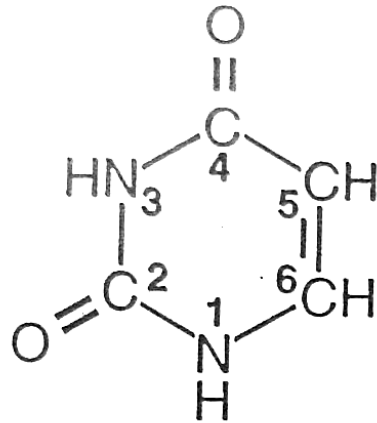
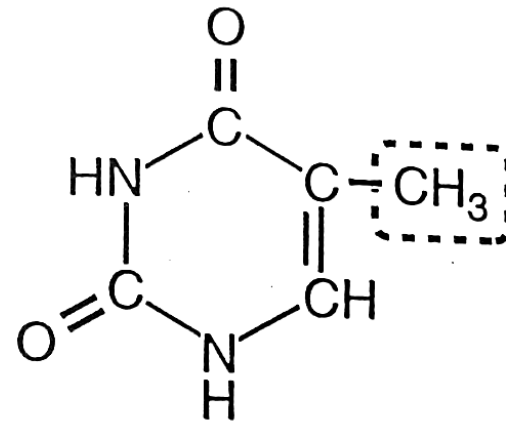


RNA

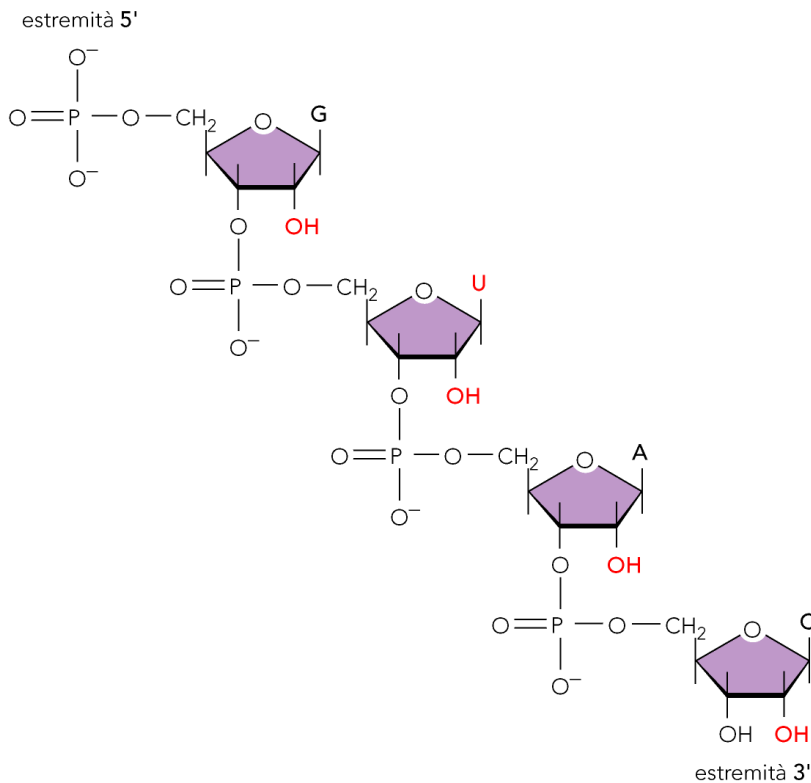


Uracil (U)
(in RNA)



Thymine (T)
(in DNA)

Fig. 11.26. Comparison of the structures of uracil and thymine.



Caratteristiche strutturali dell'RNA

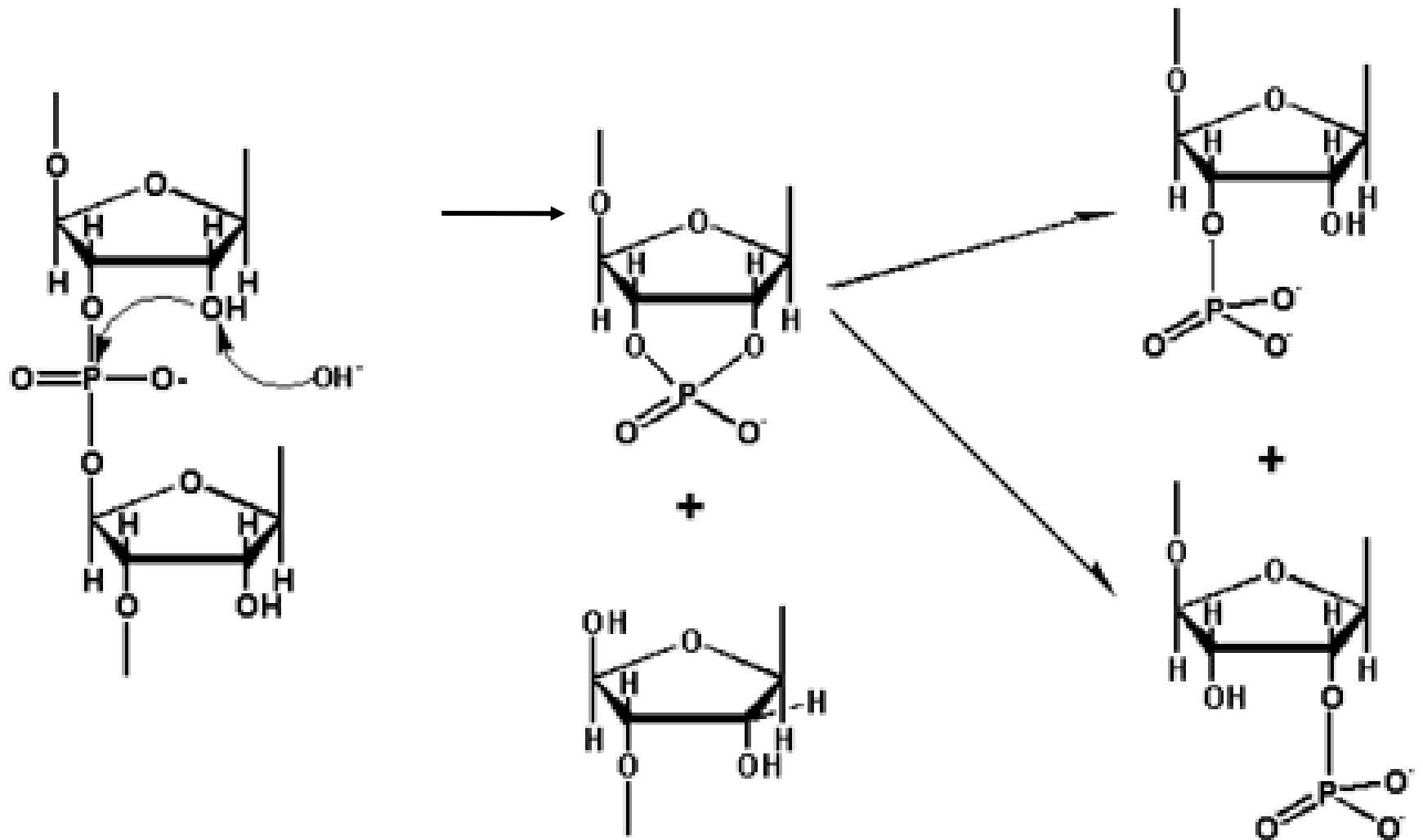
Le differenze con DNA sono date dal ribosio, dall'uracile e dal fatto che normalmente non è presente nelle cellule come doppia elica.

Solo in certi virus, dove è il materiale genetico, l'RNA può trovarsi in doppia elica.

Nelle cellule può comunque formare lunghe regioni a doppia elica autocomplementari.

Esistono diversi tipi di RNA, tutti a singolo filamento, aventi diverse funzioni:

mRNA: portatore del messaggio genetico (INTERMEDIARIO); **tRNA**: adattatore fra codoni su mRNA e amminoacidi (DI RACCORDO); **rRNA**: componente strutturale dei ribosomi (STRUTTURALE); **RNAi**: corte sequenze complementari a mRNA, funzioni regolative espressione genica (REGOLAZIONE); **ribozimi**: enzimi ad RNA, coinvolti in molteplici reazioni cellulari (es. telomerasi, rRNA 23S); altri RNA con funzioni speciali, coinvolti nella sintesi proteica (CATALISI).



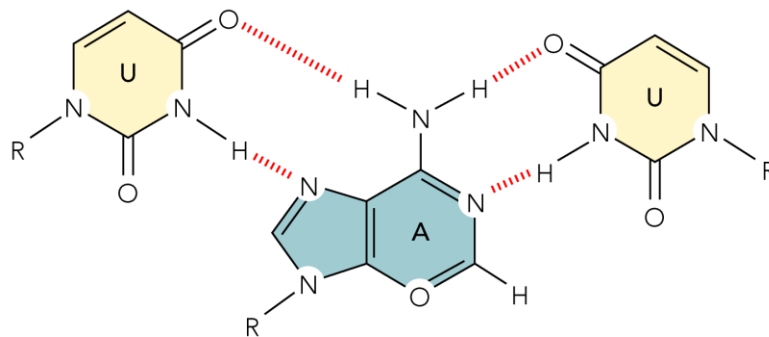
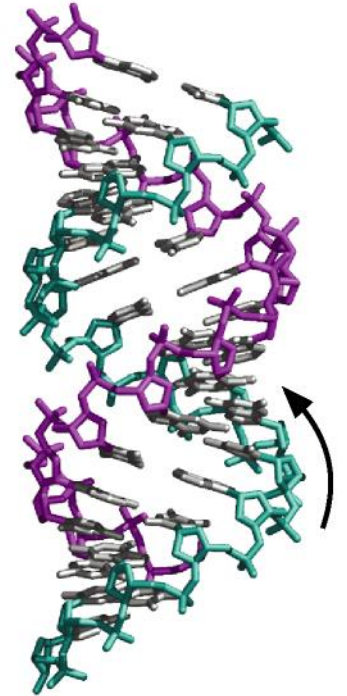
L'idrolisi alcalina dell'RNA è facilitata dalla presenza dell'ossidrile 2' del ribosio, che consente l'intermedio fosfodiester ciclico, impossibile nel caso del DNA.

strutture RNA

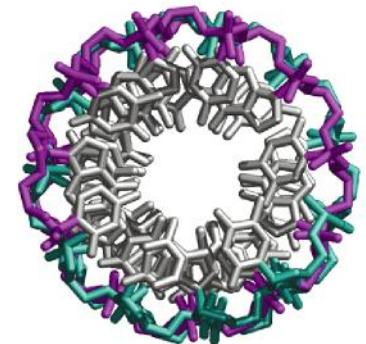
RNA a doppia elica può fare solo struttura A, per l'ingombro del 2'OH

Solco maggiore meno accessibile, quello minore più accessibile

Può formare complesse strutture secondarie



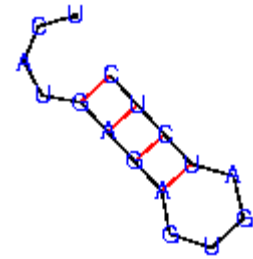
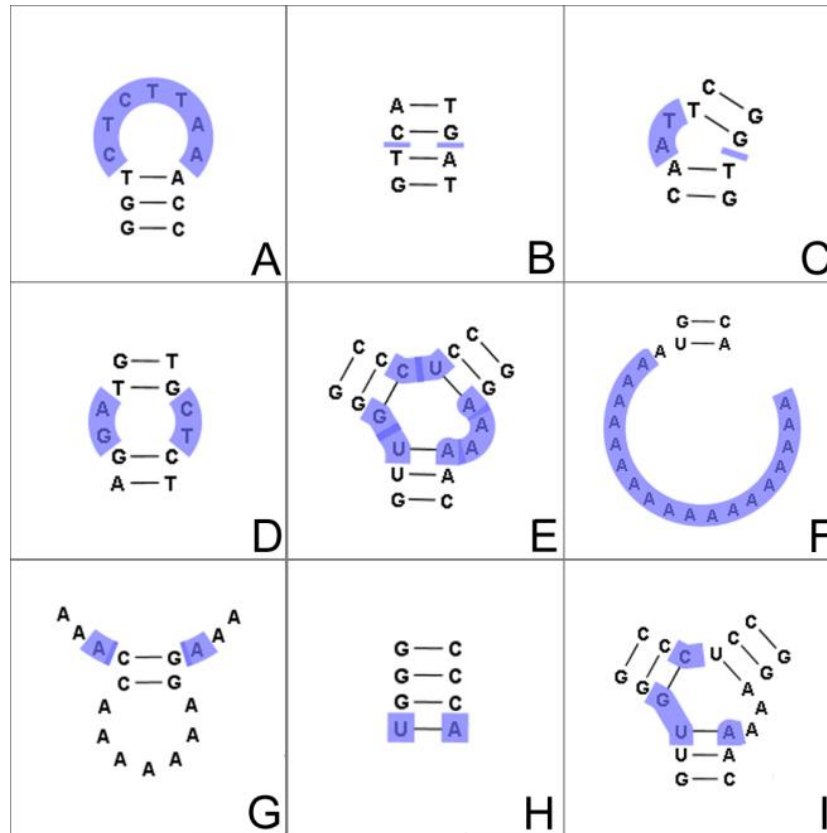
tripletta di basi U:A:U



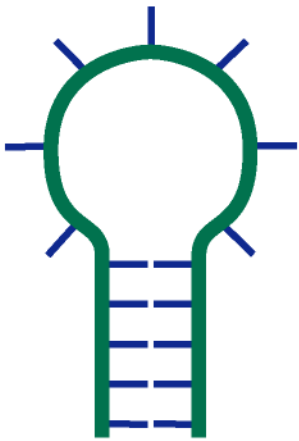
Quindi.....

Le doppie eliche di tipo A sono meno adatte ad interazioni sequenza-specifiche con le proteine, perché il solco maggiore è molto più stretto e profondo. Il solco minore è più accessibile ma meno informativo.

Strutture dell'RNA



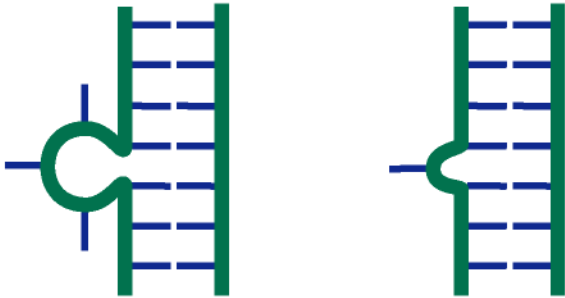
a



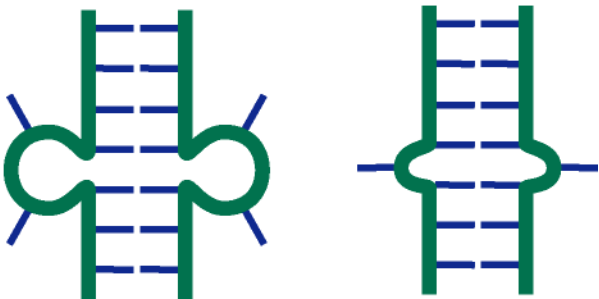
Diversi tipi di strutture di RNA a doppia elica

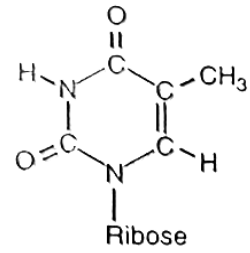
a) Forcina (hairpin); b) gemma (bulge); c) ansa (loop). Generalmente si formano fra segmenti complementari dello stesso filamento, talvolta anche fra due filamenti.

b

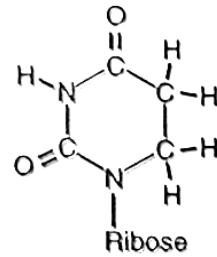


c

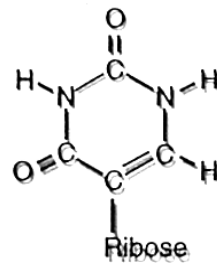




Ribothymidine (T)



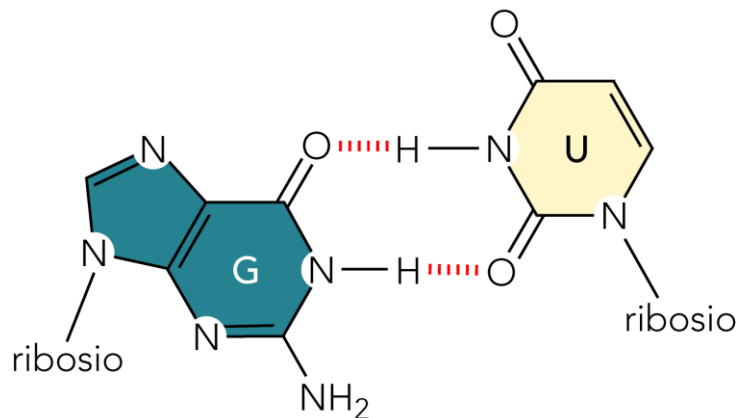
Dihydrouridine (D)



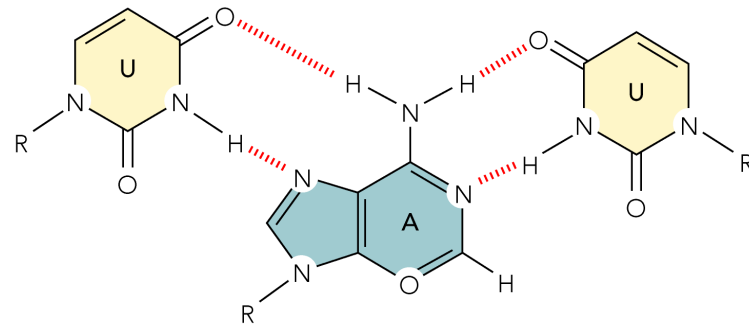
Pseudouridine (ψ)

Fig. 11.34. Three modified nucleosides found in most tRNAs.

L'RNA ha una maggior tendenza a formare accoppiamenti non canonici (diversi da quelli di W-C) rispetto al DNA



G e U possono accoppiarsi con una geometria diversa da quella prevista da W-C, favorendo la formazione di doppie eliche intramolecolari.



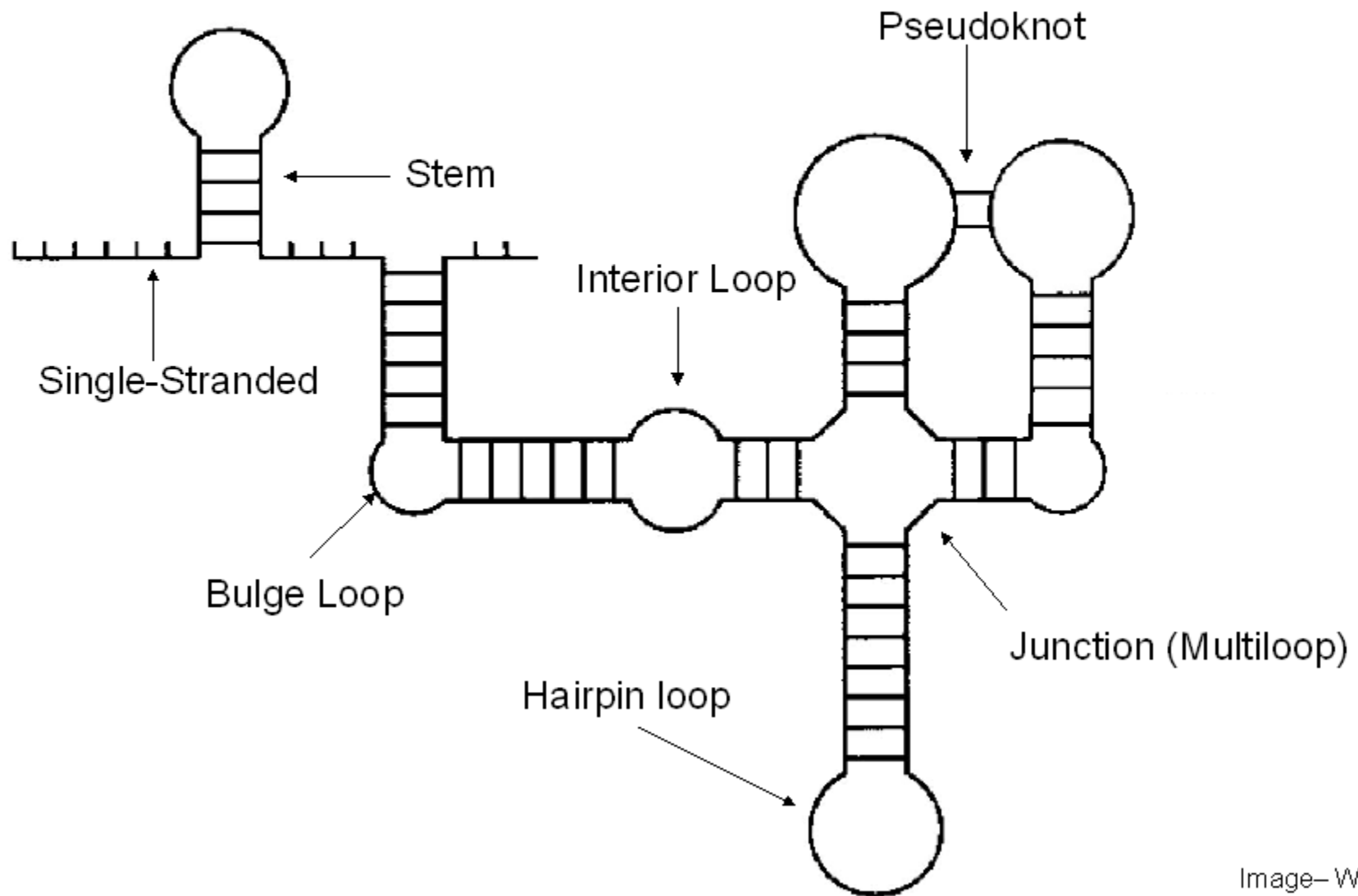
tripletta di basi U:A:U

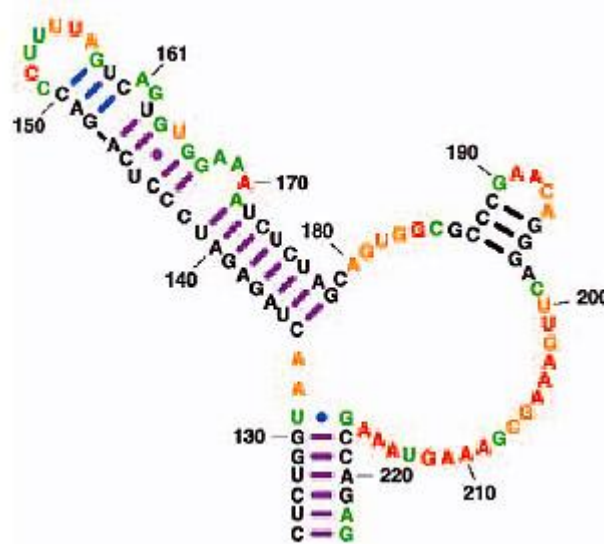
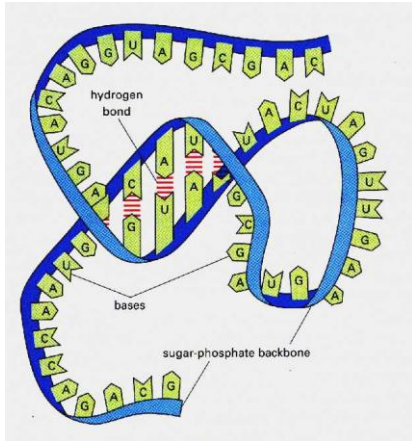
Formazione di strutture 3D complesse

L'RNA, essendo in grado di ripiegarsi su se stesso per rotazione attorno ai legami fosfodiesterici nei tratti non a doppia elica, forma strutture complesse, soprattutto in presenza di basi non convenzionali. Esempi: interazioni fra 3 basi, fra basi e impalcatura (tRNA), o con proteine che neutralizzano le cariche dei fosfati (ribosomi).

