys. 1). Z-DNA wykazuje także inne cechy. Pirymidyny występują zawsze w formie **anti** (ułożenie zasady względem dezoksyrybozy), natomiast puryny mają konfigurację **syn**. W strukturze A- i B-DNA wszystkie nukleozydy mają formę **anti**.

Ponadto sekwencje polipuryn i polipirydyn zawierających odwrotne powtó-

rzenia (odbicie lustrzane) mogą tworzyć różne izomery potrójnej spirali, w której trzecia nić jest umieszczona w dużej brózdzie i związana z podwójną spiralą wiązaniami wodorowymi typu Hoogsteena.

Znane są także równoległe DNA, węzłkowate DNA (*module DNA*) oraz quadupleksy (telomerowe) DNA. Końce telomerów stanowią pojedynczo niciowe DNA, tworzące tetrazy (*quaduplex*) zawierające motyw $(T/A)_m G_n$, gdzie m wynosi 1–4 a n równa się 1–8. Tetrazy, tworzą się z 4 reszt guaniny związanych wiązaniami typu Hoogsteena i zostały potwierdzone badaniami rentgenostrukturalnymi. Antyrównoległe łańcuchy polinukleotydowe mają zmienną konformację nukleozydów: syn-anti-syn-anti.

Model struktury DNA rozwiązany przez Watsona i Cricka został opisany w 4 publikacjach z których pierwsza ukazała się w *Nature*, 25 kwietnia 1953 r. (40 lat temu). Towarzyszyły jej 2 inne prace o strukturze DNA wykonane w King's College w Londynie autorstwa Wilkinsa, Stokesa i Wilsona oraz Franklin i Gosling. Najważniejsze zdanie z pierwszej pracy Watsona i Cricka brzmiało: *"It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material"*. Było to wyraźne zwrócenie uwagi na funkcjonalne znaczenie tej struktury. Jest to szczególnie dzisiaj oczywiste.

Tak jak wspomniałem cząsteczka DNA może występować w wielu różnych konformacjach. DNA może podlegać różnym mutacjom spontanicznym w czasie procesów replikacji, naprawy i rekombinacji. Zmiany w formach tautomerycznych zasad, protonacja lub jonizacja zasad mogą powodować błędne parowanie prowadząc do zamiany nukleotydów. Przypuszcza się zatem, że w wielu mutacjach istotną rolę mogą odgrywać alternatywne struktury spiralne DNA. Ponadto celowe wydaje się poznanie zależności między strukturą i konformacją DNA a mutacjami ze względu na możliwości zastosowania terapii genowej u ludzi.

Dlaczego odkrycie podwójnej helisy DNA było i pozostaje w dalszym ciągu jednym z największych osiągnięć. Czy mogło się zdarzyć, że struktura DNA nie zostałaby rozwiązana 40 lat temu i pozostałaby tajemnicą? Zapewne nie. Gdyby Watson nie pojechał na konferencję do Neapolu w 1951 r. i nie wysłuchał wykładu Maurice Wilkinsa, z którego dowiedział się m.in., że gen można otrzymać w formie krystalicznej, to odkrycie helisy DNA nastąpiłoby niewątpliwie później. Ewentualne opóźnienie rozwiązania struktury DNA mogło nastąpić również gdyby nie doszło do współpracy Watsona i Cricka, dwóch ludzi myślących nieszablonowo, odważnie stawiających pytania i wyraźnie zorientowanych na rozwiązanie jasno określonego celu. Odkrycie to miało wielkie znaczenie dla rozwoju nauk biologicznych (rys. 2). Spowodowało również wyzwolenie nowych trendów badawczych i sposobu myślenia ponieważ:

A. W psychologicznej infrastrukturze twórców biologii molekularnej drzymała romantyczna idea, że można poznać nowe nie znane dotąd prawa fizyki badając strukturę genów.

B. Biologia molekularna powstała ponieważ trzech wielkich fizyków: Niels Bohr, Erwin Schrödinger i Max Delbruck poszukiwało paradoksów w biologii.

Takich nie znaleźli, ale w zamian stwierdzili, że poznane wcześniej prawa fizyki i chemii strukturalnej decydują o replikacji.

C. Wówczas najważniejszym problemem było rozwiązanie, a raczej odgadnięcie struktury, DNA i jej potwierdzenie dostępnymi danymi eksperymentalnymi. Rozwiązanie struktury uwzględniało dane krystalograficzne i doprowadziło do opracowania modelu.

Dla osiągnięcia sukcesu naukowego korzystna jest praca zespołowa. Ma ona również swoje ograniczenia. Nieoptymalna jest współpraca z osobami dużo młodszymi lub dużo starszymi, ponieważ jak sądzi F. Crick mogą pojawiać się problemy międzyludzkie (nieuprzejmości), które są często początkiem końca każdej dobrej współpracy w nauce.