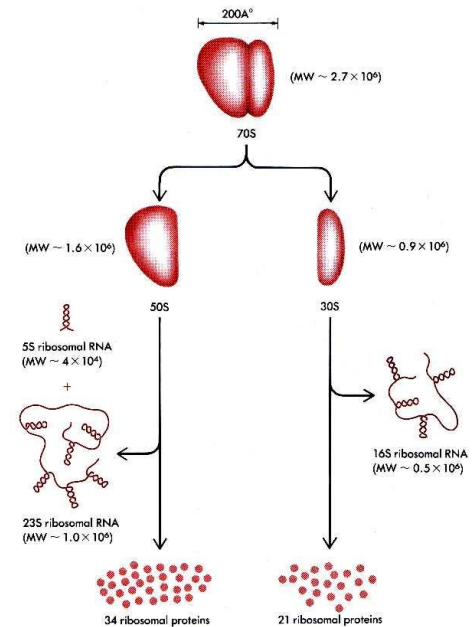
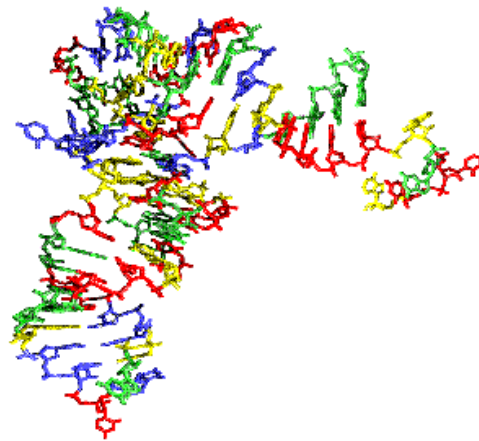
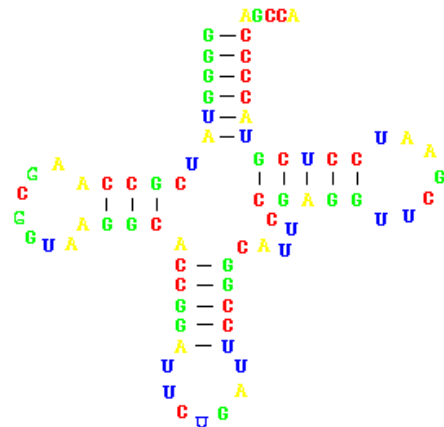
In laboratorio si possono sintetizzare molecole di RNA di una certa lunghezza con una certa sequenza o a sequenza casuale (ad es. con 4 basi si possono formare 4^{20} diversi 20mer!). Fra quest'ultime è possibile selezionare alcune sequenze che presentano particolari proprietà, ad es. affinità per certe piccole molecole (SELEX).

RNA Secondary Structure

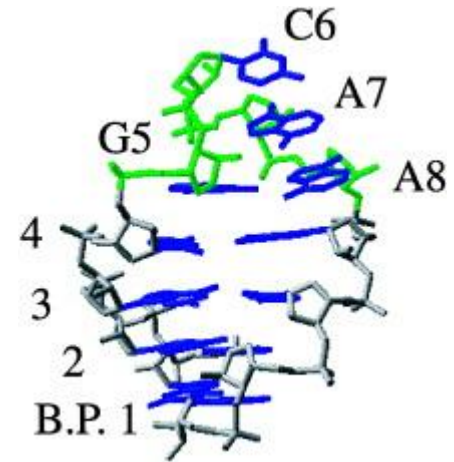
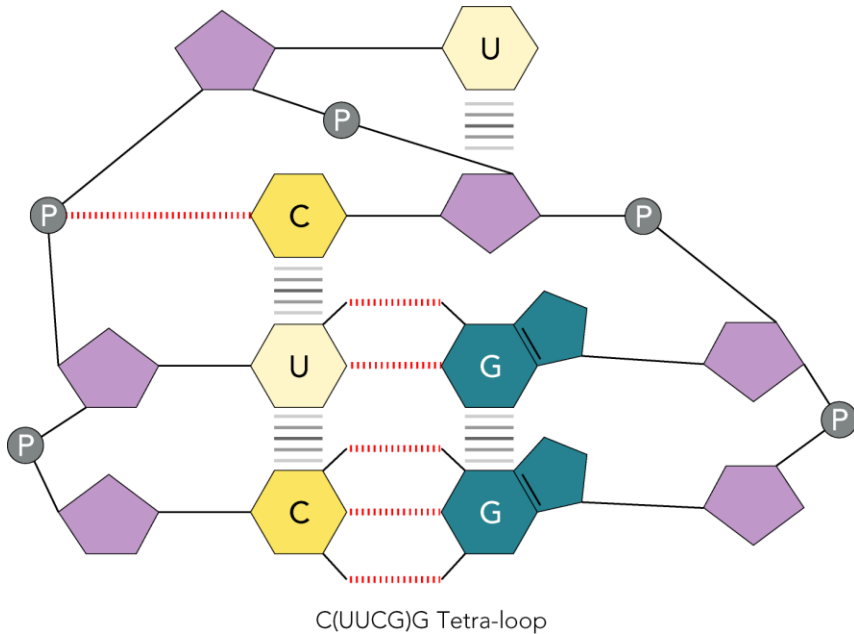




GGGGUATCGCCAAAGCGGUAAAGGCACCGGAUUCUGAUUCCGGCAUCCGAGGUTCGAAUCCUCGUAACCCAGCCCA

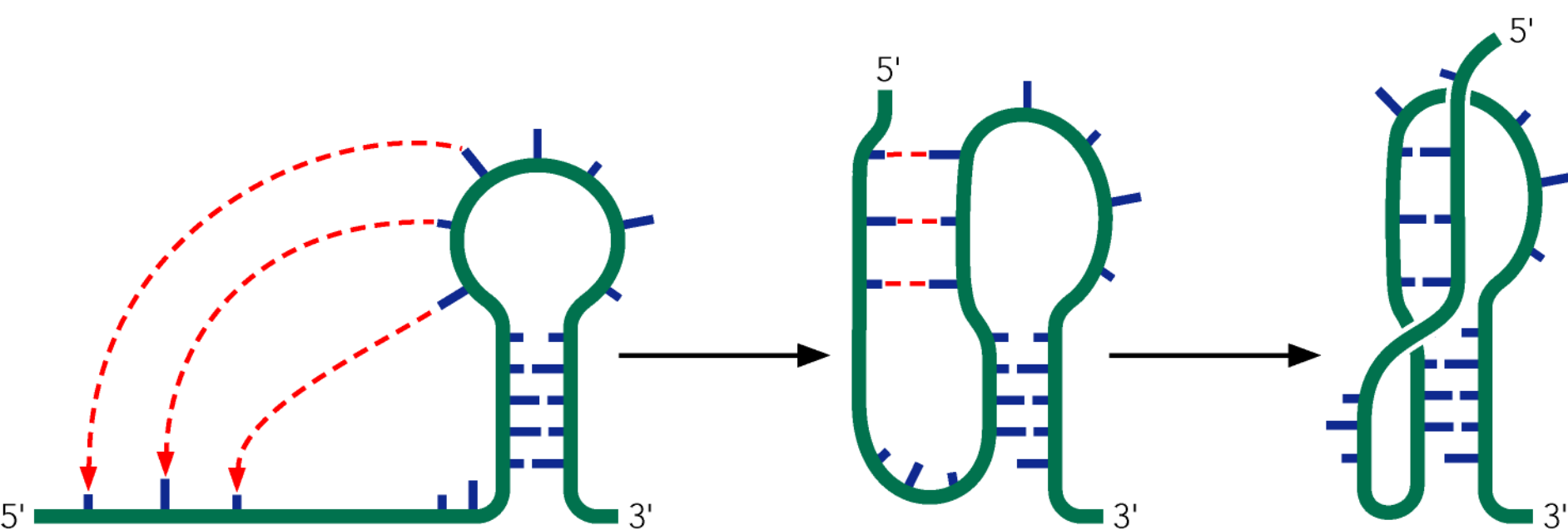


Tetra-loop



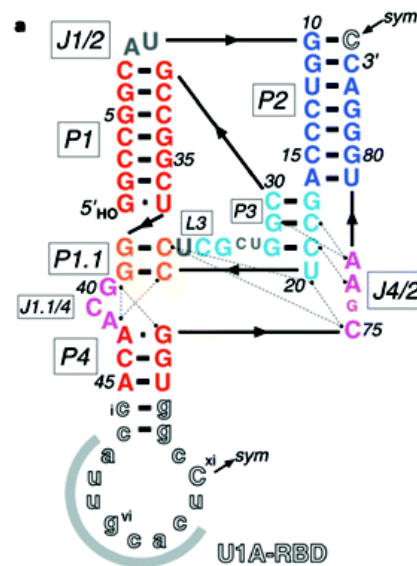
GCAA tetra-loop
(molto comune e stabile)

A volte la stabilità delle strutture a doppia elica dell'RNA è molto > del previsto. Ciò dipende dalle proprietà speciali dei loop, come nel caso di 4 loop di sequenza UUCG, in grado di impilarsi fra loro in un certo modo.



Pseudo-nodi

Si formano per appaiamento di basi fra sequenze complementari non contigue



HDV ribozyme forms a double pseudoknot

Differenze tra le strutture secondarie e terziarie: alcuni esempi

Secondary structures

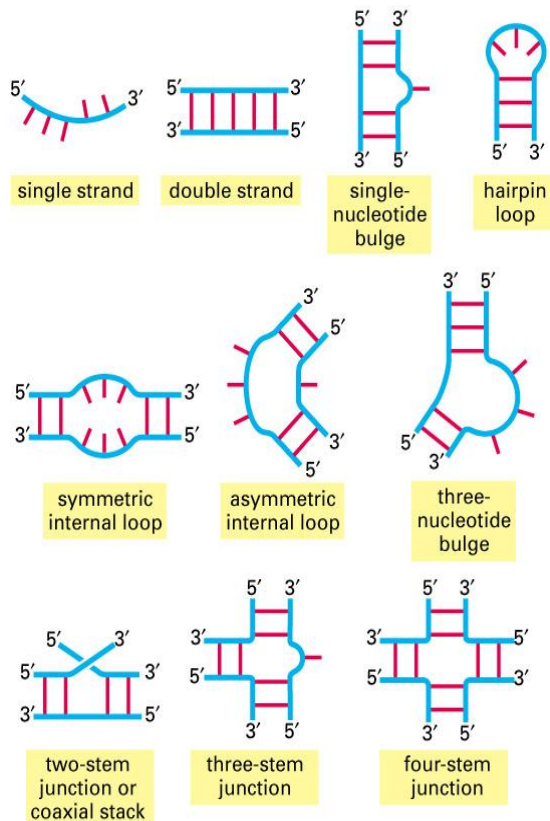


Figure 6-94. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Tertiary structures

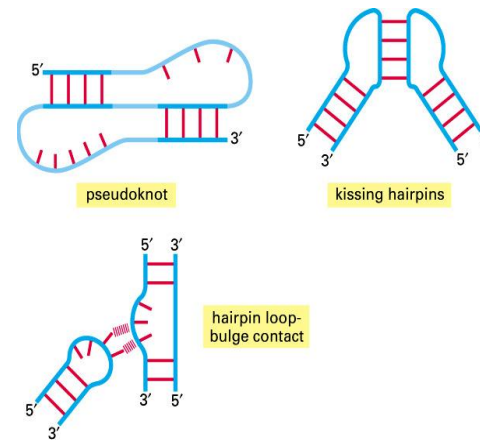


Figure 6-95. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

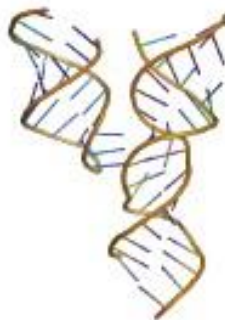
A. RNA structural motifs



Watson-Crick (WC)



kissing-loop



loop-receptor (LR)



three-way junction



pseudoknot

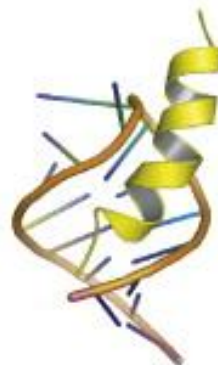
B. RNP interacting motifs



ssRNA



dsRNA



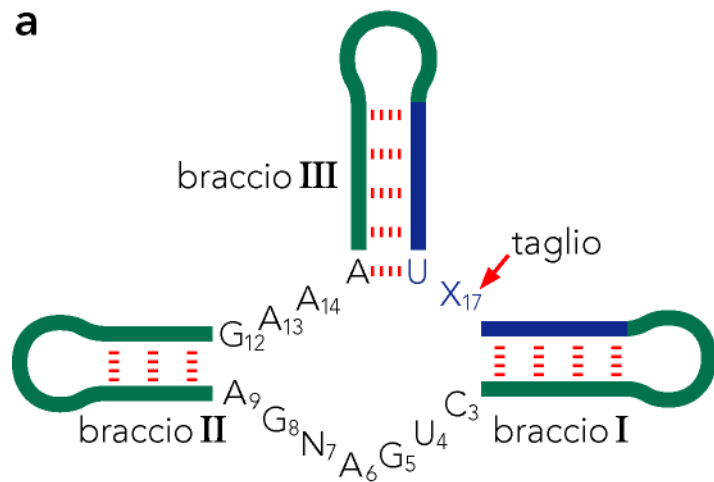
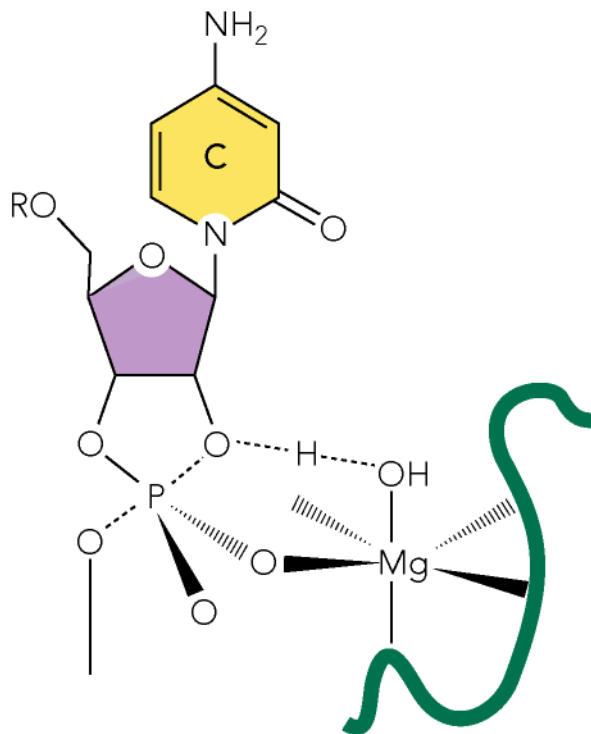
stem-loop



internal-loop



kink-turn

a**b**

I ribozimi

Alcune molecole di RNA sono in grado di assumere particolari strutture 3D capaci di legare substrati e con attività catalitica, simile a quella degli enzimi proteici.

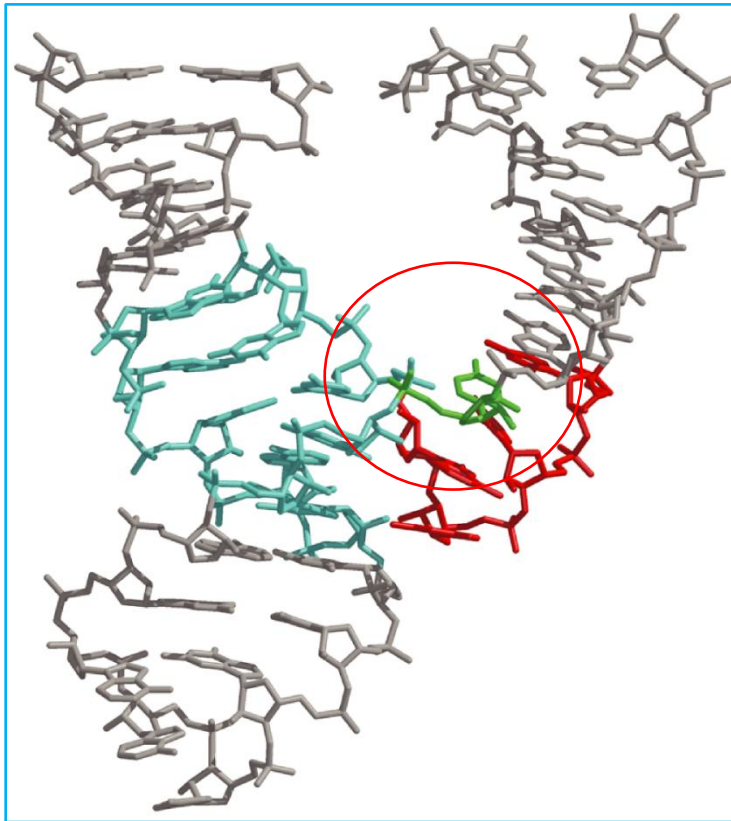
Uno dei primi ribozimi scoperti è la **RNasi P**, coinvolta nella formazione dei tRNA, un complesso di proteine, che legano i precursori, e un RNA, con attività catalitica. L'RNA è in grado di tagliare i substrati anche in assenza di proteine, se sono presenti ioni positivi che neutralizzano i fosfati negativi.

Altri ribozimi possono catalizzare reazioni di trans-esterificazione, necessarie per la rimozione degli introni dai precursori di mRNA, tRNA e rRNA (splicing).

Un ribozima particolare è quello **a testa di martello**

(hammerhead), con struttura II formata da 3 bracci e una zona non appaiata sede dell'attività catalitica (figura).

L'hammerhead ha attività di RNasi, è presente nei viroidi, agenti infettivi delle cellule vegetali, che si propagano per auto-idrolisi di un precursore più lungo, favorita da tratti di RNA vicini al punto di taglio: con l'ausilio di uno ione Mg²⁺ l'OH 2' viene deprotonato, quindi fa un attacco nucleofilo sul fosfato 3', con formazione di un fosfato ciclico 2'-3' e successiva rottura del legame fosfoesterico 3'-5'. L'hammerhead non è un vero enzima perché effettua un solo taglio, ma può essere immaginato come composto da due parti, l'enzima vero e proprio e il substrato.

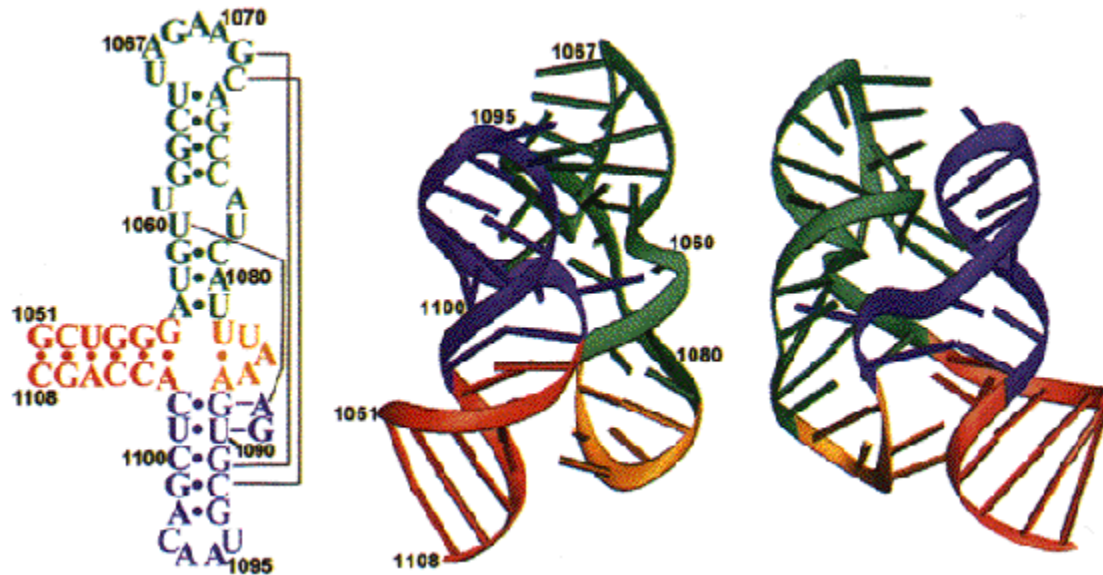


Struttura 3D del ribozima hammerhead

La forma assomiglia a quella di una forcina, **in verde il sito di taglio**.

La scoperta dei ribozimi ha rivoluzionato la visione dell'evoluzione biologica: la vita primordiale sarebbe stata basata sull'RNA, che funzionava sia da materiale genetico che enzimatico. A favore di questa ipotesi è il fatto che la peptidil transferasi, il componente ribosomiale responsabile della formazione dei legami peptidici nella sintesi proteica, è una molecola di RNA. I ribozimi sarebbero pertanto una reliquia di questo mondo di enzimi ad RNA.

A 3D structure: Four-helix junction by base triples. L11 protein binding site in 23S RNA



Le triplete sono stabilizzate da cationi bivalenti

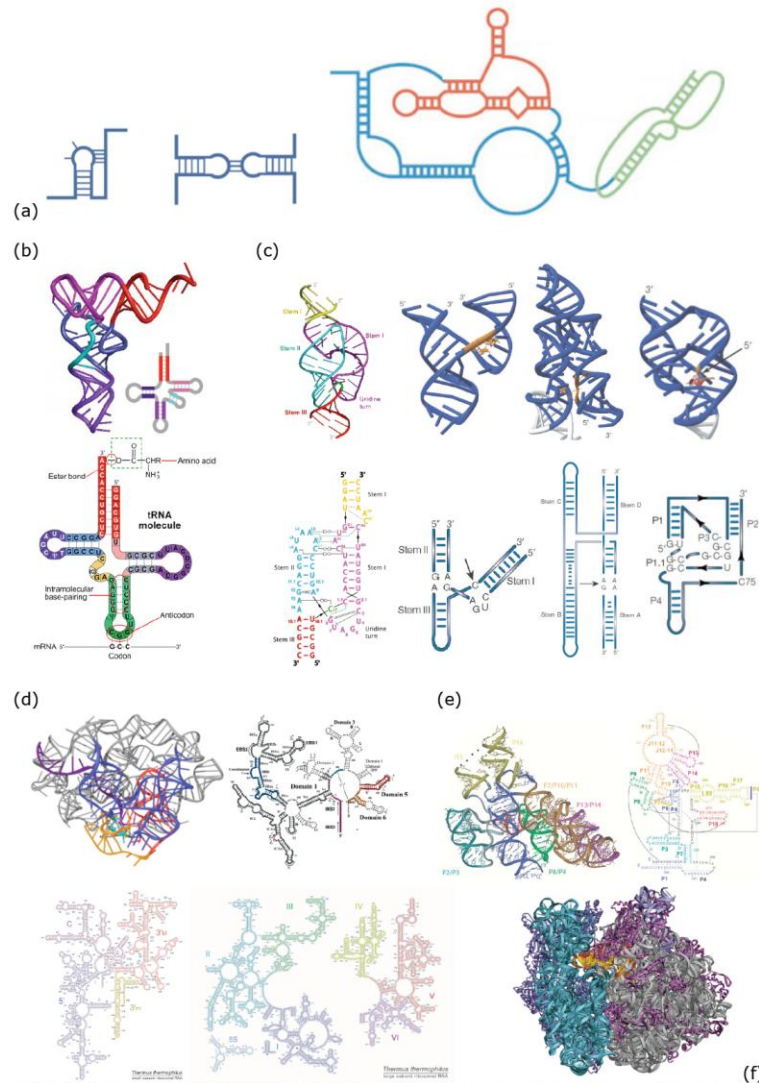
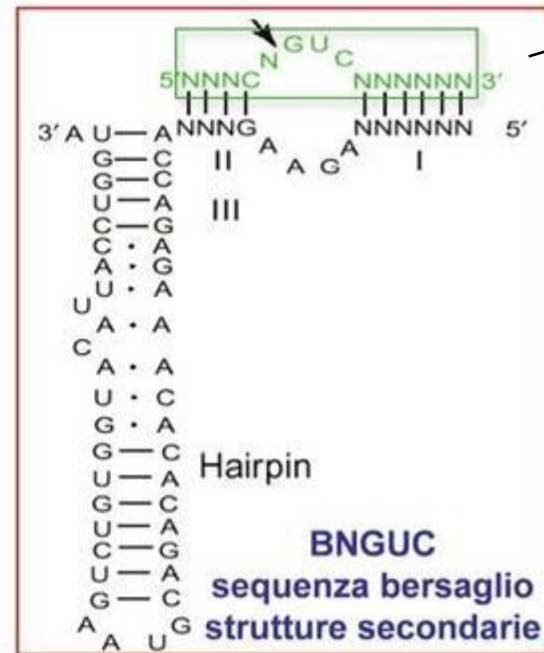
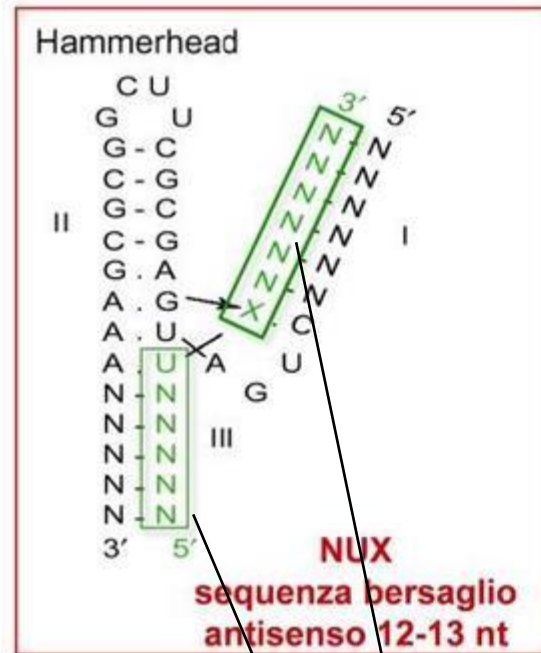


Fig 4.3 (a) Due tipici elementi di struttura terziaria (nell'ordine, *pseudoknot* e *kissing loops*) e un esempio di topologia complessa (b) tRNA (c) ribozimi con funzione di rottura del legame fosfodiester: hammerhead (primi due), hairpin, e il ribozima dell'epatite D (HDV)¹¹ (d) introne con funzione auto-catalitica di *self-splicing* (e) Ribonucleasi P (f) RNA ribosomiale: diagramma delle strutture delle sottunità e struttura del ribosoma.

I Ribozimi possono essere progettati per degradare specifici mRNA



Appaiamento con
mRNA bersaglio

Appaiamento con
mRNA bersaglio

	DNA	RNA
Meccanismi di stabilità-degradazione	Scarsa propensione all'idrolisi della catena Propensione a subire danni dai raggi UV	Alta propensione all'idrolisi della catena Suscettibilità di mutazione di C in U con formazioni di wobble pairs
Denaturazione	Temperatura di denaturazione tra 30 e 110 gradi, dipendentemente da lunghezza e composizione	A parità di lunghezza e composizione, temperatura di denaturazione mediamente più alta di circa 10 gradi
Nucleotidi	Fosfato + desossiribosio + base azotata Adenina Guanina Timina Citosina	Fosfato + ribosio + base azotata Adenina Guanina Uracile Citosina (raramente: Inosina, ribotimina, pseudouridina...)
Basi		
Struttura primaria	Catene molto lunghe, mediamente intorno ai 100 milioni di bp (~3 cm)	Catene relativamente corte, mediamente 20 -100 nucleotidi
Tipo di accoppiamenti tra basi	Principalmente accoppiamenti WC	Accoppiamenti WC, wobble pairs, accoppiamenti di Hoogsteen
Conformazione del backbone	Zucchero in conformazione C2-endo (in BDNA) oppure in C3-endo (in ADNA)	Zucchero in conformazione esclusivamente C3-endo
Eliche	Conformazione principale: B-DNA A bassa idratazione: A-DNA Raramente, Z-DNA	solo A-RNA
Lunghezza di persistenza	~50nm	~60nm
Altri tipi di struttura secondaria	Piccoli tratti di triple o quadruple eliche Giunzioni di Hooleyday	Tratti di elica disaccoppiata, hairpins, bulges, internal loops, giunzioni
Struttura terziaria	Superavvolgimenti	Accoppiamenti estesi tra strutture secondarie tramite base pairing, knot e pseudoknot, eliche triple, accoppiamenti paralleli tra eliche.
Struttura quaternaria	Nucleosomi, elementi di organizzazione strutturale del genoma	Ribosomi, elementi del macchinario cellulare
Tipi principali-organizzazione	DNA codificante e non costituente il genoma, organizzato in cromosomi o plasmidi	mRNA, tRNA, ribozimi e altri tipi di RNA funzionale. RNA ribosomiale (rRNA). RNA codificante in virus
Funzioni	Conservazione e trasmissione dell'informazione genetica Ruoli strutturali (centromeri, telomeri)	Conservazione e trasmissione dell'informazione in alcuni virus. Trasporto dell'informazione all'interno della cellula (mRNA, tRNA). Ruoli funzionali nella duplicazione, trascrizione, traduzione del DNA o di RNA codificante, ruoli enzimatici (ribozimi) o altri ruoli funzionali

Tab 5.1 Caratteristiche e differenze principali tra DNA e RNA

La doppia elica può avvolgersi su sé stessa e cambiare la conformazione del DNA nello spazio

Topologia del DNA

Capire la topologia del DNA e come la cellula possa modificarla a proprio vantaggio è di fondamentale importanza in biologia molecolare.

Concetti chiave

Il DNA è una molecola flessibile, la cui struttura (e dinamica) dipende molto dalla forza ionica e dalla natura delle proteine con cui interagisce.

IL SUPERAVVOLGIMENTO SI FORMA SOLO IN MOLECOLE DI DNA “CHIUSE”

Se la molecola è lineare e con terminali non vincolati, il numero di avvolgimenti di un filamento attorno all'altro può variare per rotazione reciproca.

Se però la molecola è circolare chiusa, o le estremità sono vincolate, es. da interazioni con proteine, il numero di giri di un filamento attorno all'altro non può variare, ossia ha una topologia ben definita.

Il DNA circolare covalentemente chiuso o cccDNA

Oltre al **genoma** della maggior parte dei **procarioti** (dimensioni da 0,5 a 10 Mpb circa) il cccDNA si riscontra in vari altri casi, di minori dimensioni:

- **Plasmidi batterici**, piccoli DNA accessori (da 3 a qualche decina di kpb) recanti uno o pochi geni non essenziali ma a volte utili al batterio
- **Alcuni batteriofagi e alcuni virus** (di dimensioni simili a quelle dei plasmidi), nella forma incapsidata e/o dentro la cellula infettata
- **DNA mitocondriale e DNA cloroplastico** (dimensioni dell'ordine di 10^4 - 10^5 pb)

Inoltre va considerato che anche nel caso del DNA lineare dei cromosomi eucariotici la sua organizzazione ad anse, legate alla base da complessi di proteine dello “scaffale” (o “matrice”), rende ogni ansa paragonabile a un cccDNA dal punto di vista della topologia.

Concetti chiave

Una molecola di DNA chiusa ha un proprio numero di legame (L)
E' il numero delle volte che un filamento si incrocia con l'altro.

In particolare, il numero di legame è determinato dal numero di giri completi o twist (T) e dai superavvolgimenti o writhe (W):

$$L=T+W$$

T è una proprietà intrinseca del DNA in quanto è il numero di volte che un filamento passa sull'altro (numero totale di giri della doppia elica) e quindi è determinato dal numero di coppie di basi per giro (DNA B=10,5 circa)
W rappresenta l'avvolgimento della doppia elica nello spazio.

Il cambiamento topologico del DNA è fondamentale per le sue funzioni (replicazione e trascrizione)

Si può cambiare L solo rompendo e riformando dei legami nello scheletro del DNA.

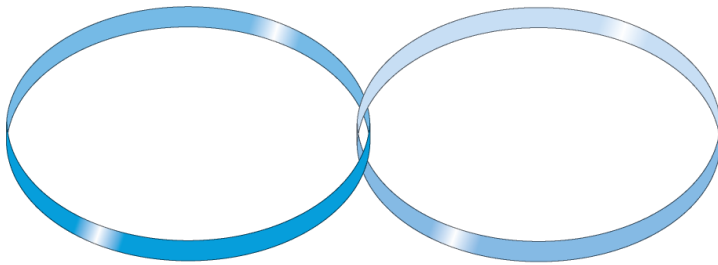
Concetti chiave

Dal punto di vista termodinamico:

- 1) La molecola superavvolta ha maggior energia di quella rilassata;
- 2) Il superavvolgimento consente di immagazzinare energia: 1 superavvolgimento negativo di 200 bp= ~ 9 Kcal/mole;
- 3) L'energia del superavvolgimento può essere utilizzata per denaturare brevi tratti di DNA

IL NUMERO DI LEGAME LK

IL NUMERO DI VOLTE CHE UN FILAMENTO DEVE ESSERE PASSATO ATTRAVERSO L'ALTRO AFFINCHÉ LE DUE CATENE POSSANO SEPARARSI O AVVITARSI L'UNA DALL'ALTRA

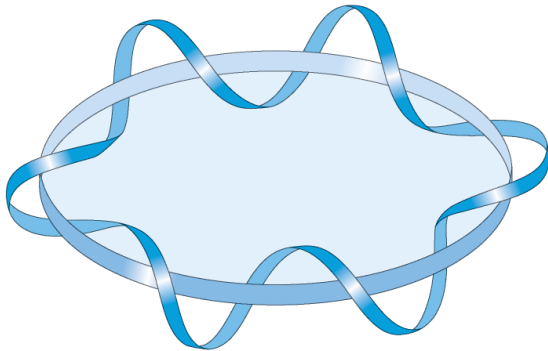


(a) $Lk = 1$

Specifica rigorosamente il numero dei giri dell'elica in un DNA circolare chiuso in assenza di superavvolgimento

Lk è una proprietà topologica del DNA

non varia quando la doppia elica subisce qualunque tipo di torsione o deformazione



(b) $Lk = 6$

Varia solo se una delle catene di DNA si interrompe

Linking number Lk : numero di volte che un filamento deve essere passato attraverso l'altro per separare le due catene

Twist number Tw : numero di volte che un filamento gira intorno all'altro

Writhe number Wr : numero di incroci dell'asse longitudinale

$$Lk = Tw + Wr$$

Questa equazione descrive le possibili conformazioni del DNA nello spazio tridimensionale

Il numero di legame (*linking number*) **L** ha due componenti:

il numero di *twisting* o di avvolgimento (**T= torsione**) e

il numero di *writhing* o di superavvolgimento (**W=contorsione**).

$$Lk = Tw + Wr$$

Il numero di *twisting*, **T**, rappresenta il numero di volte che un filamento gira intorno all'altro

Per una molecola di DNA circolare chiusa e rilassata, giacente su un piano,
T è dato dal numero totale delle coppie di basi diviso per il numero di coppie di basi per giro (**10,5**)

$$T = Lk$$

Il numero di *writhing*, **W**, rappresenta il numero di incroci dell'asse del *duplex* nello spazio e su se stesso. E' pertanto il numero di volte che l'asse centrale della doppia elica incontra se stesso formando superavvolgimenti

Corrisponde al concetto intuitivo di superavvolgimento

Per una molecola di DNA circolare chiusa e rilassata, $W = 0$

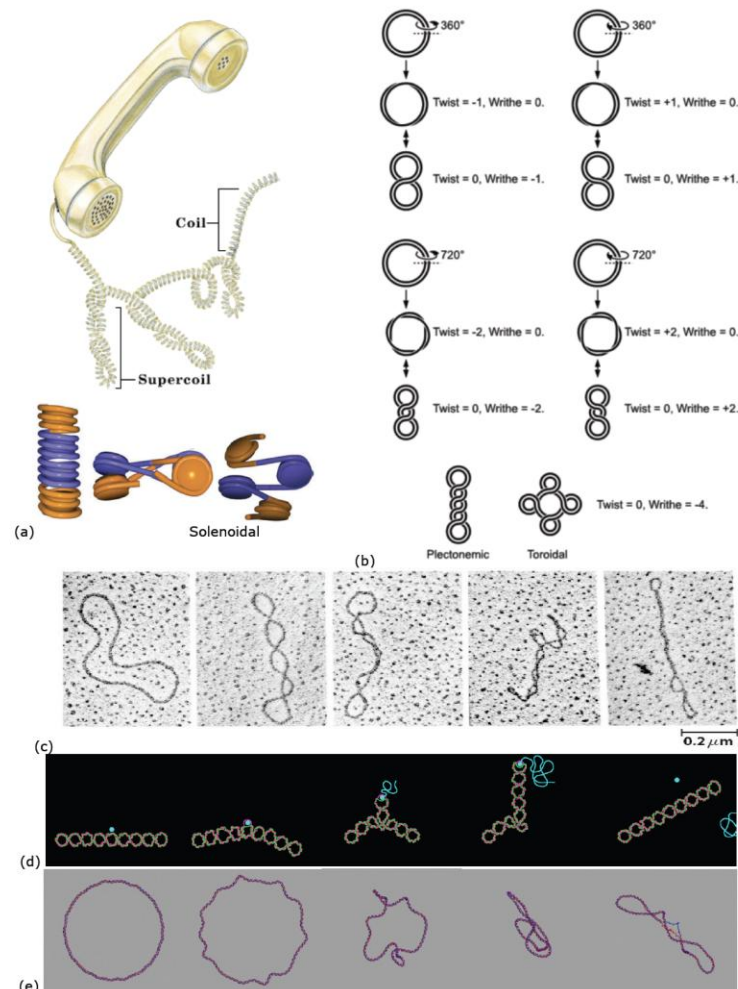
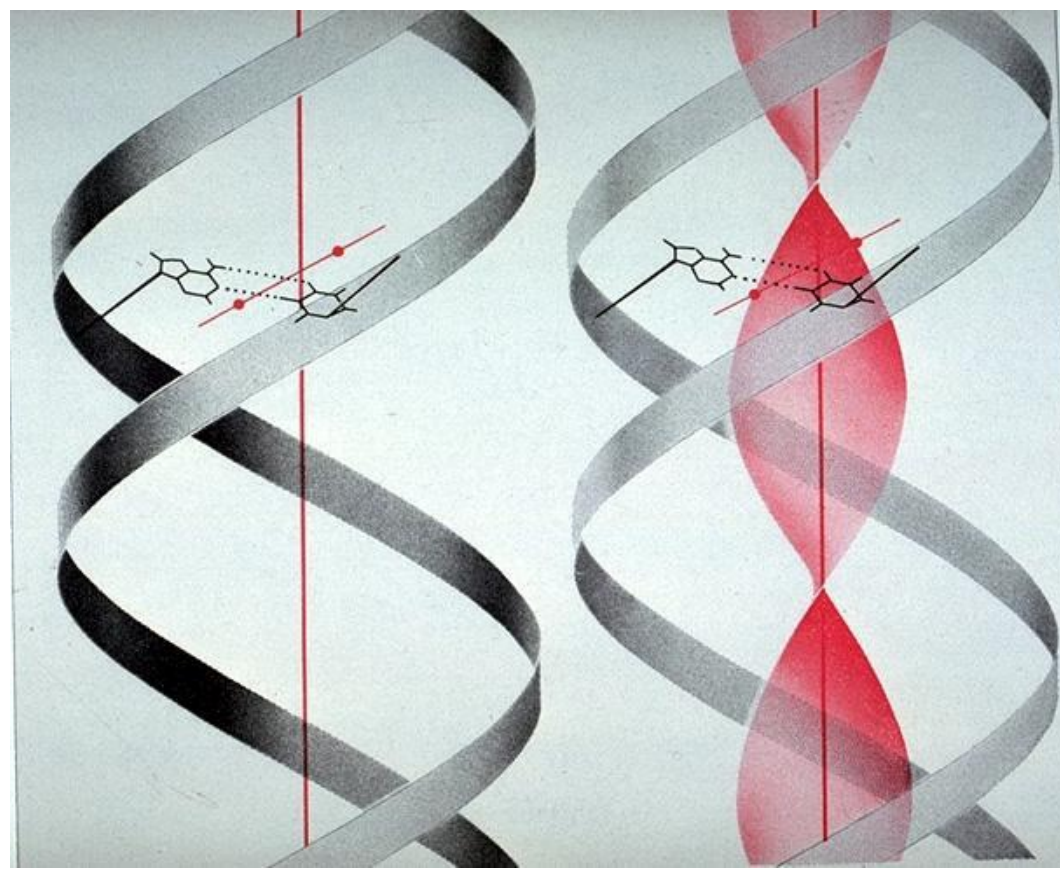
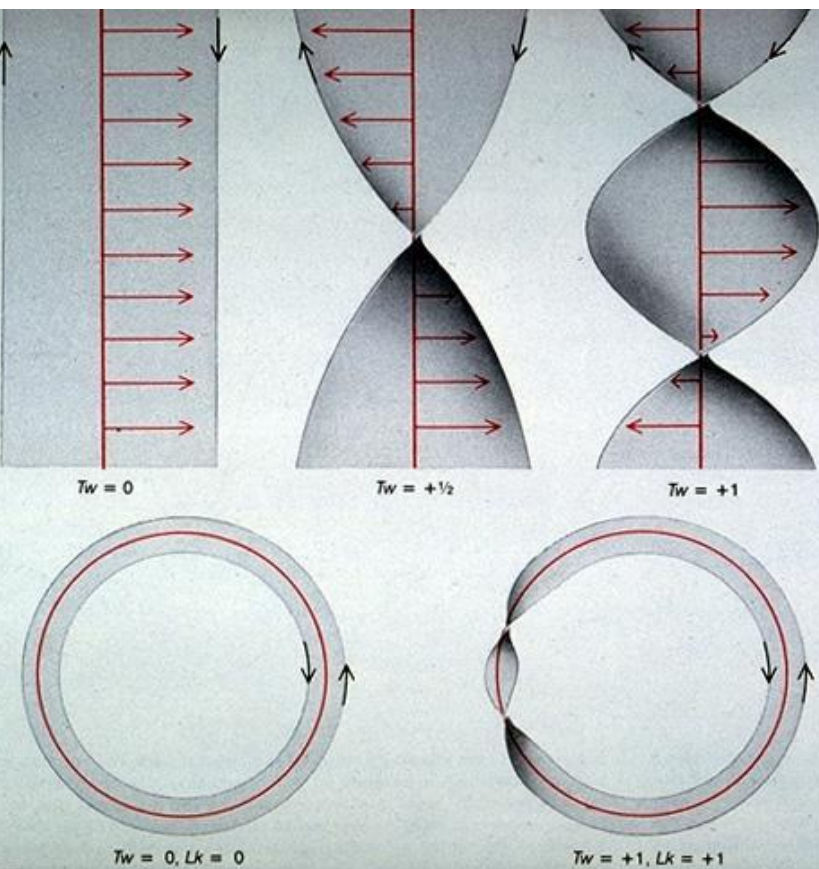
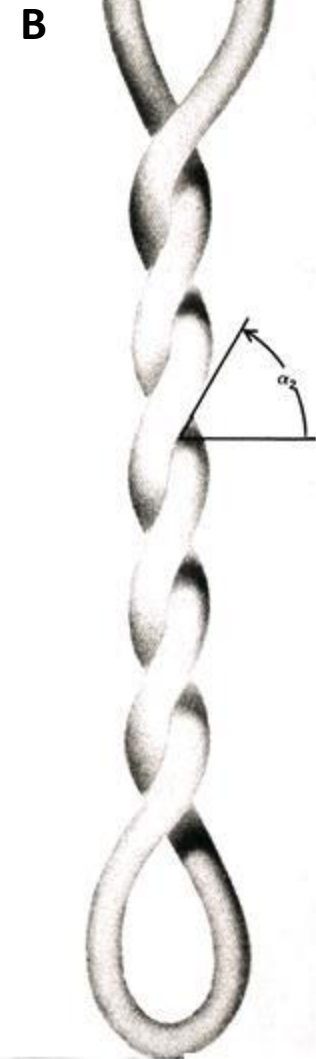
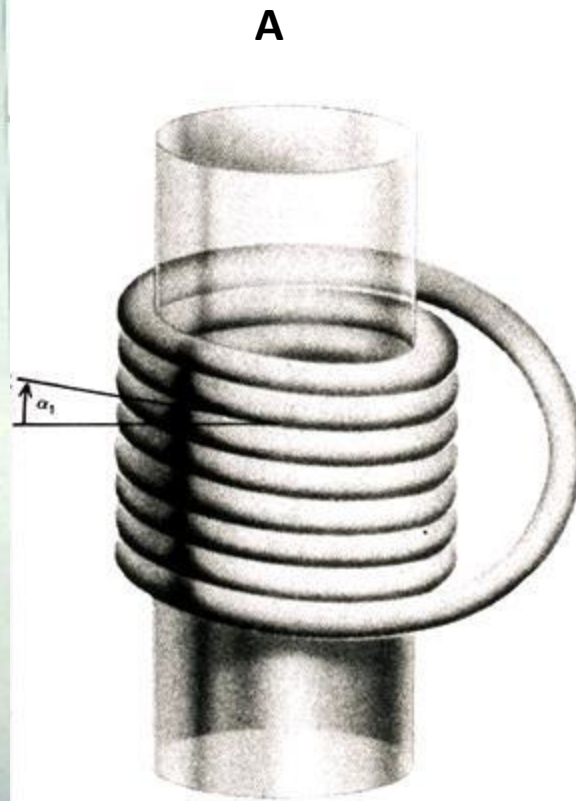
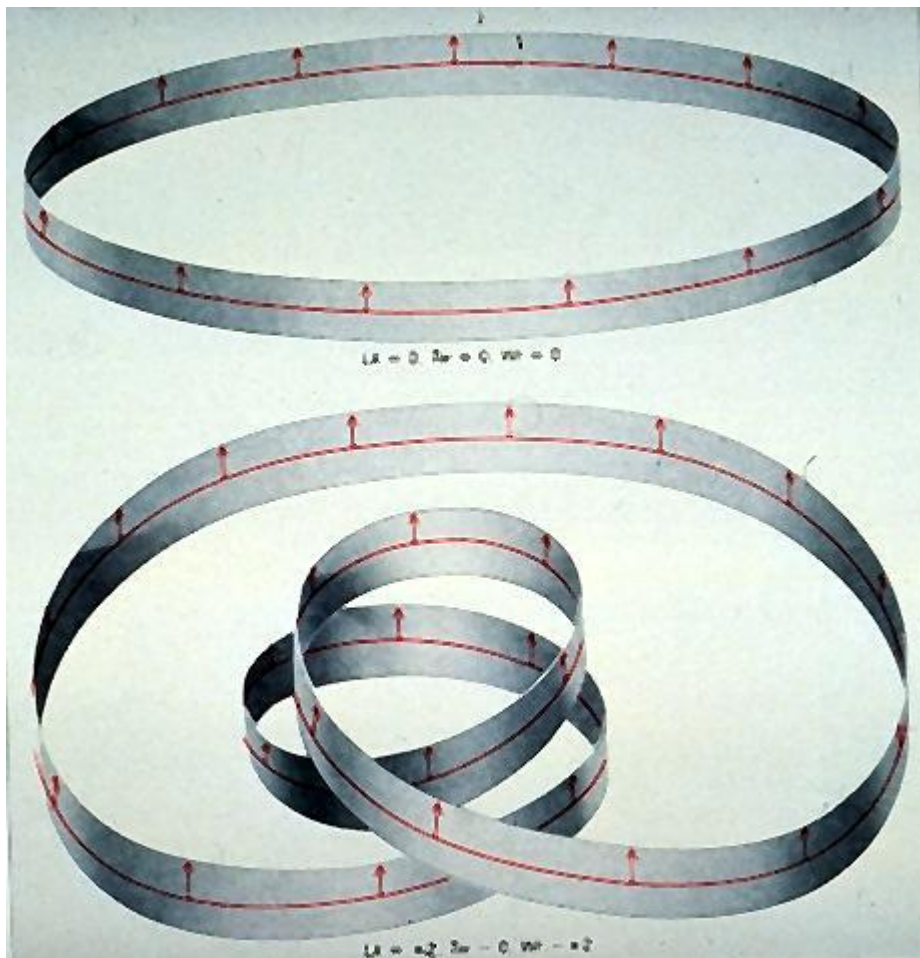


Fig 4.1 (a) Illustrazione del concetto di superavvolgimento con il filo del telefono. (b) Esempi di combinazioni di twist e writhe e tipi di superavvolgimenti (c) micrografia di un plasmide planare e superavvolto (d) Modello dell'azione di una polimerasi su un plasmide superavvolto (e) supercoiling e denaturazione locale di un plasmide di circa 900bp con $\sigma = -0.06^9$.



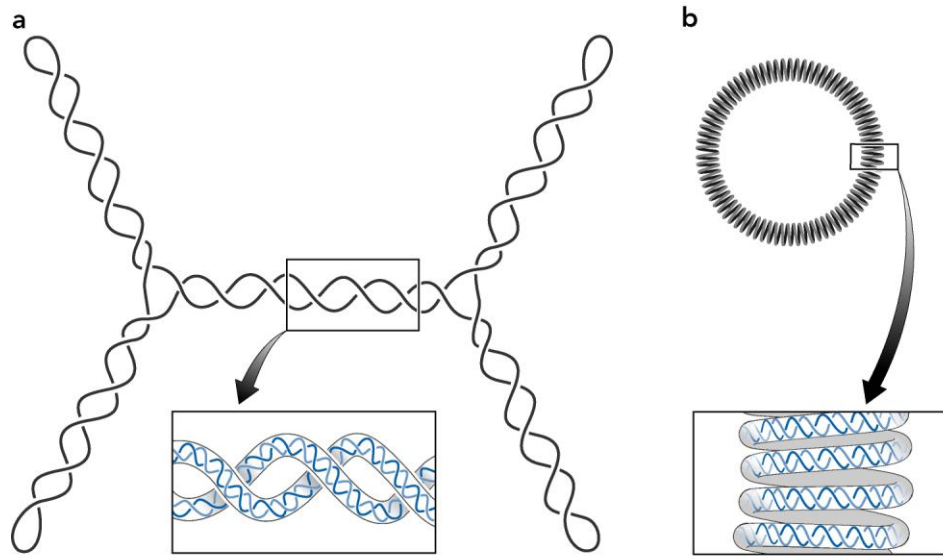
Il **Twist** (TORSIONE) è il numero di angoli giri (360) che i due filamenti complementari del duplex effettuano l'uno attorno all'altro lungo l'asse dell'elica. Il passo della doppia elica non vincolata (assenza di stress torsionale, condizioni di soluzione simili a quelle fisiologiche), determinato quindi dalla minimizzazione dell'energia libera locale, è di circa 10,5 coppie di basi per giro. Tale valore può essere modificato da stress torsionale solo di poco e con dispendio energetico, essendo la costante torsionale del DNA duplex alquanto elevata. Infatti T non tende a cambiare a meno che non intervengano limitazioni imposte (es. legame con proteine)



Il **Writhe** (CONTORSIONE o superavvolgimento) è determinato dal grado di curvatura dell'asse della doppia elica imposto dai vincoli topologici.

Il duplex di DNA è relativamente flessibile e deviare il suo asse dalla linea retta, normalmente (ma non sempre) situazione di minima energia locale, non costa eccessivo dispendio di energia.

Vi sono due tipi di super-avvolgimento: **A**) solenoidale (o toroidale) **B**) plectonemico.



Tw e Wr

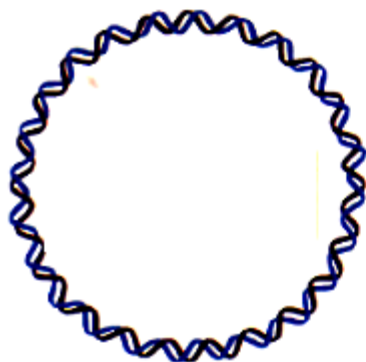
Wr descrive il superavvolgimento, che può presentarsi in due forme: **plectonemico** (l'asse della doppia elica è avvolto su se stesso) o **toroidale** (l'asse è avvolto attorno ad un cilindro, come in un solenoide).

La forma plectonemica si ha col DNA è libero in soluzione, la forma toroidale si ha per interazione con una proteina.

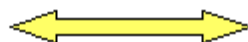
Wr è dato dal n. di incroci dell'asse della doppia elica su se stesso ovvero dal n. di spirali.

Incroci e spirali sono topologicamente equivalenti e geometricamente interconvertibili.

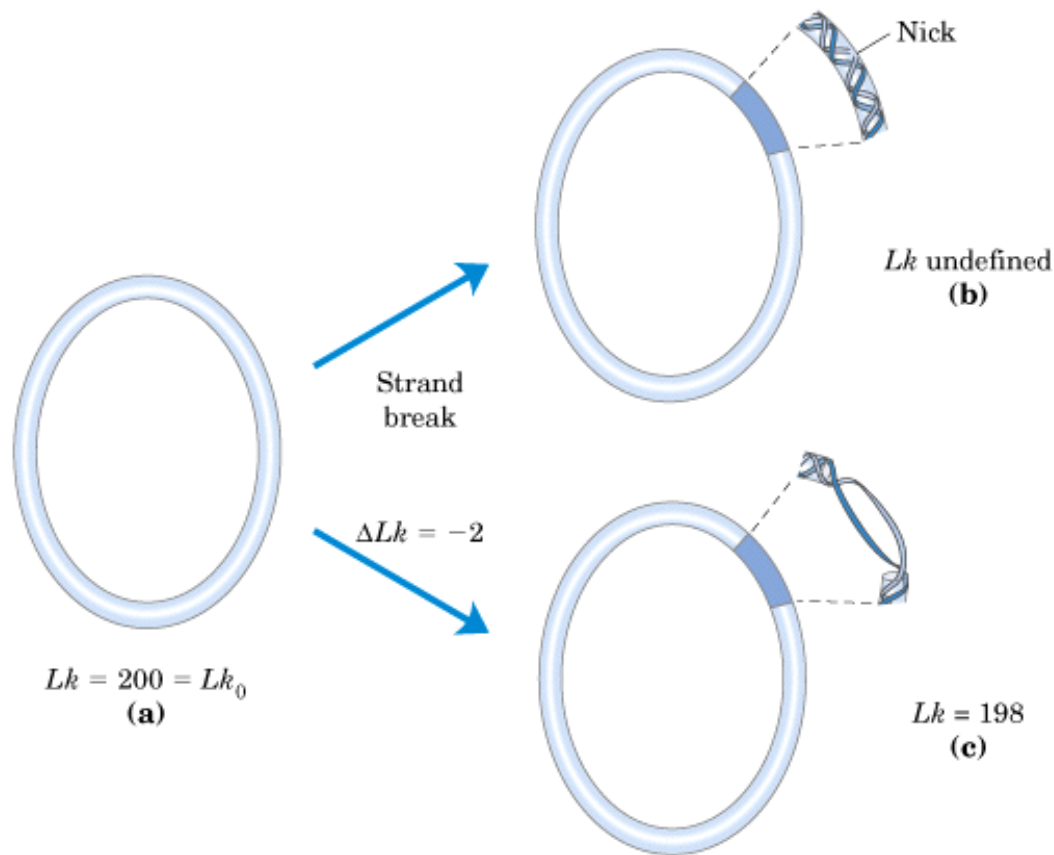
Una molecola di ccc DNA può essere deformata in vari modi, senza rottura dei legami covalenti, con cambiamenti di Tw e di Wr, ma **non di Lk**, rispettando la relazione topologica fondamentale: $Lk = Tw + Wr$.



DNA circolare con
superavvolgimento = 0



DNA superavvolto
negativamente



Se $Wr=0$ il DNA è rilassato e quindi $Lk=Tw$ ed è definito L_0

I cambiamenti dello stato topologico di uno stesso DNA (topoisomeri) sono espressi da:

$$\Delta L = Lk - Lk_0.$$

Per paragonare il grado di superelicità di DNA di grandezza diversa si usa la formula della densità di superelica che è: $\sigma = Lk/Lk_0$.

In natura le molecole di DNA dei procarioti ed eucarioti hanno $\sigma = -0,05, -0,06$



Relaxed DNA
 $Lk = 200$

$\Delta Lk = -2$



Negative
supercoils
 $Lk = 198$



$\Delta Lk = +2$



Positive
supercoils
 $Lk = 202$

Superavvolgimento del DNA

Positivo = DNA superspiralizzato

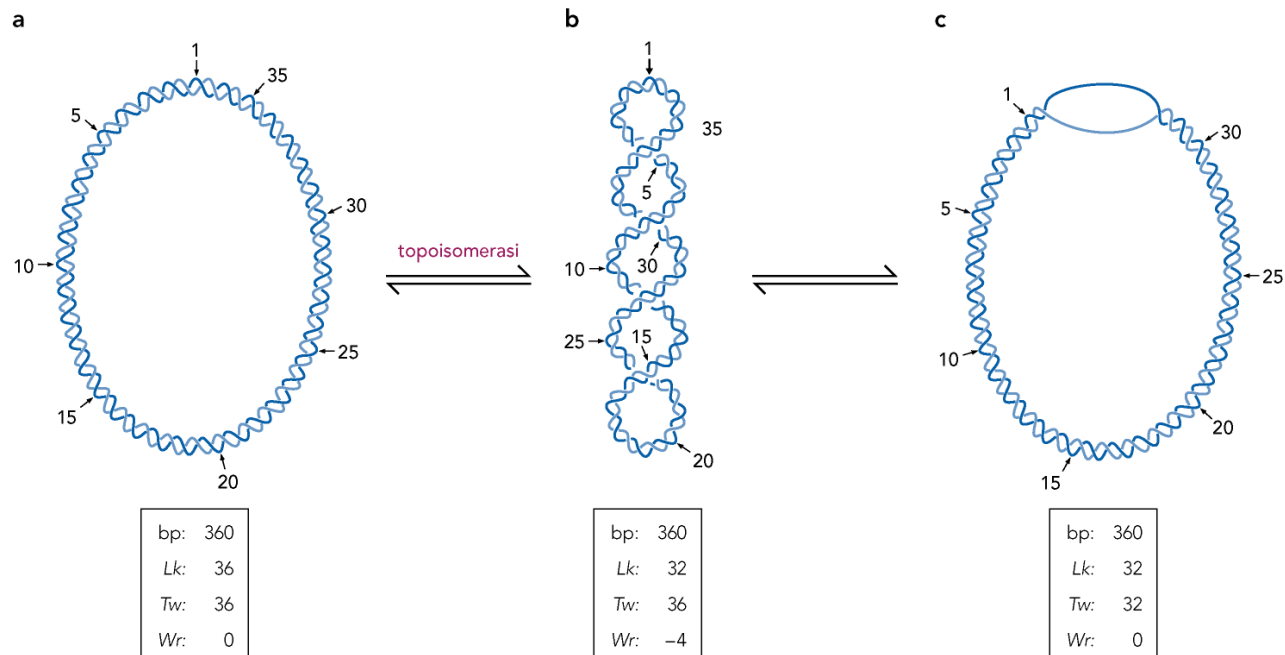
Negativo = DNA sottospiralizzato

Il superavvolgimento negativo contiene E libera e quindi favorisce la modulazione del DNA. Una molecola di DNA con superavvolgimenti negativi tende a scaricare l'E libera della tensione torsionale arrotolandosi in senso opposto e in questo modo, la molecola superavvolta ha un eccesso di E libera che può essere usata per fare al DNA transizioni strutturali che servono a alla modulazione delle sue funzioni (replicazione e trascrizione) e che in sostanza sono denaturazioni locali della doppia elica.

Ogni giro di superelica può essere riassorbito dalla denaturazione di circa 10 bp.

Inoltre la superelica facilita anche la formazione delle strutture cruciformi, la transizione da struttura B a Z.

Il superavvolgimento positivo invece sfavorisce la denaturazione locale del DNA.



Proprietà topologiche del DNA circolare covalentemente chiuso (ccc DNA)

I due filamenti non possono essere separati, se non per rottura di almeno un legame fosfodiesterico.

Il n. di volte che un filamento passa attraverso l'altro è una proprietà topologica invariante del ccc DNA, detta **numero di legame Lk**, indipendente dalla geometria.

Lk è sempre un numero intero, somma di due componenti geometriche, il **numero di twist Tw** e il **numero di writhe**

Wr: $Lk = Tw + Wr$

Tw è il n. di giri di un filamento attorno all'altro, è uguale a Lk se la molecola di DNA è planare (positivo se l'elica è destrorsa, negativo se sinistrorsa).

Wr è invece il n. di superavvolgimenti della doppia elica, che si ottiene quando l'asse della doppia elica si ripiega su se stesso.

I cccDNA cellulari non sono di norma planari ma assumono svariate forme tridimensionali.

Il Lk di un ccc DNA senza superavvolgimenti ($Wr=0$), cioè in forma rilassata con 10.5 bp per giro, è indicato con $Lk^0 = (n. \text{ bp})/10.5$.

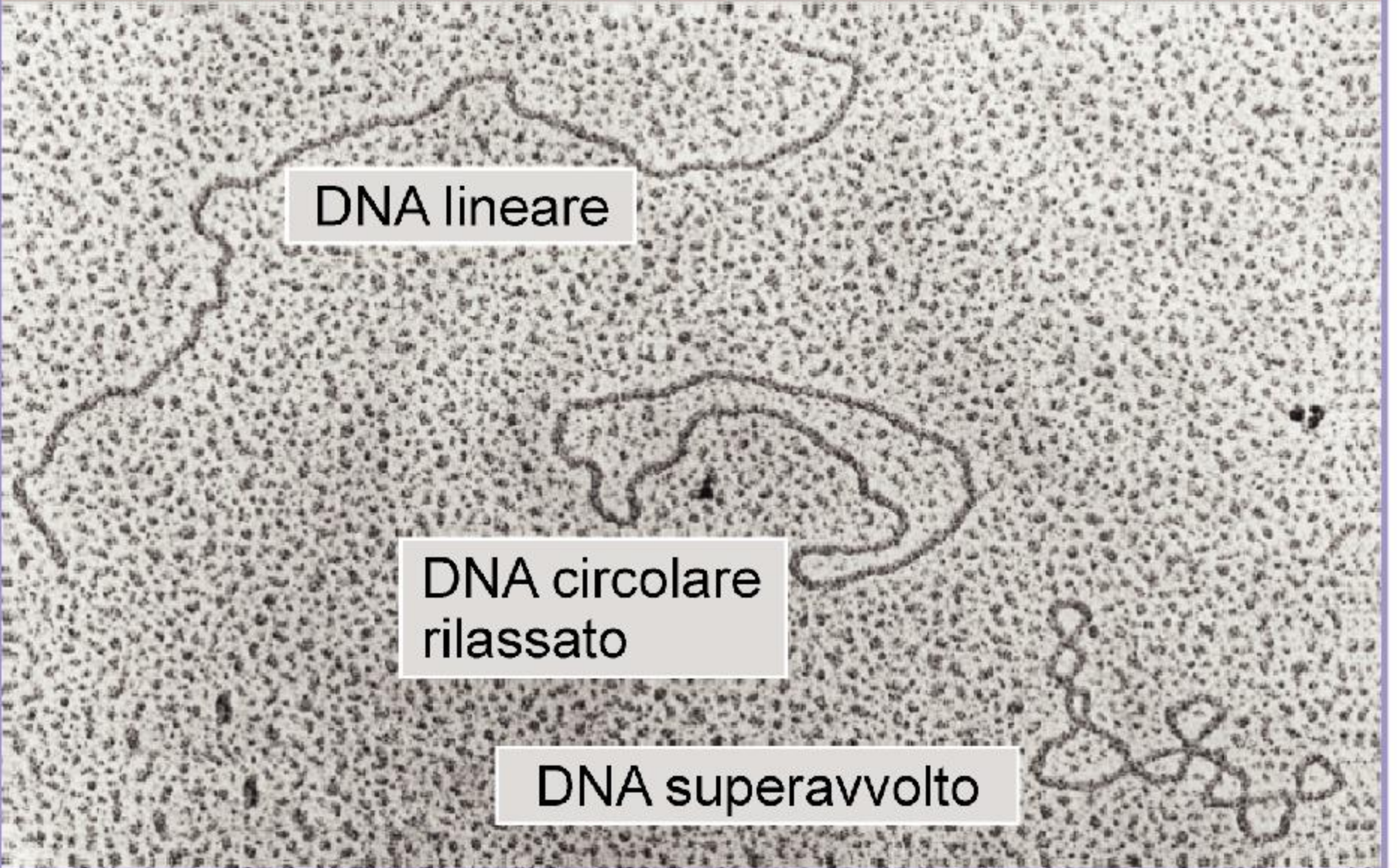
$$Lk = Tw + Wr$$

Convenzionalmente si considera positivo il Twist destrorso, cioè quello della normale doppia elica B-DNA, e quindi positivo l' Lk^0 corrispondente (cioè quando $Wr = 0$, cccDNA rilassato).

Ne consegue che il superavvolgimento Wr può essere positivo o negativo a seconda che Lk sia maggiore o minore di Tw .

Il cccDNA cellulare tende a essere mantenuto dalla girasi a valori di Lk minori di Tw , per cui il superavvolgimento è usualmente negativo, tale cioè da favorire (=essere alleviato da) una “denaturazione” locale della doppia elica, evento presupposto per i processi cui il DNA è sottoposto *in vivo*: la sua replicazione e la trascrizione in RNA.

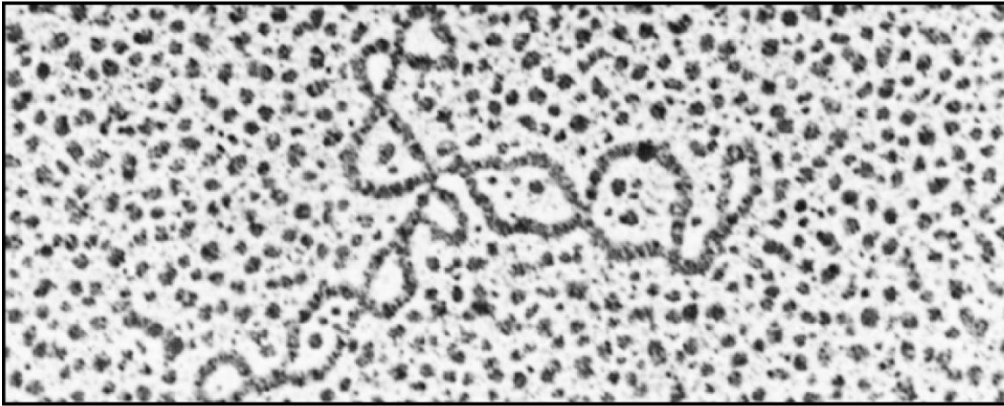
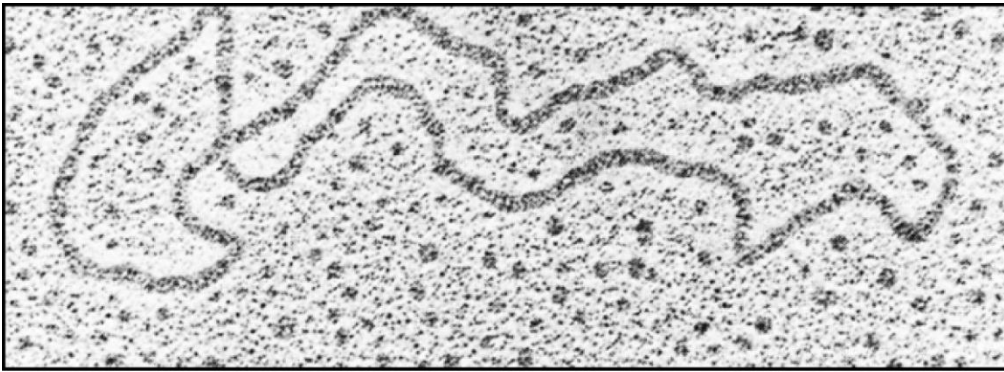
Il DNA circolare può essere superavvolto

An electron micrograph showing three distinct DNA molecules against a grainy, light gray background. The molecules are dark, thread-like structures. One molecule is a long, relatively straight line. Another is a circular loop. The third is a highly compact, tangled structure.

DNA lineare

DNA circolare
rilassato

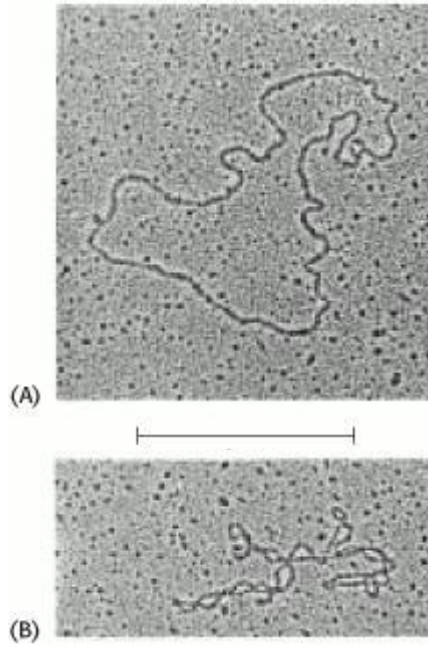
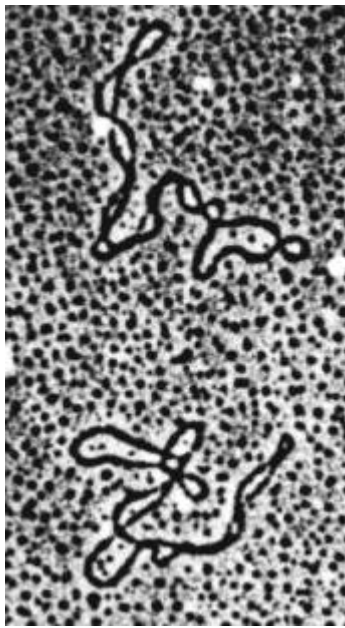
DNA superavvolto



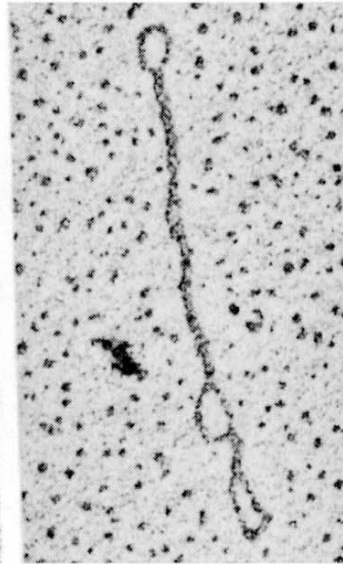
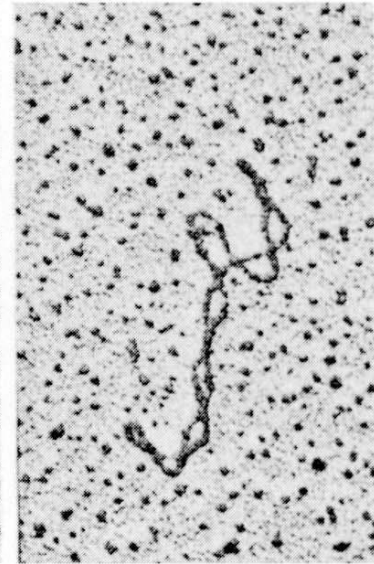
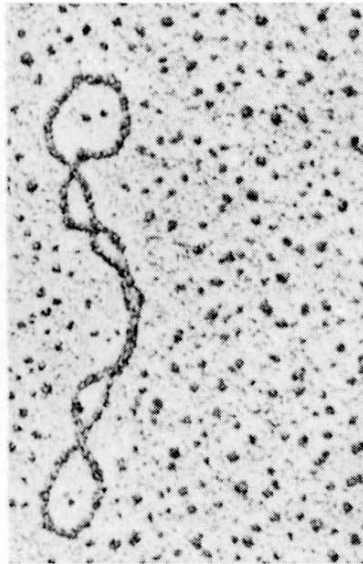
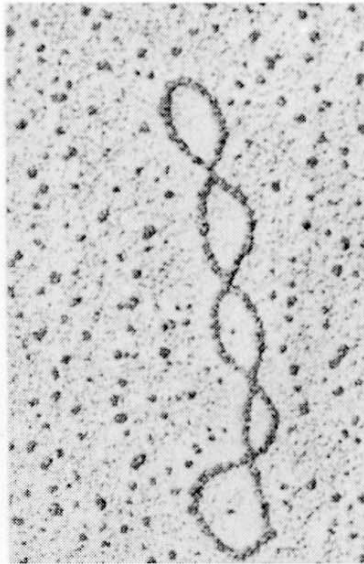
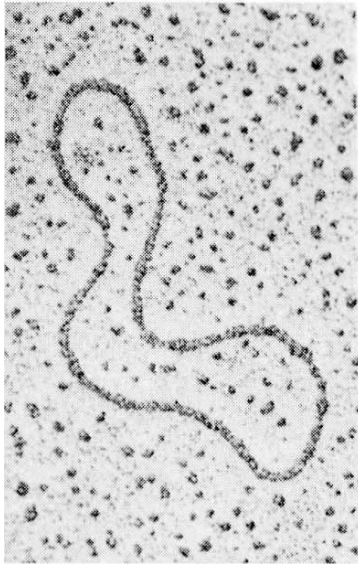
ME di DNA rilassato e superavvolto di un fago

Il DNA intatto isolato da batteri ed eucarioti è superavvolto negativamente.

Negli eucarioti, il superavvolgimento deriva dall'avvolgimento a spirale del DNA attorno agli istoni (nucleosomi), con formazione di una superelica sinistrorsa.



**Electron micrographs of
mitochondrial cccDNA**
(A) Relaxed form.
(B) Supercoiled form.



Electron micrographs by Laurien Polder. From Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication (2nd ed.), p. 36, W.H. Freeman (1992). Used with permission

Increasing levels of supercoiling

Enzimi che alterano la topologia del DNA

Topoisomerasi: tipo I

tipo II (girasi)

TOPOISOMERASI

Si suddividono in due classi:

Tipo I cambiano la topologia del DNA producendo una rottura transitoria e risaldando un singolo filamento del DNA

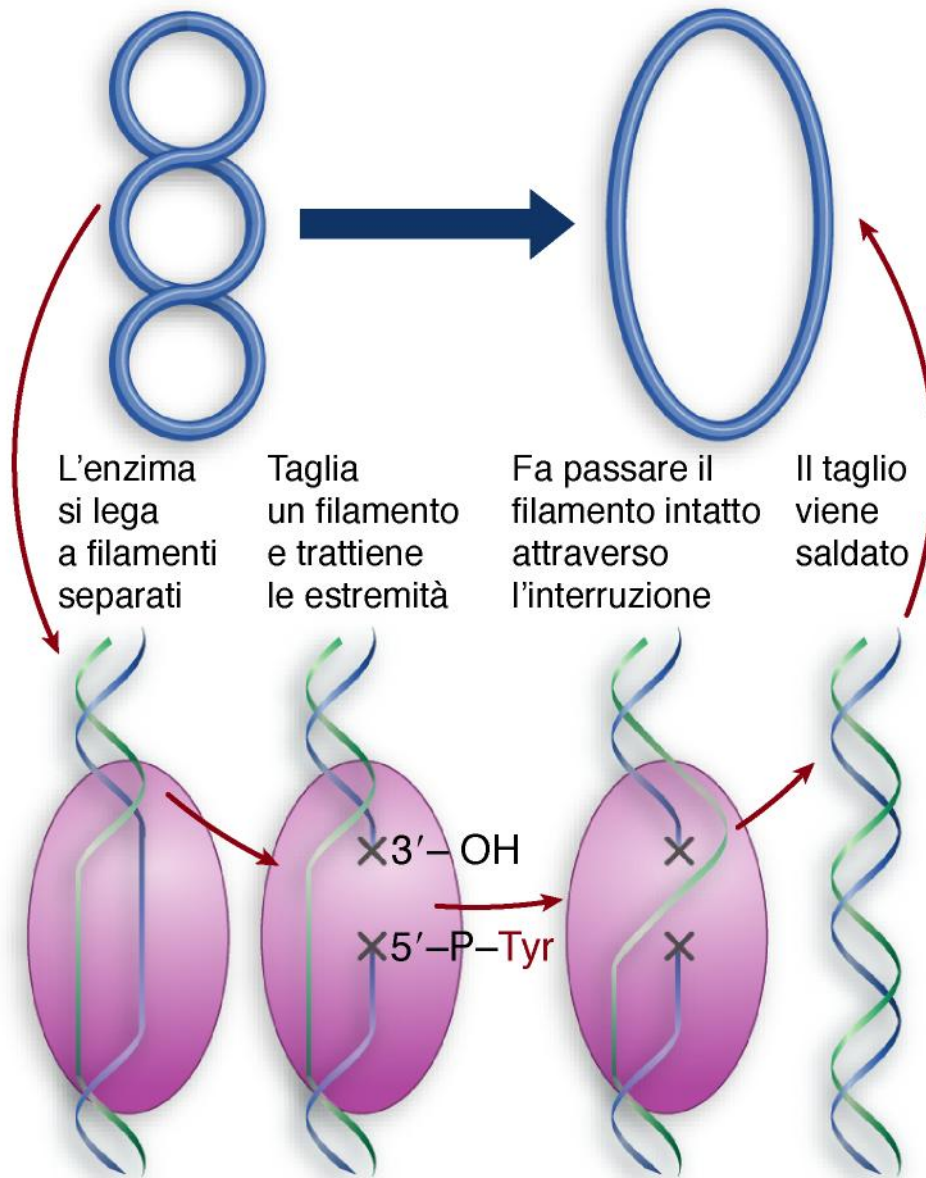
Tipo II cambiano la topologia del DNA producendo una rottura transitoria e risaldando entrambi i filamenti del DNA

In *E.coli* ci sono 4 topoisomerasi differenti:

Le DNA topoisomerasi I e III sono di tipo I

Le DNA topoisomerasi II (girasi) e IV sono di tipo II

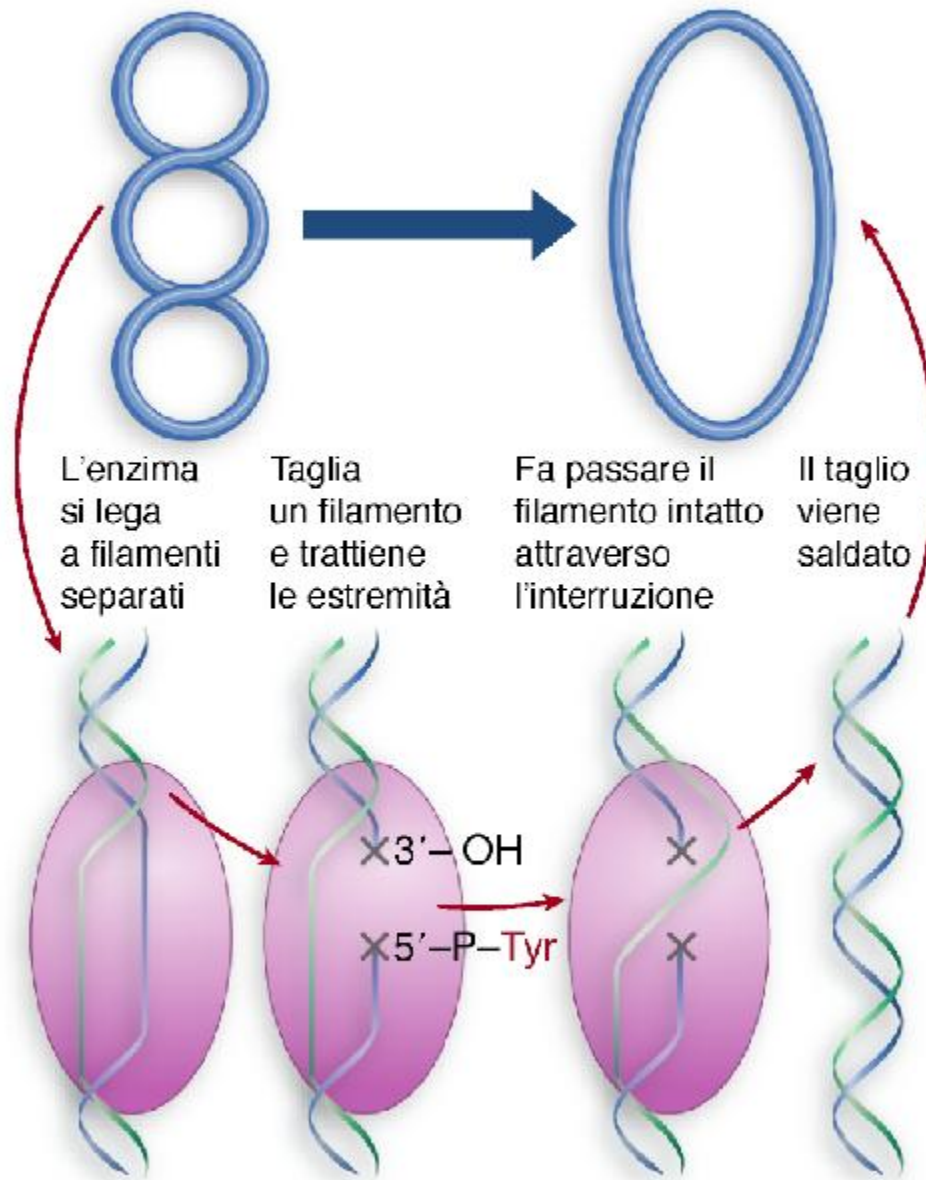
Le topoisomerasi di tipo I agiscono su filamenti singoli

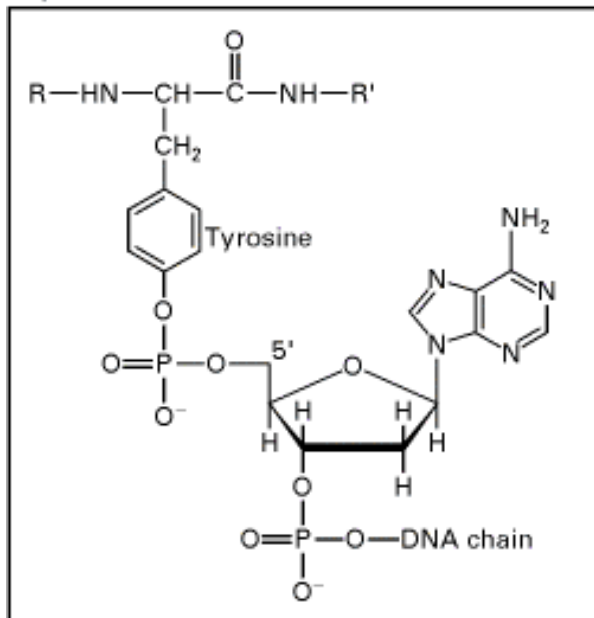
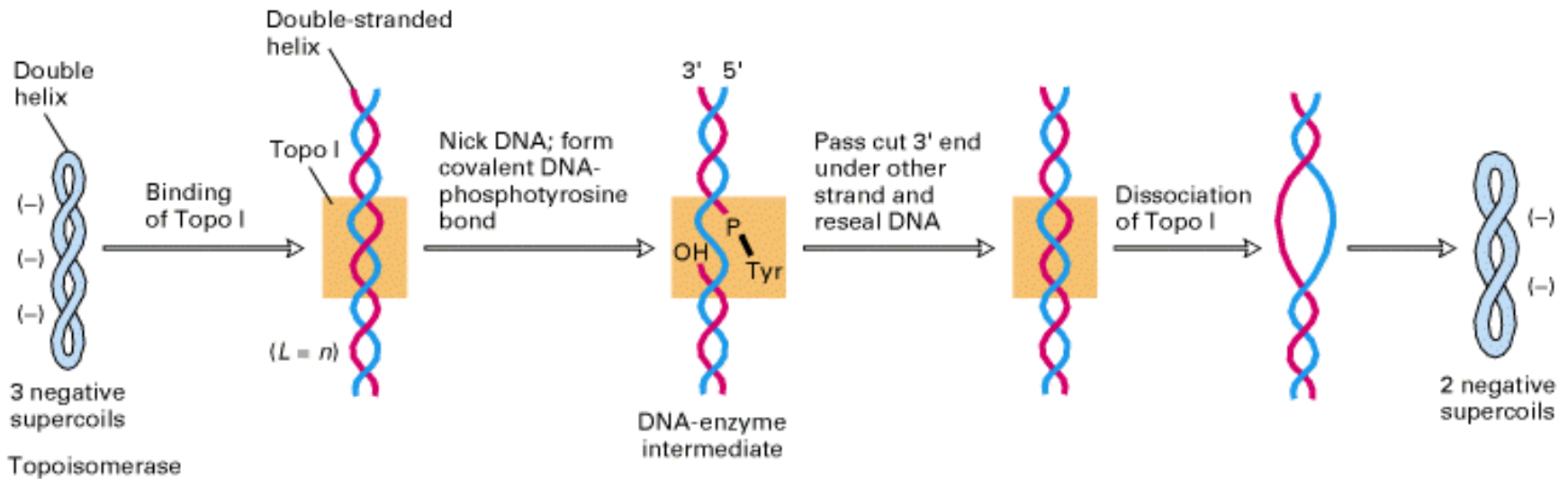


Le topoisomerasi di tipo I agiscono formando un legame covalente con una delle estremità tagliate, facendo passare un filamento intorno all'altro, quindi trasferendo l'estremità legata sull'altra estremità tagliata.

Poiché i legami sono conservati, **non è necessario** nessun apporto di energia

Le topoisomerasi di tipo I agiscono su filamenti singoli



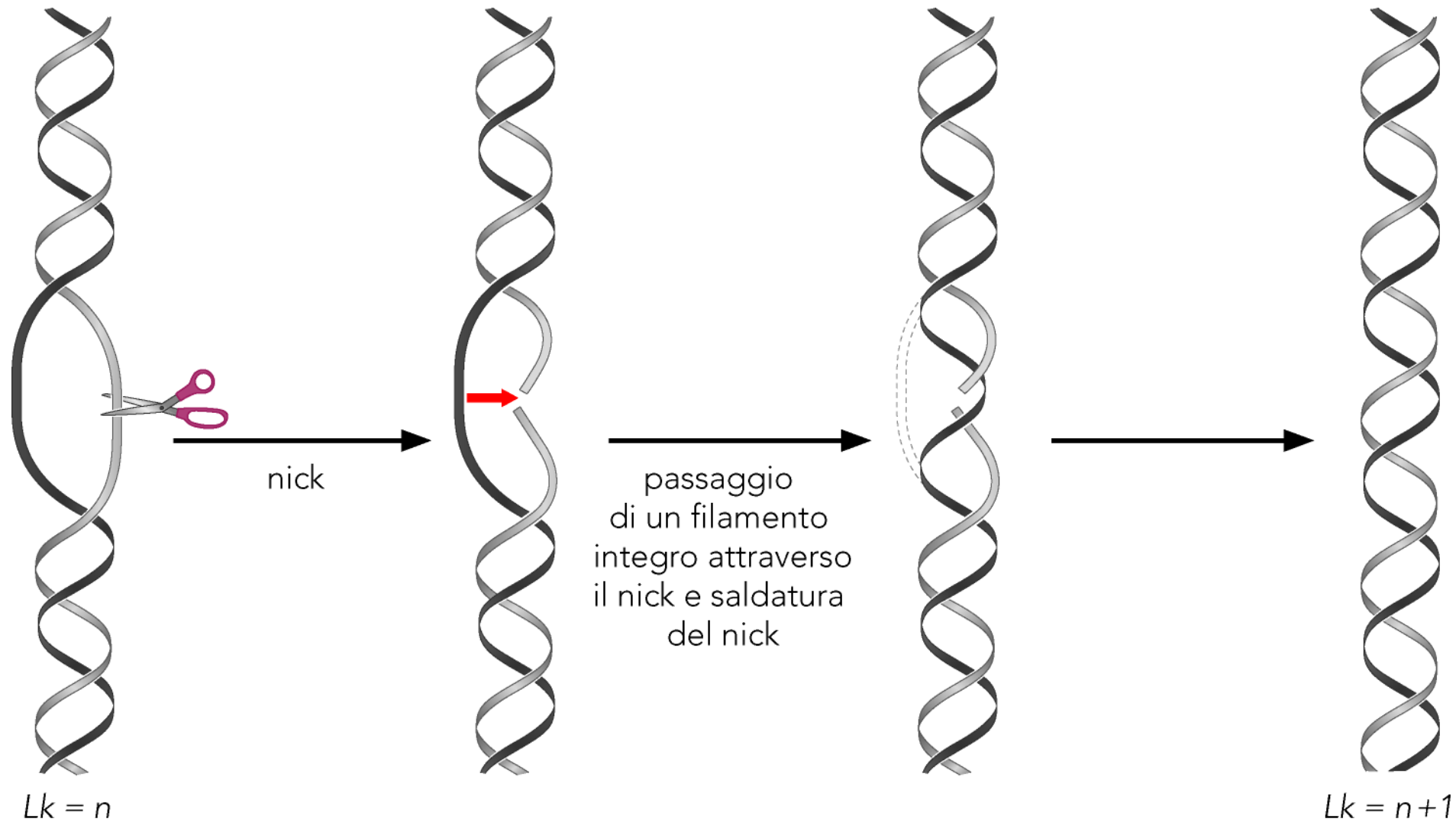


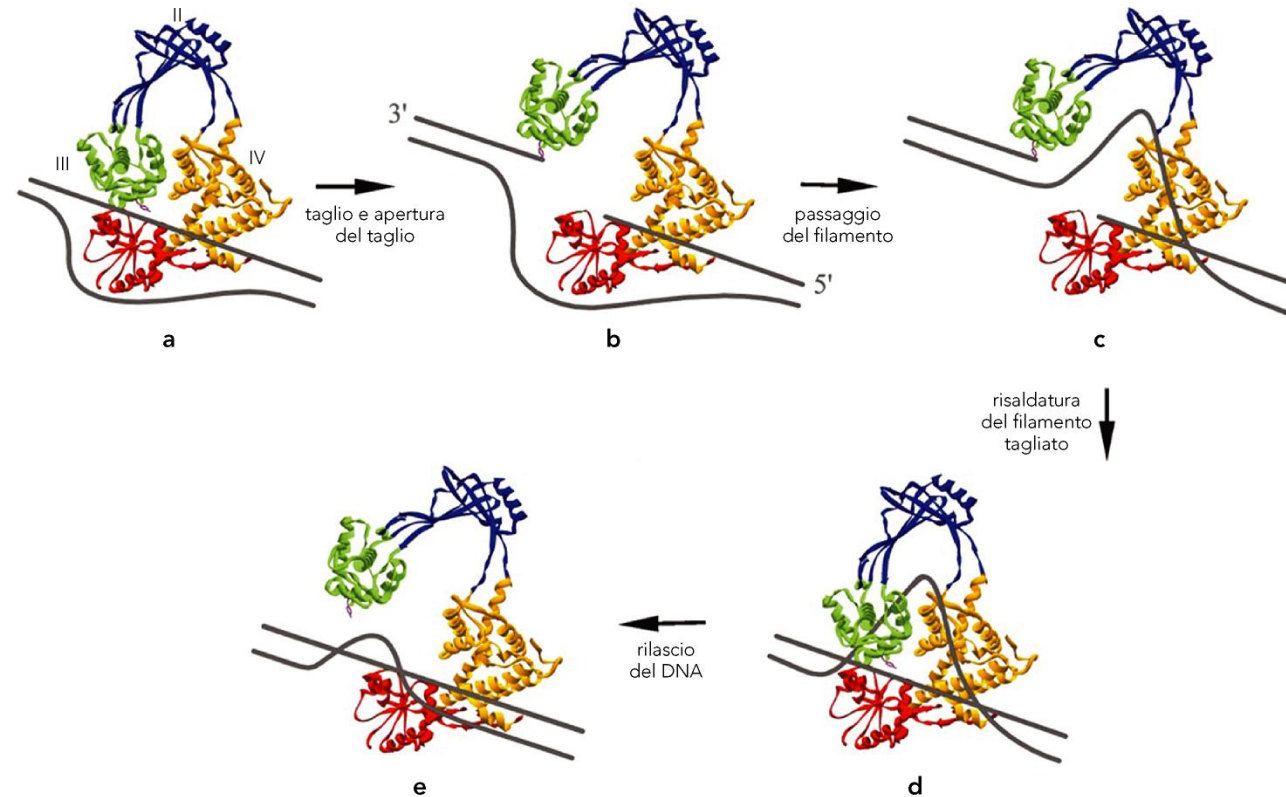
Action of *E. coli* type I topoisomerase (Topo I). The DNA-enzyme intermediate contains a covalent bond between the 5'-phosphoryl end of the nicked DNA and a tyrosine residue in the protein (inset). After the free 3'-hydroxyl end of the red cut strand passes under the uncut strand, it attacks the DNA-enzyme phosphoester bond, rejoining the DNA strand. During each round of nicking and resealing catalyzed by *E. coli* Topo I, one negative supercoil is removed.

Topoisomerasi di tipo I: rompono un filamento alla volta, fanno passare l'altro filamento intatto attraverso la rottura e poi lo risaldano.

Lk varia di una unità alla volta. Non richiedono ATP.

Sia i procarioti che gli eucarioti hanno topoisomerasi di tipo I e II, in grado rimuovere superavvolgimenti.



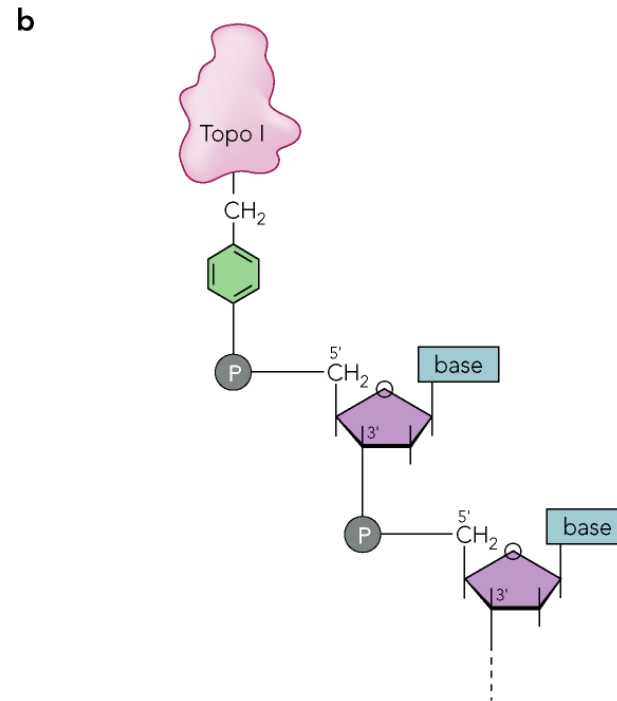
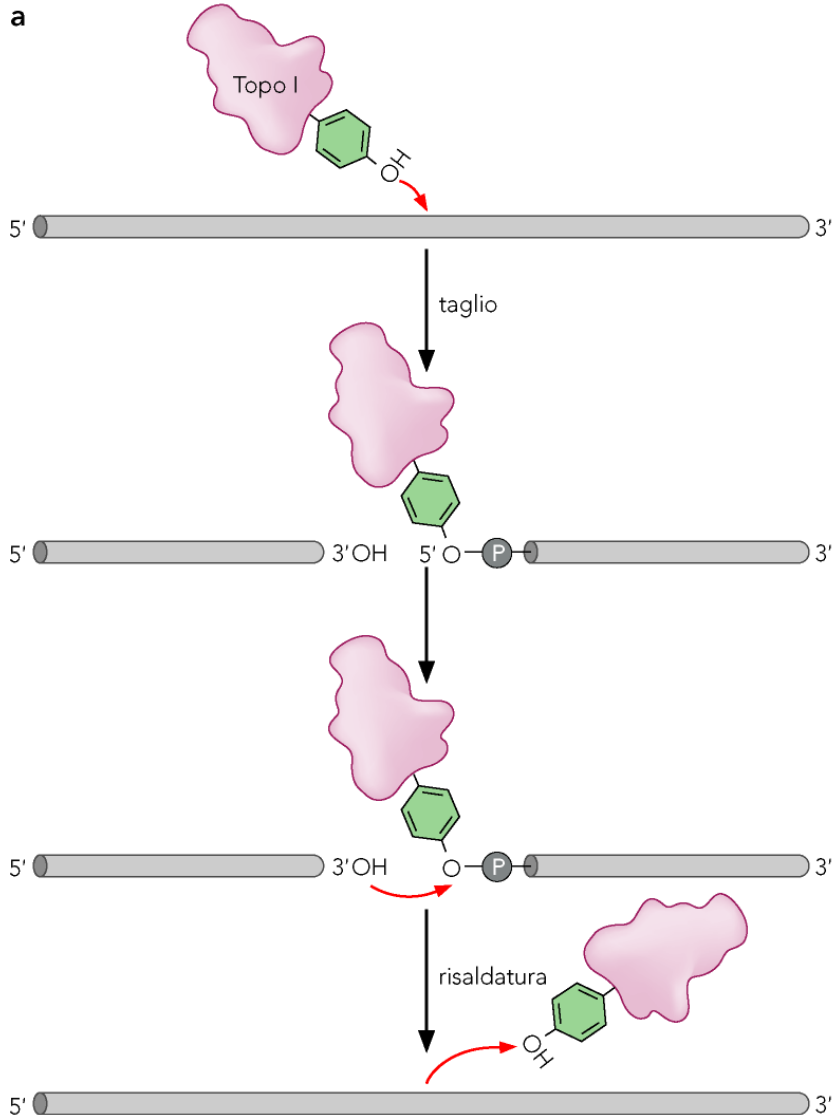


La reazione di rilassamento di DNA superavvolto, catalizzata dalla topoisomerasi I

La proteina contiene 4 domini, ognuno dei quali svolge un certo ruolo nella reazione.

Il legame iniziale avviene in una zona in cui la doppia elica presenta una denaturazione locale, favorita da un'alta densità di superavvolgimento negativo.

Un meccanismo simile si applica anche alle topoisomerasi di tipo II, che sono formate da 2 o 4 catene identiche.



Meccanismo d'azione delle topoisomerasi di tipo I

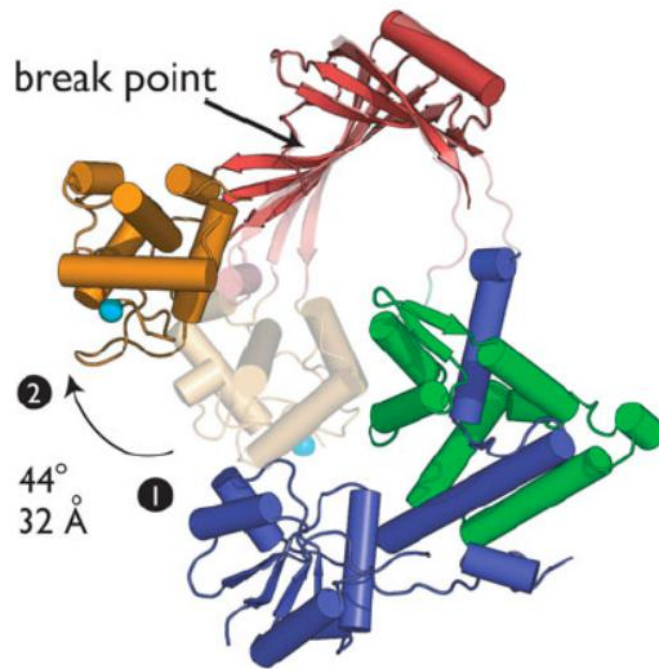
Il taglio del DNA prevede la formazione di un legame covalente temporaneo enzima-substrato fra un residuo di tirosina dell'enzima e un fosfato 5' del DNA.

L'altra estremità 3' è tenuta legata saldamente, ma non covalentemente, dall'enzima prima del passaggio dell'altro filamento e della risaldatura.

Per rilassare il DNA superavvolto non è necessario ATP, perché è sufficiente l'energia torsionale del DNA superavvolto.

Le topoisomerasi di tipo II utilizzano l'ATP non per tagliare il DNA bensì per promuovere cambiamenti conformazionali del complesso enzima-DNA.

(a)



(b)

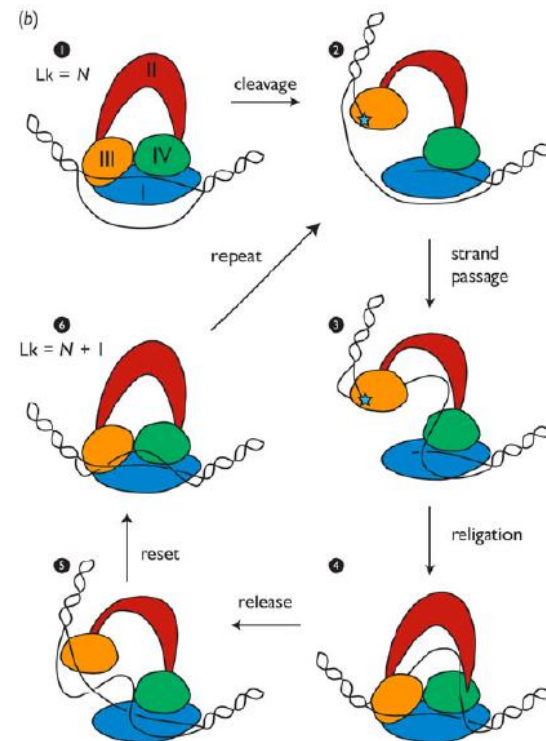


Fig 4.2 (a) Struttura di una topoisomerasi (Tipo IA). Sono mostrate le due conformazioni di sito aperto e chiuso coinvolte nel meccanismo di azione (b)

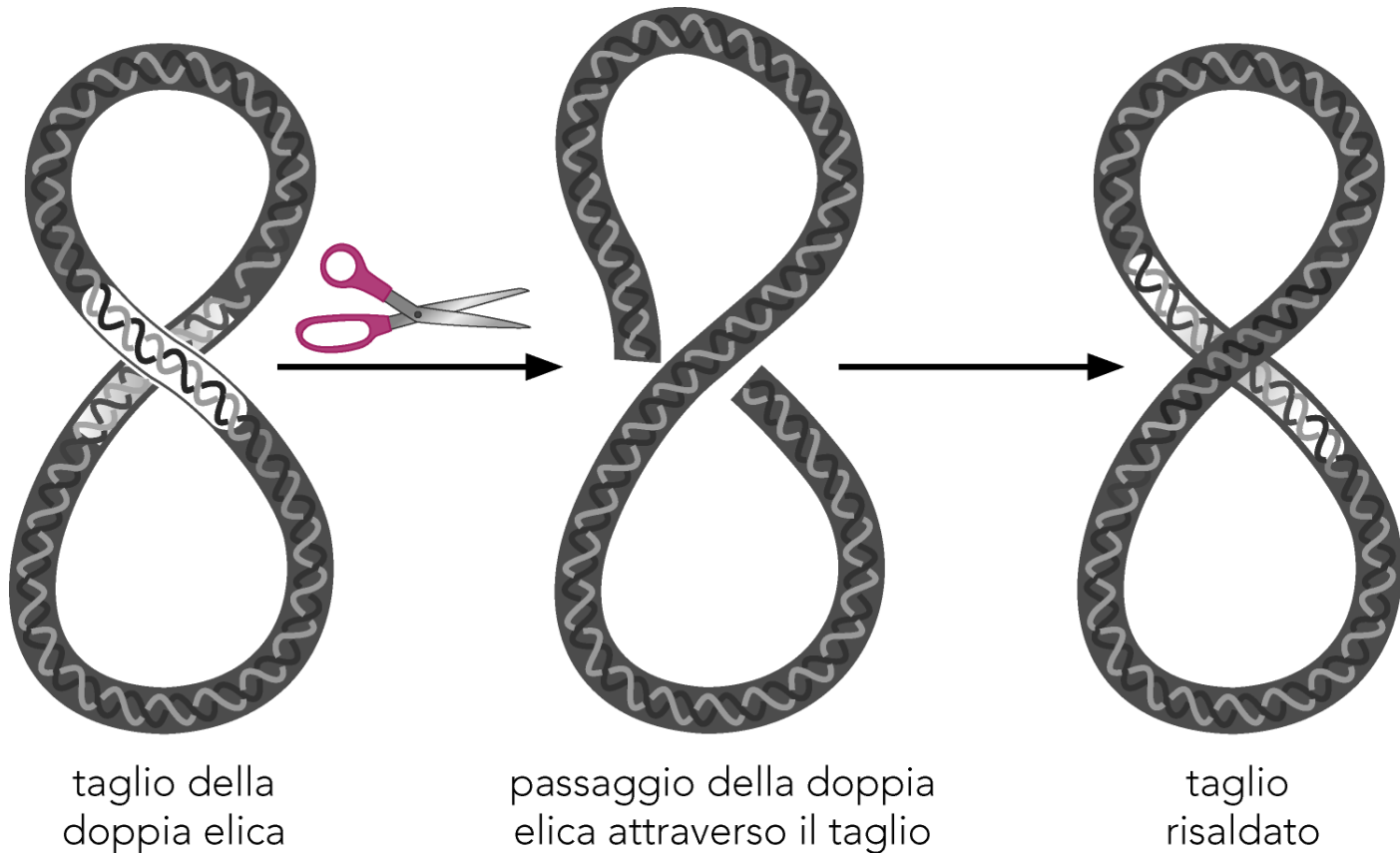
Topoisomerasi II

Tipo II: fanno passare un tratto di doppia elica intatta attraverso il taglio, prima di risaldarla.

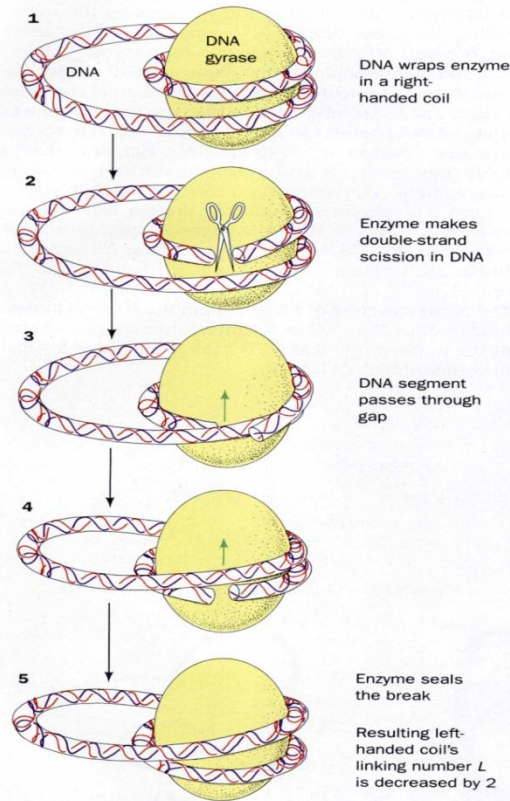
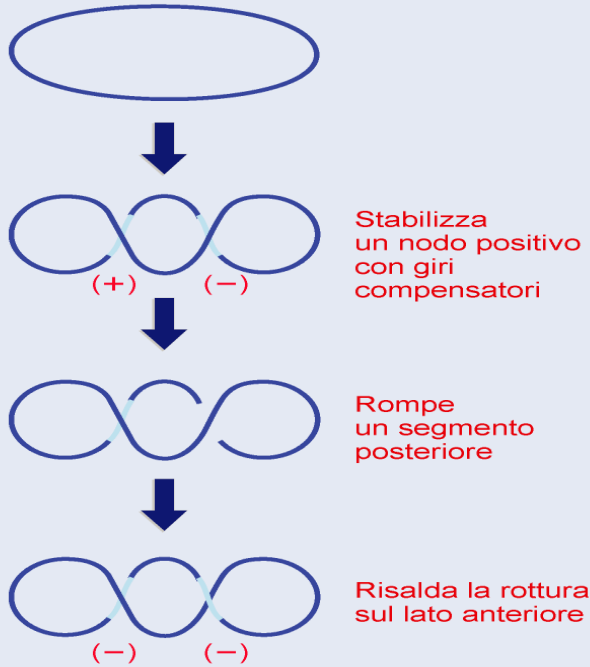
Lk cambia di due unità alla volta. Utilizzano l'ATP per recuperare la forma iniziale dopo ogni ciclo.

DNA girasi (topoisomerasi II batterica): anziché rilassare, introduce superavvolgimenti (-).

Responsabile del superavvolgimento del cromosoma, utile per facilitare lo svolgimento della doppia elica



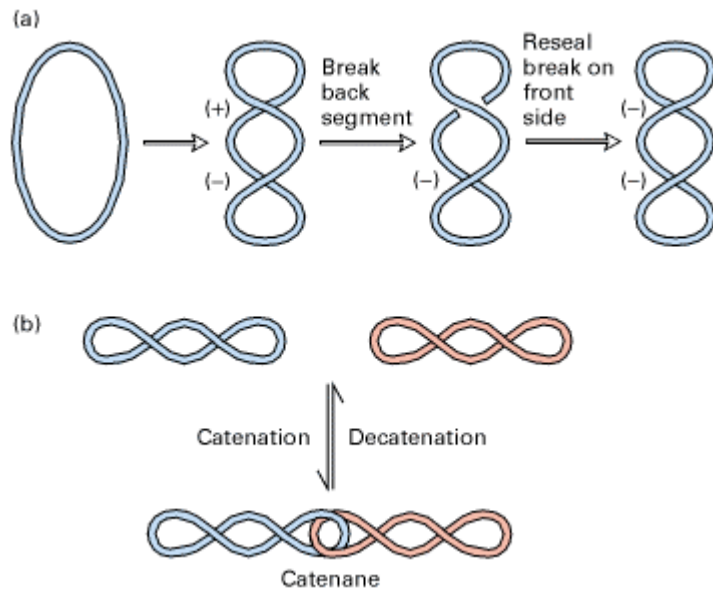
La girasi funziona invertendo un superavvolgimento



La DNA girasi di *E.coli*

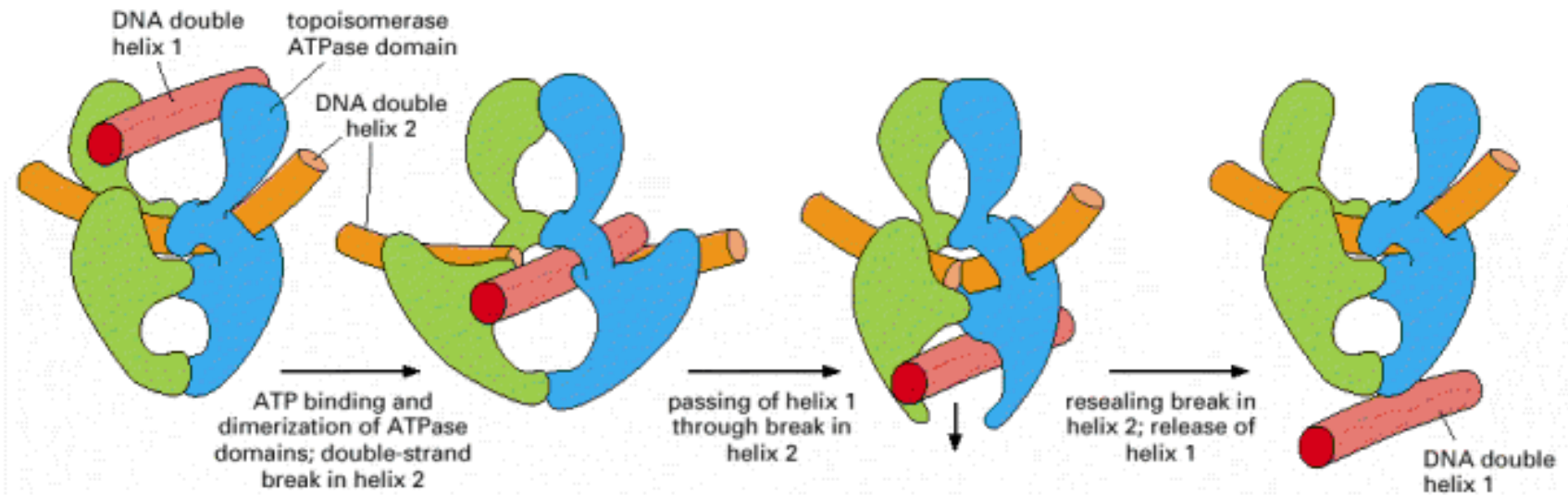
La girasi di *E.coli* è una topoisomerasi di **tipo II** che usa l'idrolisi di ATP per fornire l'energia necessaria all'introduzione di superavvolgimenti in una molecola circolare chiusa rilassata

Si lega al DNA e lo superavvolge processivamente e cataliticamente
Continua ad introdurre superavvolgimenti nella stessa molecola di DNA
Può introdurre circa 100 superavvolgimenti al minuto



Action of *E. coli* DNA gyrase, a type II topoisomerase. (a) Introduction of negative supercoils. The initial folding introduces no stable change, but the subsequent activity of gyrase produces a stable structure with two negative supercoils. (b) Catenation and decatenation of two different DNA duplexes.

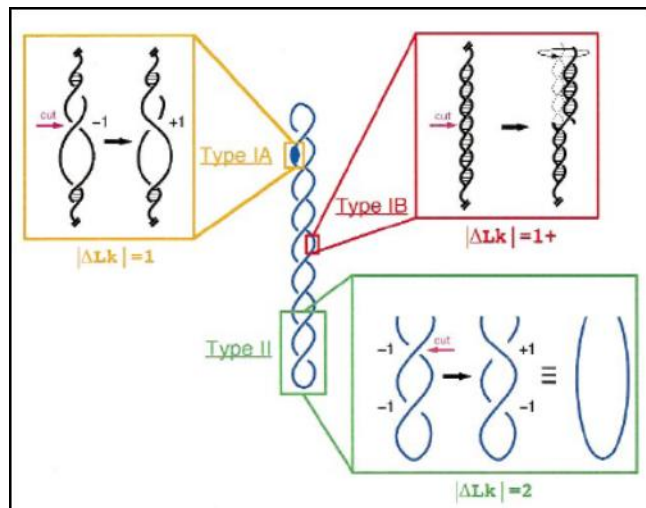
Model for gyrase action.



Funzioni delle topoisomerasi I e II

- Durante la replicazione la doppia elica deve quindi svolgersi.
- Le topoisomerasi sono enzimi che convertono il DNA da una forma topologica all'altra, cioè da una forma superavvolta ad una rilassata e viceversa.
- Le topoisomerasi I rompono transitoriamente una sola delle catene del DNA, la ruotano attorno a quella integra e infine riuniscono le estremità interrotte, modificando il numero di legame (Lk) con incrementi positivi di 1. Dal momento che il DNA è superavvolto in senso destrogiro, un incremento positivo di Lk porta in effetti ad un rilassamento della doppia elica, un processo termodinamicamente favorevole.
- Le topoisomerasi II invece, rompono entrambe le catene di DNA e modificano Lk con incremento negativo di 2; dal momento che introduce un ulteriore stress topologico nella doppia elica, questa reazione necessita di energia, prodotta attraverso l'idrolisi di una molecola di ATP.

- ❖ Le topoisomerasi che tagliano solo un filamento sono definite di tipo I, quelle che tagliano entrambi i filamenti, generando un taglio sfalsato a doppio filamento, sono catalogate come topoisomerasi di tipo II.
- ❖ Le topoisomerasi di tipo I sono monomeriche e vengono ulteriormente classificate in due sottofamiglie: IA e IB. Le IA, durante il ciclo catalitico, si legano covalentemente all'estremità 5' del filamento tagliato, le IB invece si legano all'estremità 3'.
- ❖ Le topoisomerasi di tipo II possono essere omodimeriche o eterodimeriche e formano l'intermedio covalente legandosi all'estremità 5' del DNA tagliato



Meccanismi attraverso cui le diverse classi di topoisomerasi possono catalizzare cambiamenti nella topologia del DNA.

Classe IA: passaggio di un filamento di DNA attraverso l'altro;

Classe IB: rotazione di un DNA duplex intorno ad una rottura in uno dei filamenti;

Classe II: passaggio di un DNA duplex attraverso l'altro.

**I chinoloni agiscono inibendo
due topoisomerasi batteriche**



DNA girasi (batteri Gram -)



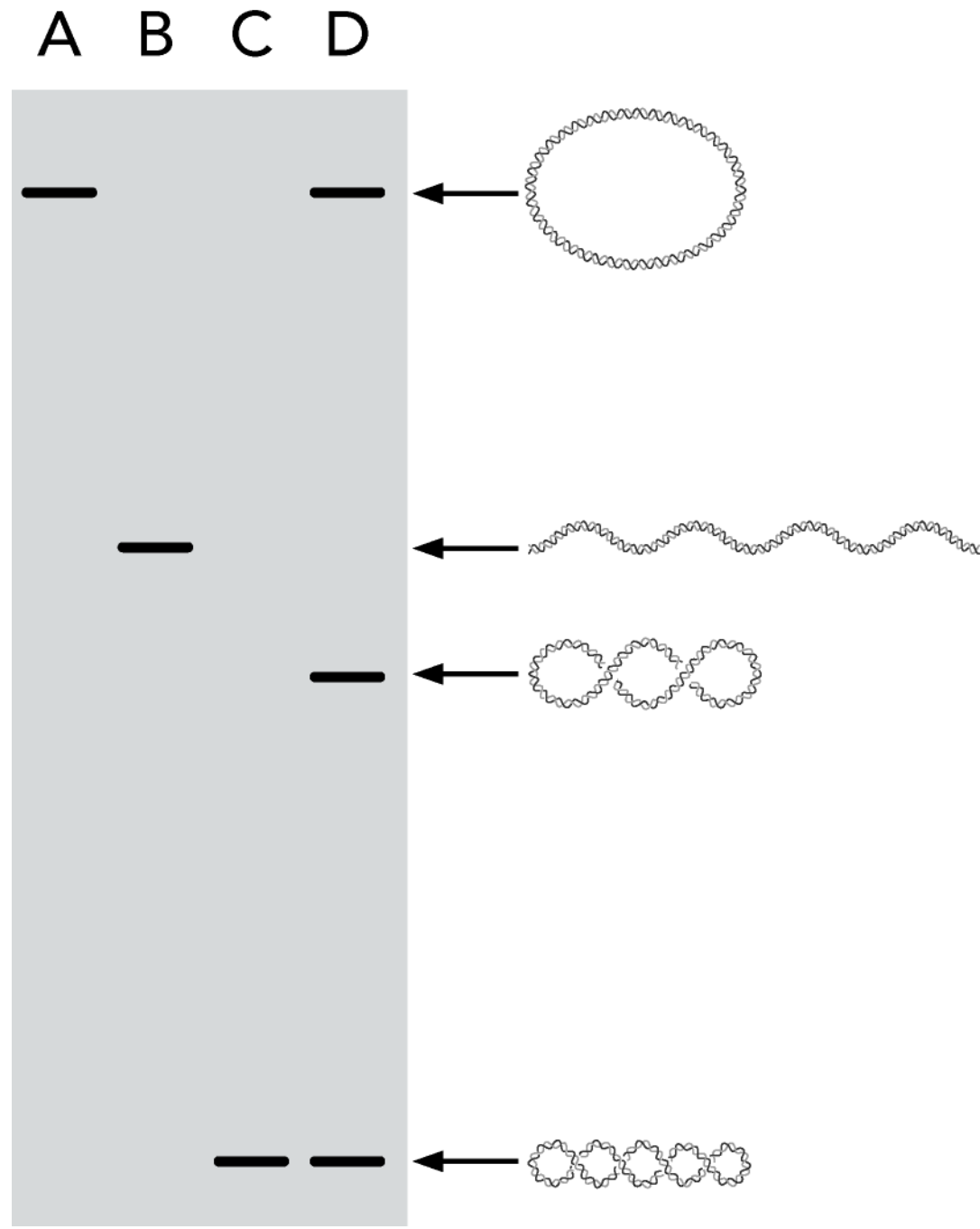
Topoisomerasi IV (batteri Gram +)

Separazione dei topoisomeri

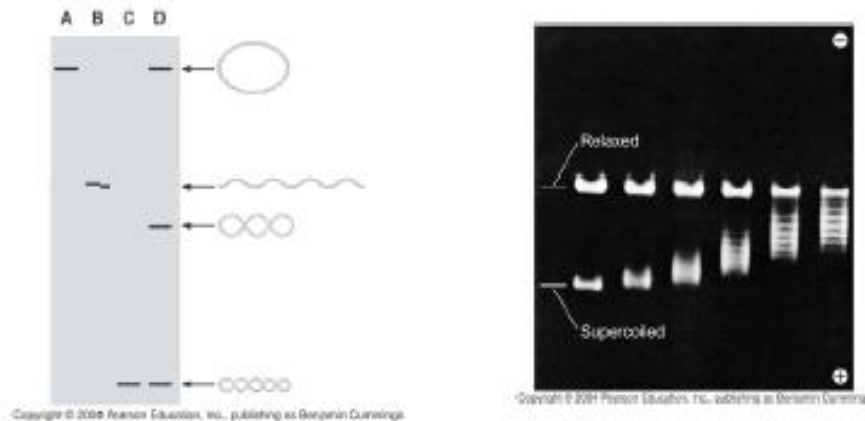
Molecole di DNA ccc di una certa lunghezza, ma diverso Lk, sono dette topoisomeri.

Sono separati in elettroforesi su gel, pur avendo lo stesso rapporto carica/massa. La diversa mobilità è dovuta al loro diverso grado di compattamento (diverso coefficiente d'attrito).

Più la molecola è compatta (DNA superavvolto) più migra velocemente nel gel. Viceversa un cccDNA rilassato migra molto più lentamente di uno fortemente superavvolto.



Separazione delle molecole rilassate e superavvolte



Molecular Biology of the Gene, Fig. 6-26, 6-27

- Relaxed and supercoiled DNA topoisomers are resolved by gel electrophoresis.

Elettroforesi su gel di diversi topoisomeri di DNA

Diversi topoisomeri possono essere formati (e separati mediante elettroforesi su gel) con diversi tempi di per trattamento con una topoisomerasi.

Ogni banda differisce dalla vicina di una unità nel valore di Lk.

Il superavvolgimento del DNA

Altamente regolato in ogni cellula



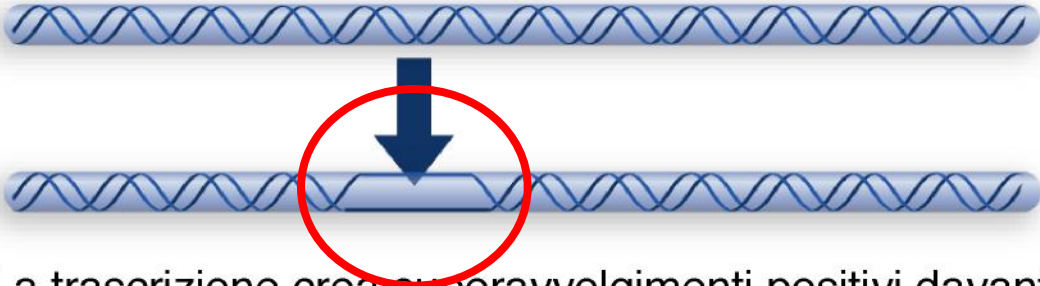
Il DNA deve essere altamente compattato per trovare spazio all'interno della cellula, ma deve essere accessibile per i processi di replicazione e trascrizione che richiedono una temporanea separazione dei filamenti

Se i due filamenti vengono separati tirando, la tensione risultante produrrà un superavvolgimento a monte

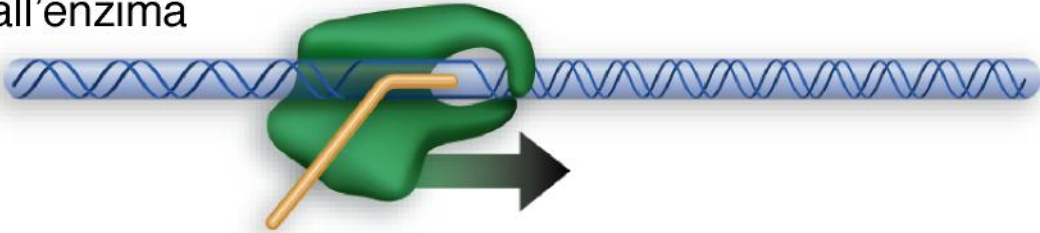
Le topoisomerasi sono enzimi che controllano il grado di superavvolgimento del DNA, dell' avvolgimento cioè dell' asse della doppia elica del DNA su se stesso e risolvono in tal modo i problemi di aggrovigliamento e concatenazione del DNA che possono presentarsi durante i processi di replicazione e trascrizione del DNA stesso e nel corso della mitosi cellulare. Le topoisomerasi possono catalizzare sia superavvolgimenti positivi (destrogi) che negativi (levogiri). Il processo di interconversione tra forme diverse di DNA che differiscono tra loro per il grado di superavvolgimento può avere luogo tagliando uno o entrambi i filamenti del DNA. Le topoisomerasi di tipo I tagliano un solo filamento, quelle di tipo II entrambi i filamenti. La DNA girasi e la topoisomerasi IV sono topoisomerasi di tipo II.

La sintesi di acido nucleico cambia le strutture

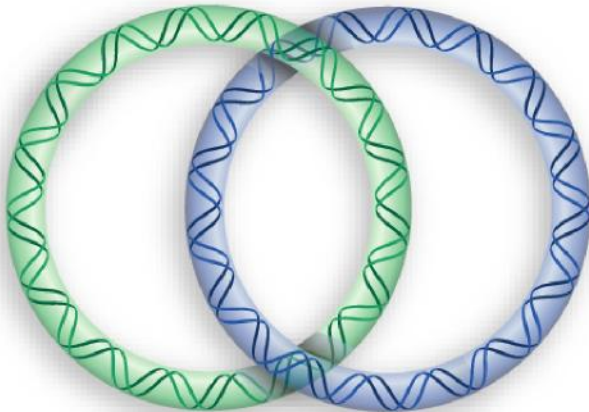
I filamenti devono separarsi perché vi sia replicazione



La trascrizione crea superavvolgimenti positivi davanti all'enzima



La replicazione produce DNA concatenati



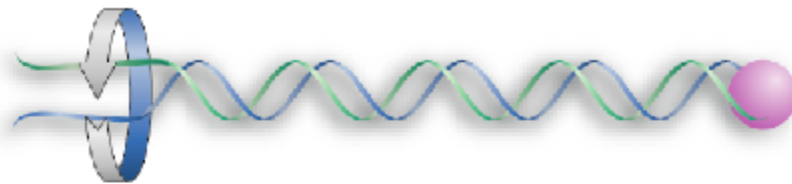
**Il superavvolgimento causato
da un parziale disavvolgimento
produrrà un superavvolgimento
NEGATIVO**

**Il superavvolgimento causato
da un maggiore avvolgimento
produrrà un superavvolgimento
POSITIVO**

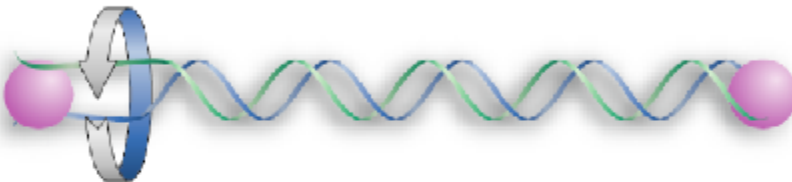
**È indispensabile l'intervento di una
topoisomerasi di tipo II**

La separazione dei filamenti richiede modificazioni topologiche

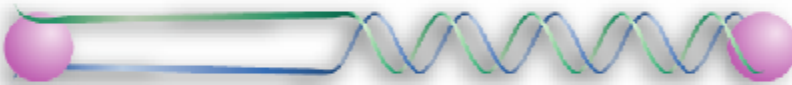
Rotazione intorno a un'estremità libera



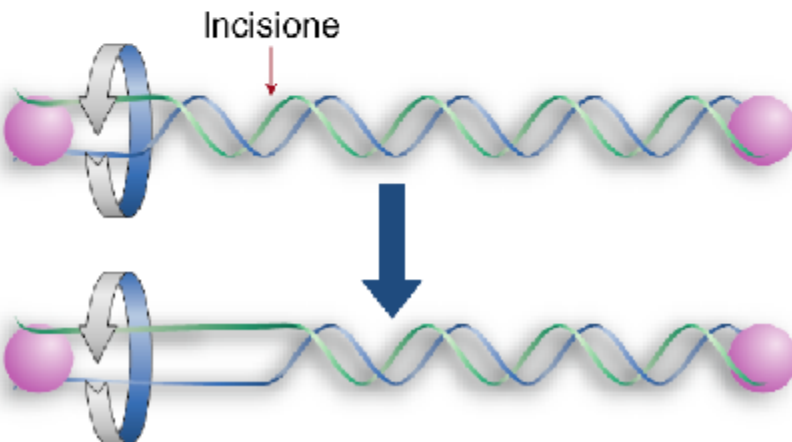
Rotazione a livello di estremità fisse

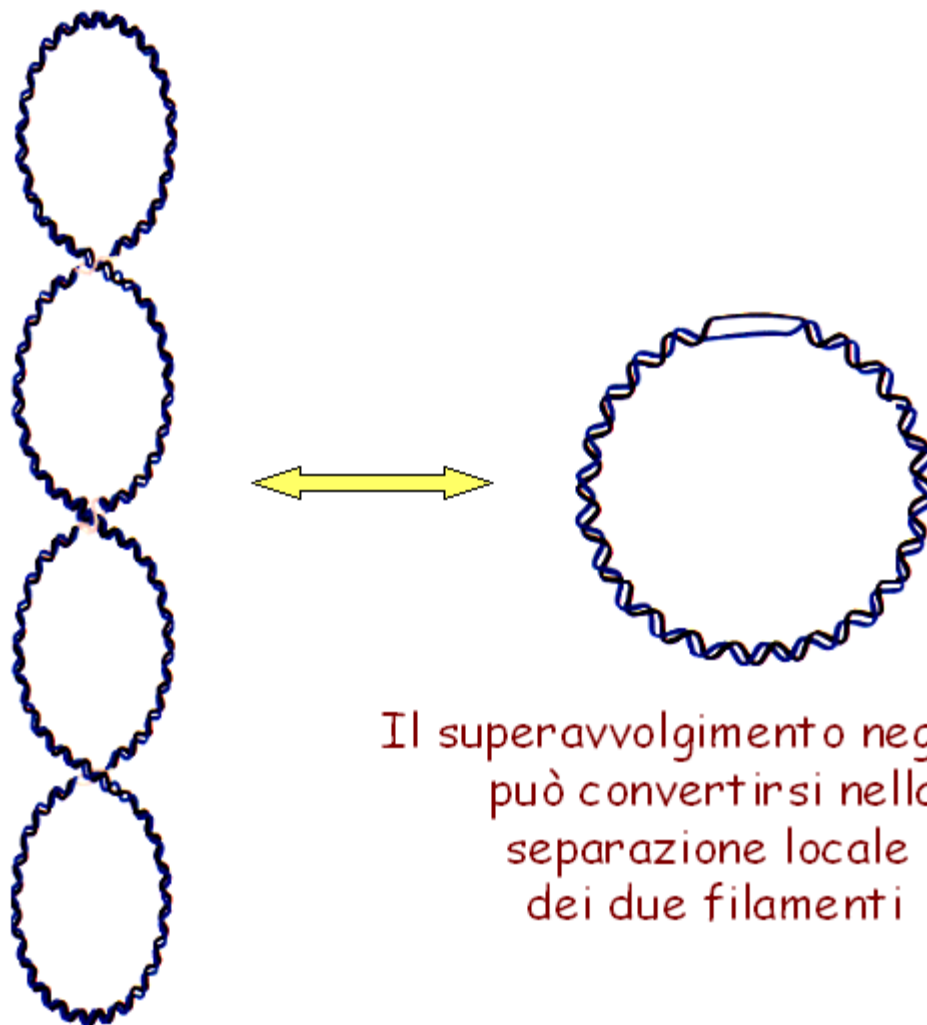


Separazione dei filamenti compensata da superavvolgimento positivo



Incisione a filamento singolo, rotazione, saldatura

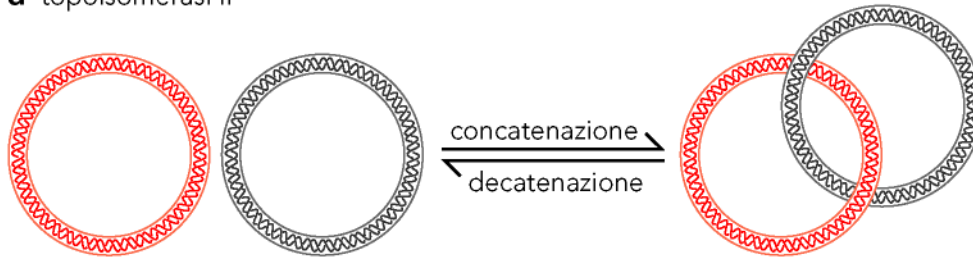




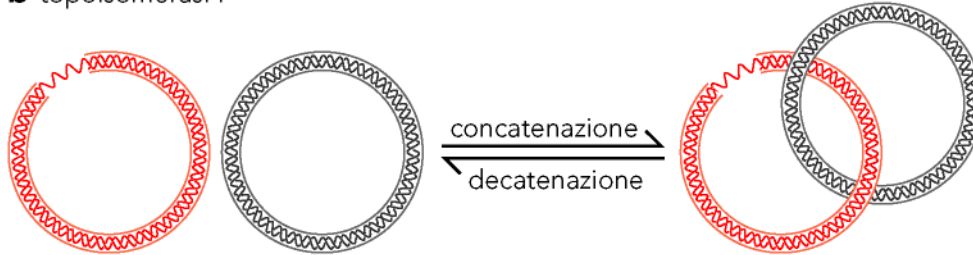
Il superavvolgimento negativo
può convertirsi nella
separazione locale
dei due filamenti

DNA superavvolto
negativamente

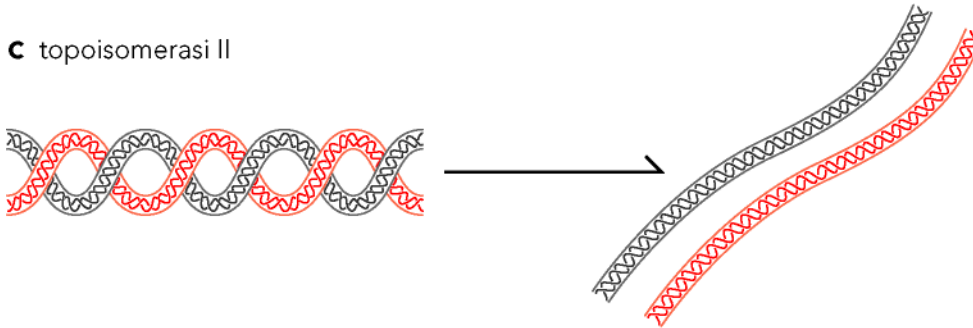
a topoisomerasi II



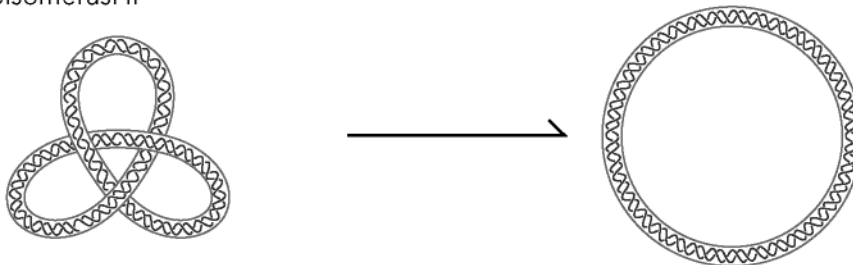
b topoisomerasi I



c topoisomerasi II



d topoisomerasi II

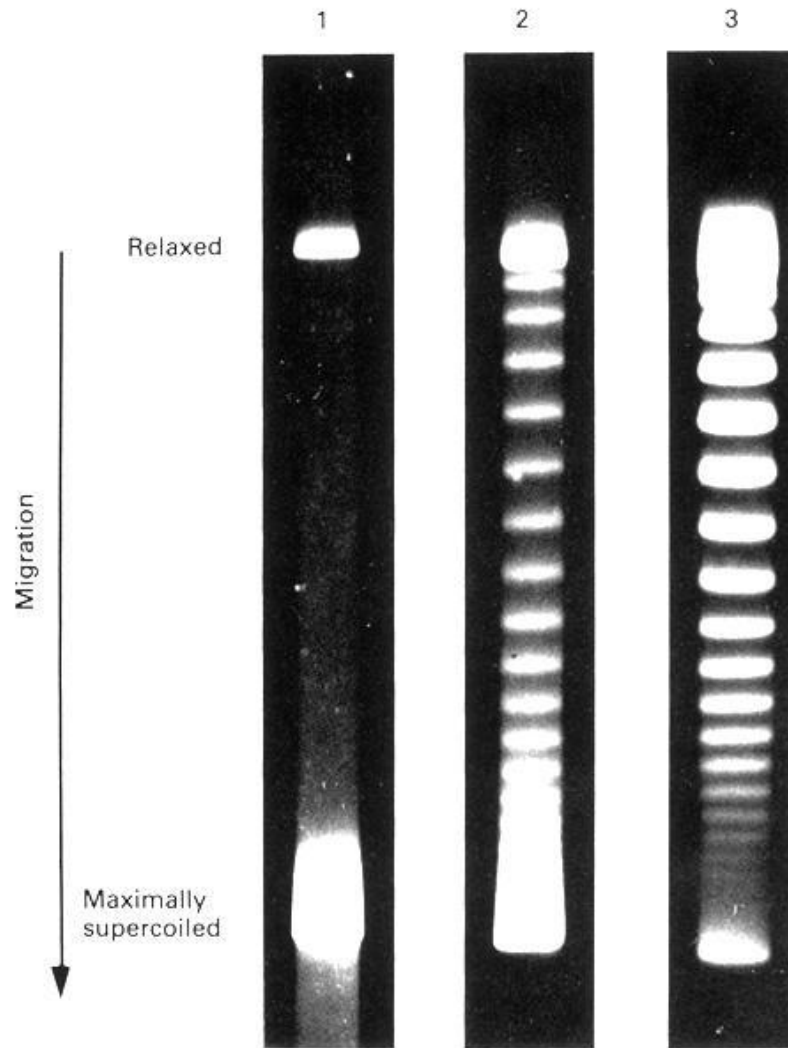


Altre importanti reazioni catalizzate dalle topoisomerasi, per una corretta struttura del cromosoma.

-Concatenazione e decatenazione di DNA ccc. Decatenazione separa le molecole di DNA a fine replicazione.

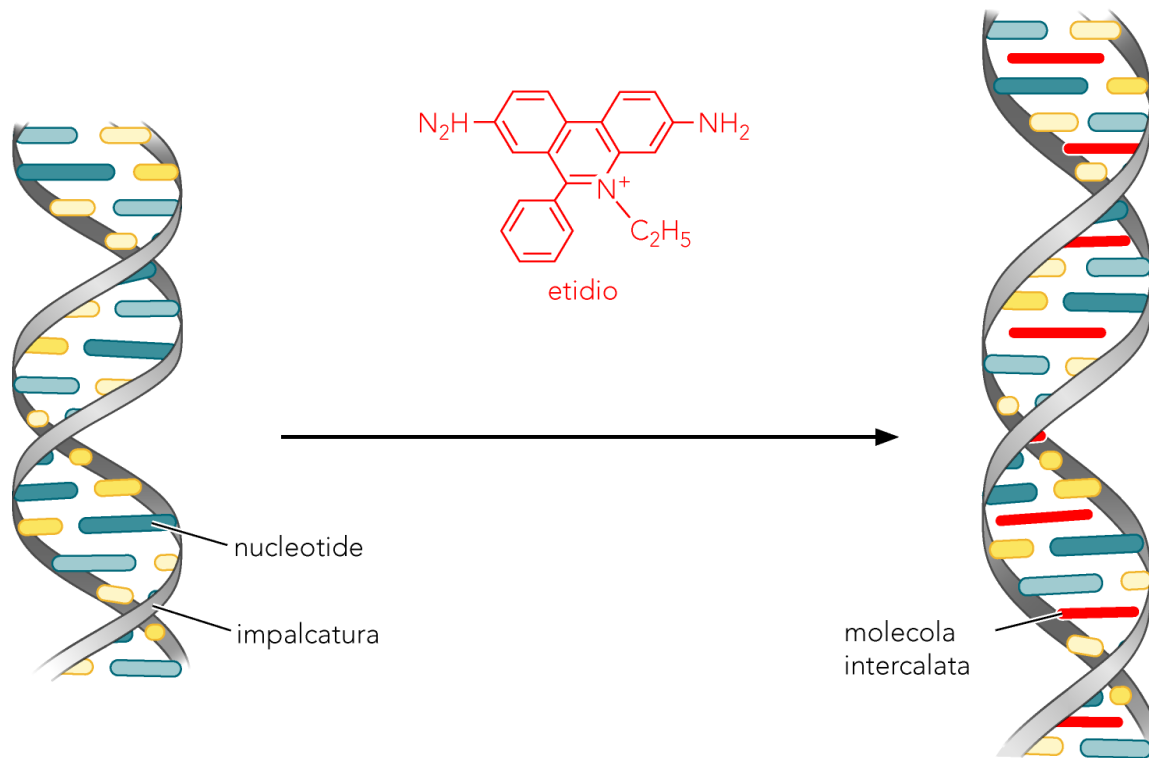
-Distribuzione di molecole di DNA lineare: essendo molto lunghe, sono soggette a problemi topologici durante la replicazione, che bloccherebbero la separazione dei cromosomi fratelli alla mitosi.

-Eliminazione di nodi: si possono formare durante la ricombinazione (topoisomerasi di tipo II, ma anche di tipo I se sono presenti dei nick o dei gap nella molecola).



**Separazione elettroforetica
di topoisomeri di cccDNA
ottenuti per azione della
topoisomerasi I**

L'etidio causa lo srotolamento della doppia elica



Questa molecola ionica si può intercalare fra due paia di basi nella doppia elica. Essendo fluorescente viene usato per visualizzare il DNA.

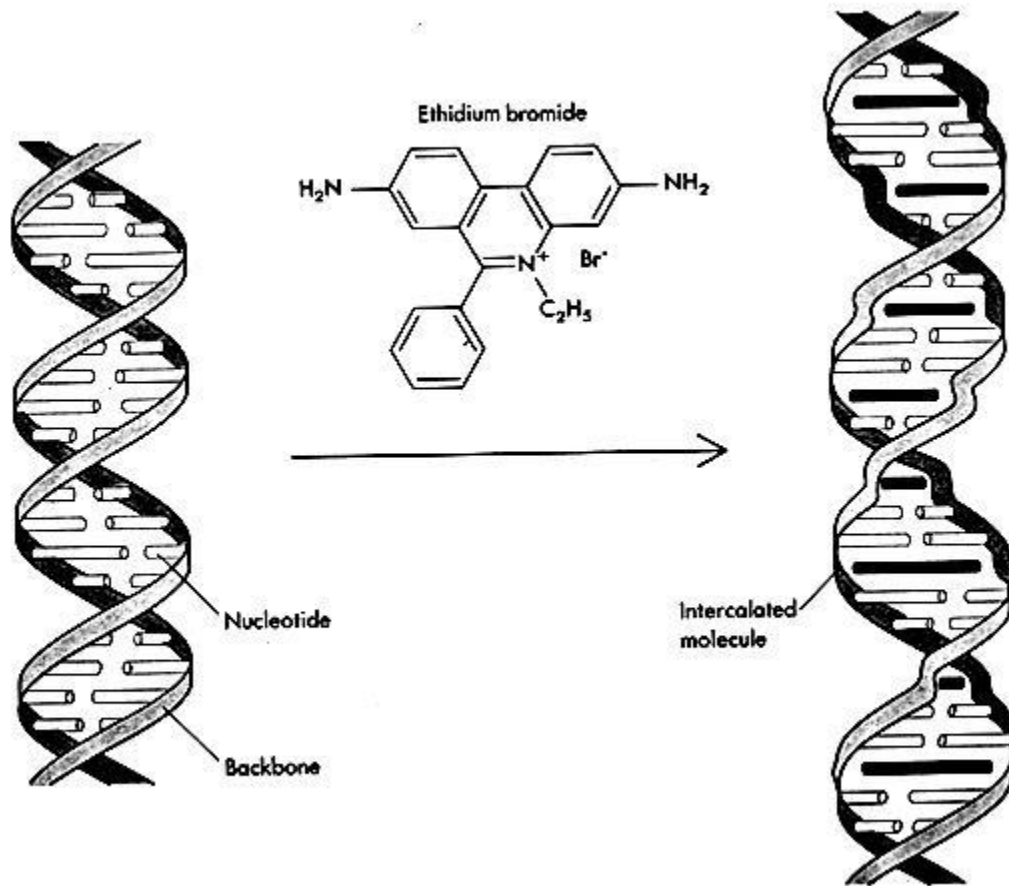
Quando si intercala, **srotola di 26°**, ossia l'angolo fra le due bp intercalate passa da circa 36° a circa 10°, con **diminuzione di Tw** e aumento di lunghezza.

Se il DNA è ccc, Lk non può cambiare, per cui un calo di Tw si riflette in un aumento di Wr: $\Delta Tw = -\Delta Wr$.

DNA ccc superavvolto negativamente viene srotolato, fino a rilassarsi o addirittura a superavvolgersi positivamente, all'aumentare dell'etidio.

L'etidio è usato in elettroforesi 2D per separare topoisomeri con lo stessa densità di superavvolgimento ma di segno opposto segno (i superavvolti (-) vengono rallentati, i superavvolti (+) accelerati).

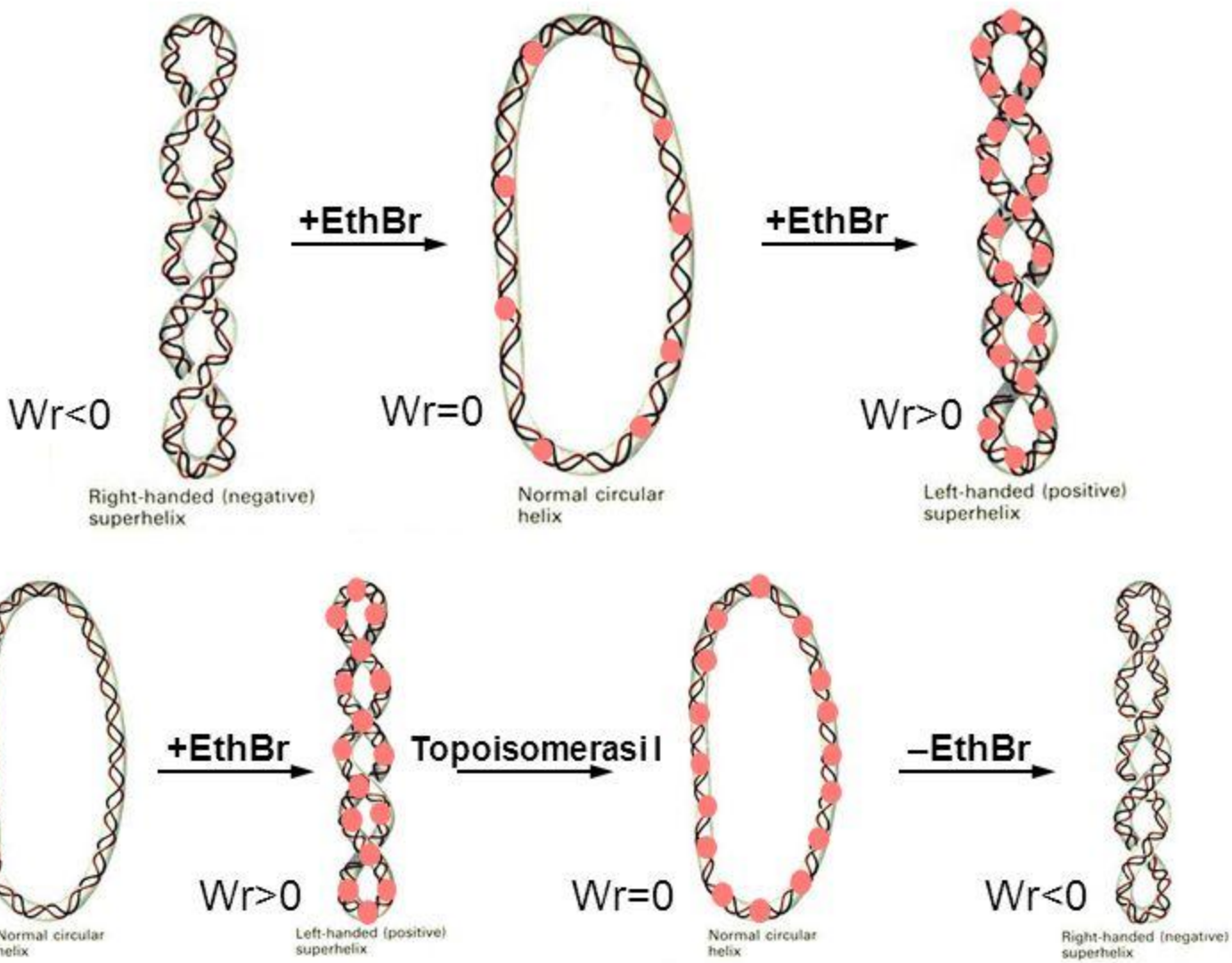
Intercalazione dello ione etidio nel DNA a doppia elica



Ogni ione etidio intercalato nel duplex induce uno “svitamento” della doppia elica pari a circa 26° (e un allungamento di circa 0,34 nm).

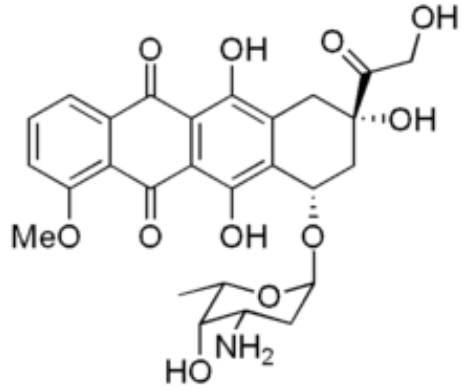
Ciò implica che per ogni 14 ioni etidio intercalati nel cccDNA questo subisce una variazione di Twist pari a -360° , ovvero $\Delta Tw = -1$, che può essere compensato dal rilassamento di un superavvolgimento ($\Delta Wr = 1$)

L'effetto del bromuro di etidio sul DNA superavvolto

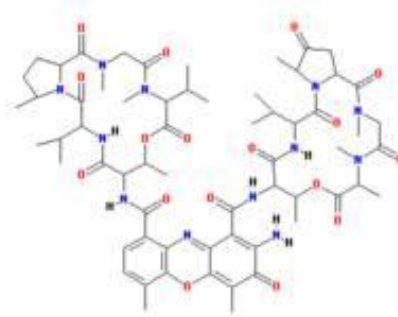
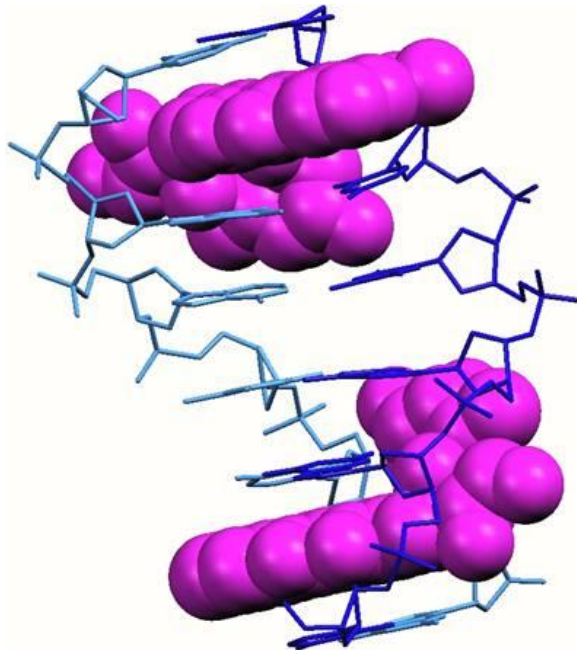
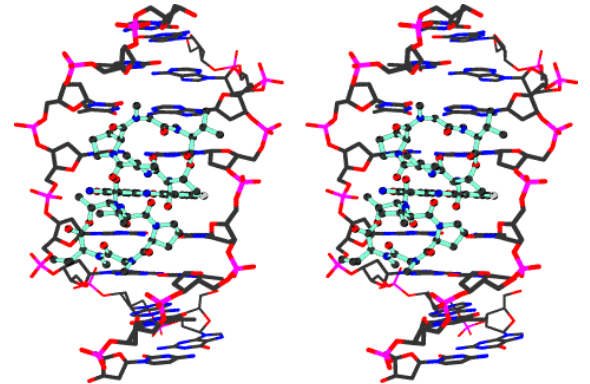


Le topoisomerasi sono enzimi che agiscono sullo stato topologico del DNA, tagliandolo e ricucendolo. La Topoisomerasi I, ad esempio, rilassa il DNA superavvolto (riduzione del Wr).

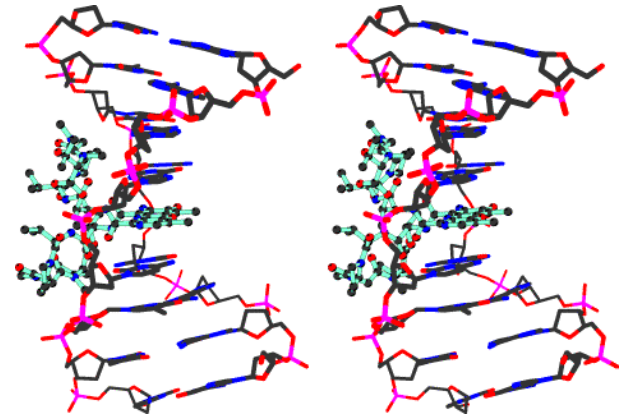
Intercalating agents



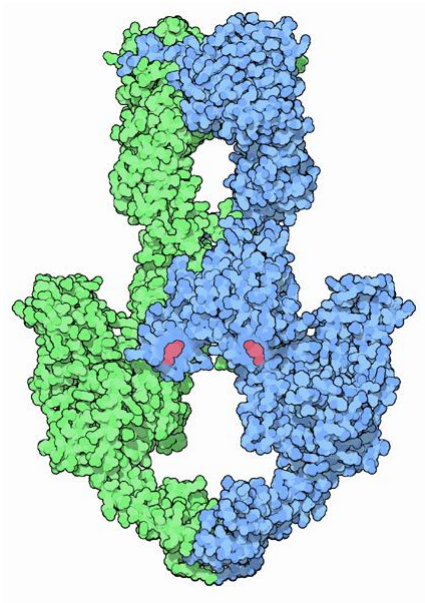
Doxorubicin



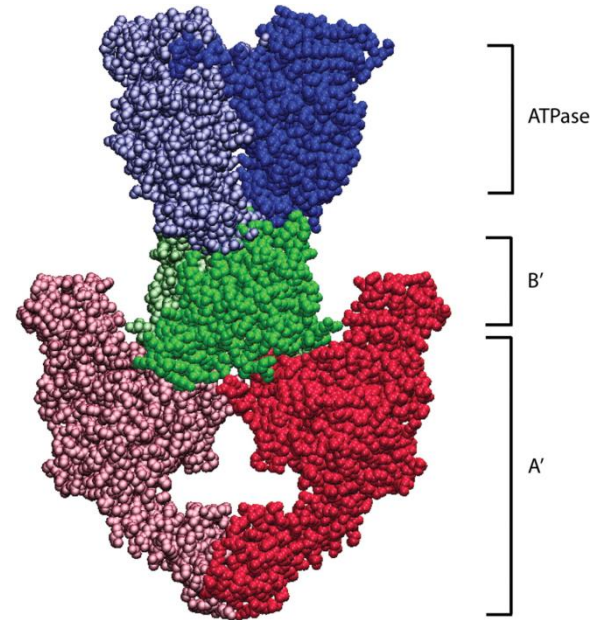
D-actinomycin



Antracicline, come doxorubicina e daunorubicina, attaccano le topoisomerasi di classe II, mentre l'antibiotico actinomicina D blocca l'azione rilassante delle topoisomerasi di classe I.

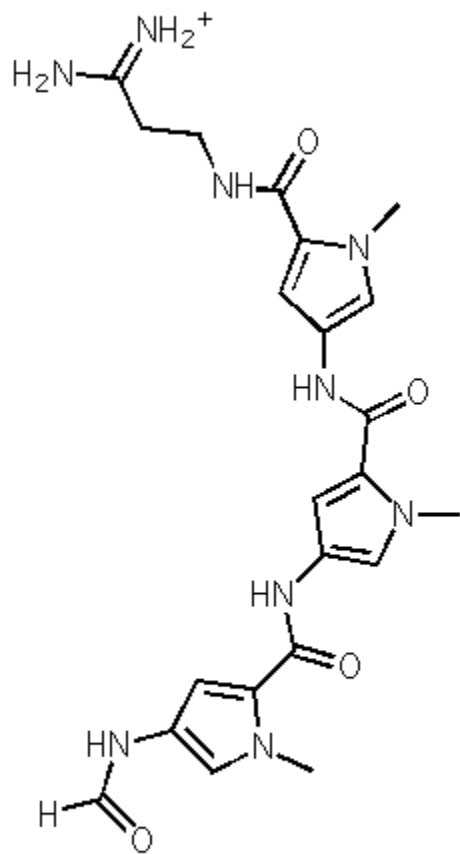


Structure of Topoisomerase I.

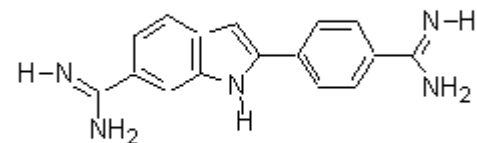
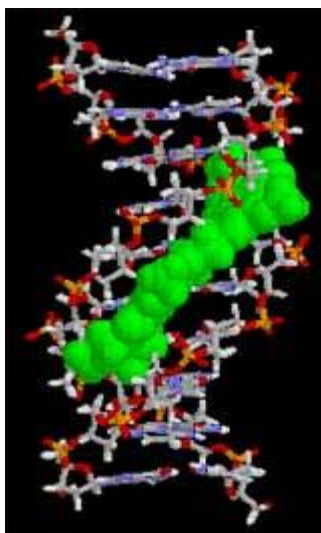
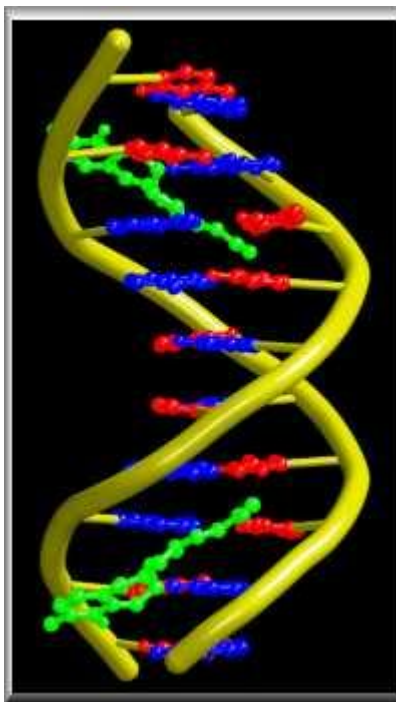


Structure of Topoisomerase II.

Minor Groove Binders



Distamycin



DAPI
DI AMIDINO PHENYL INDOLE

DAPI-stained cells
In UV-microscopy