Jednym z najważniejszych zagadnień w biologii jest naturalna selekcja. Jest to podstawowy mechanizm, który wyróżnia biologię od innych gałęzi nauki. Naturalna selekcja opiera się na zdarzeniach, które miały miejsce, a każdy proces jest uwikłany w wiele innych zależności. Francois Jacob (laureat Nagrody Nobla, 1965 r.) stwierdzał, że ewolucja jest myślicielem. Jest wynikiem wielkiej złożoności, która czyni organizmy biologiczne trudnymi do zrozumienia. W związku z tym biologia jest wyraźnie różna od fizyki. Natomiast podstawowe prawa fizyki mogą być zwykle wyrażone w postaci matematycznej i dlatego mają znaczenie uniwersalne. Prawa zachodzące w biologii w przeciwieństwie do praw istniejących w fizyce są tylko szerokim uogólnieniem, ponieważ opisują bardzo skomplikowane mechanizmy wytworzone przez naturalną selekcję. Dla pełnego zrozumienia dowolnego procesu życiowego niezbędne jest także poznanie jego chemii.

O atrakcyjności biologii molekularnej i jej wpływie na inne nauki o życiu decydują dwa czynniki. Po pierwsze, materia żywa podlega tym samym fundamentalnym prawom fizyki i w związku z tym cała siła współczesnych chemicznych i fizycznych teorii może być zastosowana do problemów biologicznych. Po drugie, nowe i bardzo precyzyjne techniki badawcze pozwalają naukowcom na stawianie pytań, dotyczących podstawowych zagadnień życia, których do niedawna nie można było sobie nawet wyobrazić.

Dla osiągnięcia wielkiego wyniku naukowego istotnym czynnikiem jest także tradycja naukowa. Wiadomo, że wiele grup badawczych starało się rozwiązać strukturę DNA. Stało się to jednak możliwe w laboratorium Cavendish w Cambridge. W tym właśnie ośrodku miało miejsce szereg ważnych odkryć naukowych:

- J.J. Thomson odkrył elektron poprzez pomiary masy i ładunku,
- J. Crockroft i D. Walton pod kierunkiem J. Rutheforda dokonali rozbitcia atomu (ich oryginalny akcelerator jest wciąż w Cambridge),
- James Chadwich w 1930 r. odkrył neutrony,
- Lawrence Bragg sformułował prawa rozpraszania promieni X. Był on najmłodszym laureatem Nagrody Nobla.
- M. Perutz i J. Kendrew pracowali nad strukturą białek.

Znaczenie laboratorium w Cambridge i jego atmosfery naukowej trudno nie doceniać w rozwiązaniu struktury DNA. Charakteryzuje to wypowiedź

M.F. Perutza na temat wysokiej efektywności pracy w laboratorium w Cambridge. Został on kiedyś zapytany co właściwie uczynił, że laboratorium, którego był kierownikiem odniosło tak znakomite sukcesy. Odpowiadając stwierdził, że zna młodego, zdolnego, pracowitego, utalentowanego i bardzo zrównoważonego człowieka. Jego matka zapytana jak udało się jej ukształtować swego syna, odpowiedziała, że urodził się obdarzony tymi talentami. Jej zadaniem było tylko pilnowanie, by nic, co natura dała, nie uległo zmarnowaniu. Podobna atmosfera panowała w laboratorium. Współpracując ze zdolnymi ludźmi, rola szefa naukowego ograniczała się do pomocy i zabezpieczenia właściwych warunków pracy.

Im więcej czasu upływa od momentu odkrycia DNA tym bardziej postrzegamy i rozumiemy osiągnięcie Watsona i Cricka, ale jednocześnie pozostaje ono w dalszym ciągu bardzo tajemnicze. Było ono bowiem wynikiem splotu wielu istotnych czynników. Mnie się wydaje, że piękno i elegancja podwójnej helisy związane było i jest z niespodziewanym odkryciem struktury DNA, w przeciwieństwie np. do innego, również ważnego odkrycia jakim jest kod genetyczny.

Niezwykłe zainteresowanie tym wielkim odkryciem naukowym stało się również tematem wielu książek oraz interesujących filmów. Opublikowane zostały następujące pozycje książkowe opisujące odkrycie struktury DNA:

- *The Double Helix*, James D. Watson, 1968, Atheneum, New York,
- *The Path to the Double Helix*, Robert Olby, 1974, Mac Millan Press Ltd,
- *The Eighth Day of Creation*, Horace Freeland and Judson,
- *What Mad Pursuit*, Francis Crick, Weidenfeld and Nicolson, 1988 London.

Tematyka DNA stała się motywem do następujących filmów.

- *The double helix* by Ronnie Fouracre (Comentary by Issac Asimov BBC Production; Horizon (England) Nova, USA,
- *Whose Life Is It, Anyway?* Larry Bachmann, 20th Century Fox,
- *Life Story* (in England) April 27, 1987, BBC, *Double helix* (USA) Arts and Entertaiment.

The double helix of DNA

Summary

Short history of the path to the double helix of DNA was described. Special attention was been paid to the early work of Rosalind Franklin, Maurice Wilkins and Erwin Chargaff.

Also some general consequences of the DNA structure for biological sciences were discussed.

key words:

DNA; double helix; tertiary structure of DNA.

Adres dla korespondencji:

Jan Barciszewski, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań.