

Topologia del DNA e DNA topoisomerasi

Topologia del DNA

Vantaggi

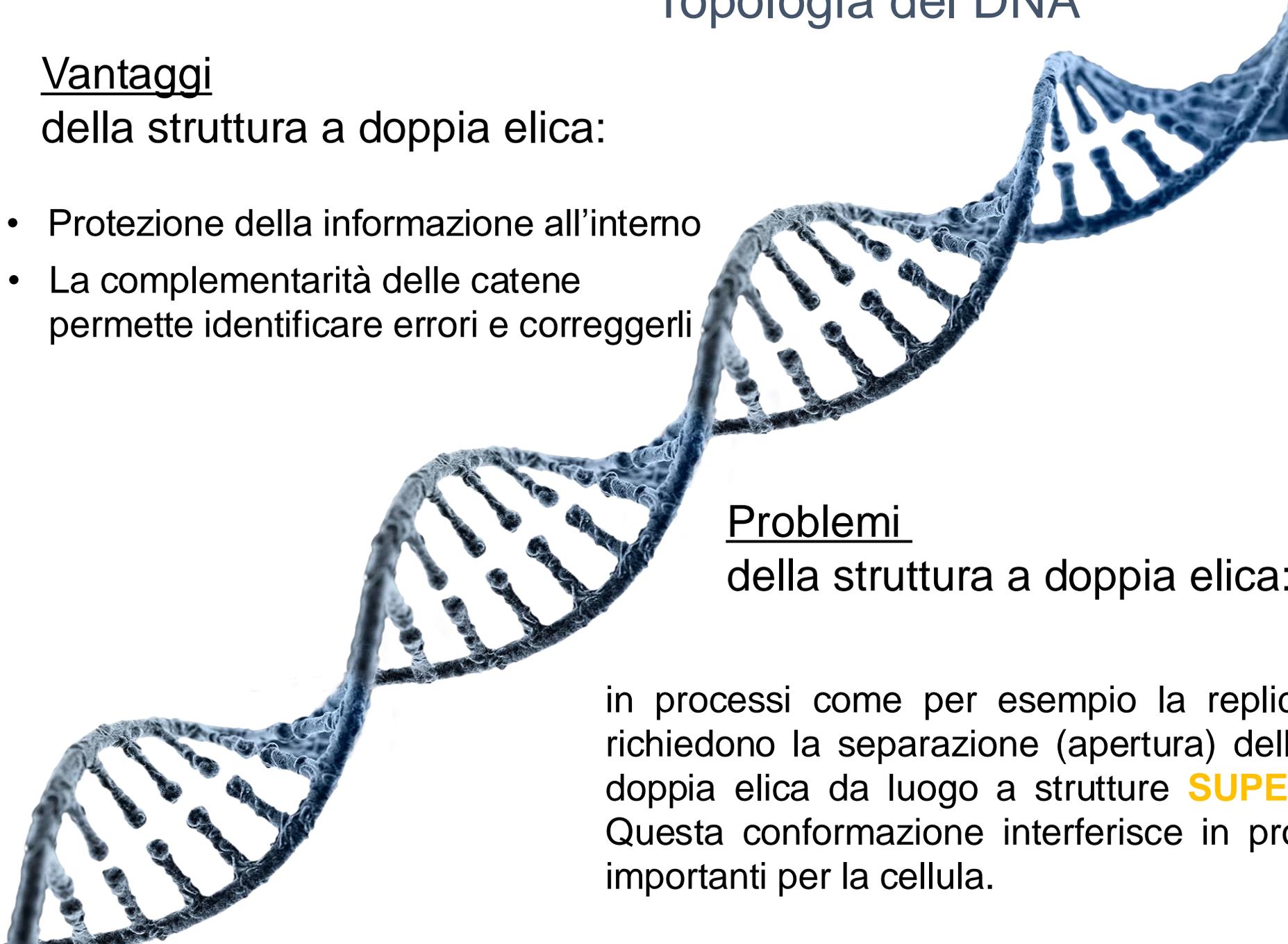
della struttura a doppia elica:

- Protezione della informazione all'interno
- La complementarità delle catene permette identificare errori e correggerli

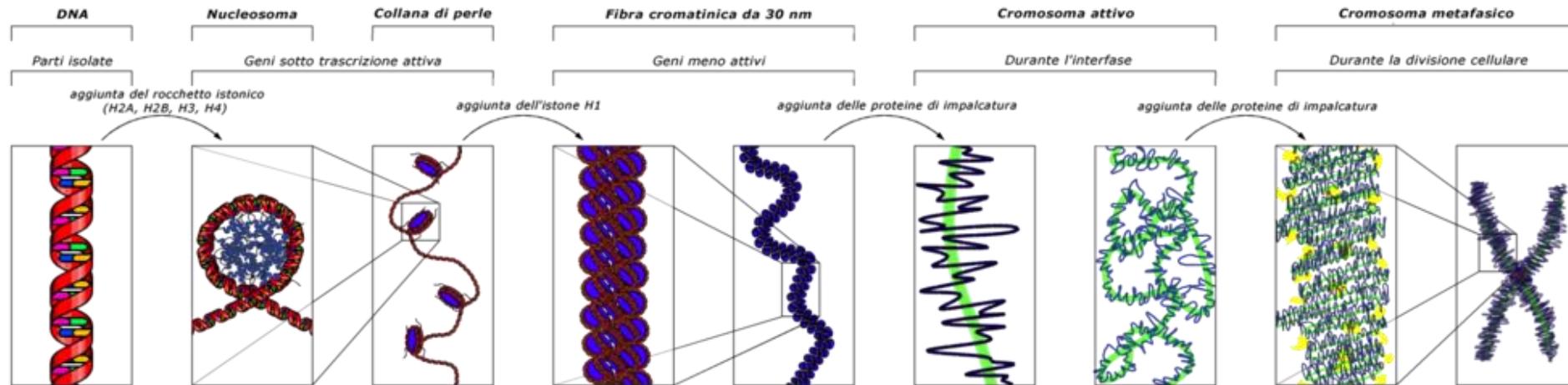
Problemi

della struttura a doppia elica:

in processi come per esempio la replicazione, che richiedono la separazione (apertura) delle catene, la doppia elica dà luogo a strutture **SUPERAVVOLTE**. Questa conformazione interferisce in processi molto importanti per la cellula.



Anche se l'informazione genetica è codificata linearmente, la regolazione della sua replicazione ed espressione dipende dalla sua struttura tridimensionale o topologia

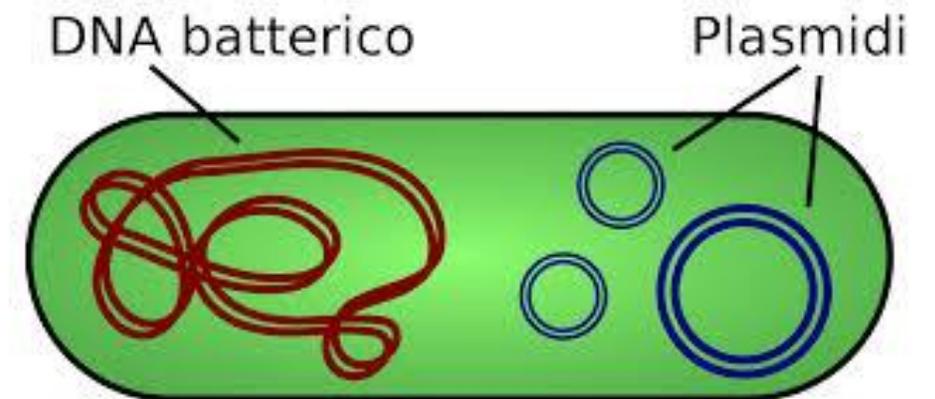
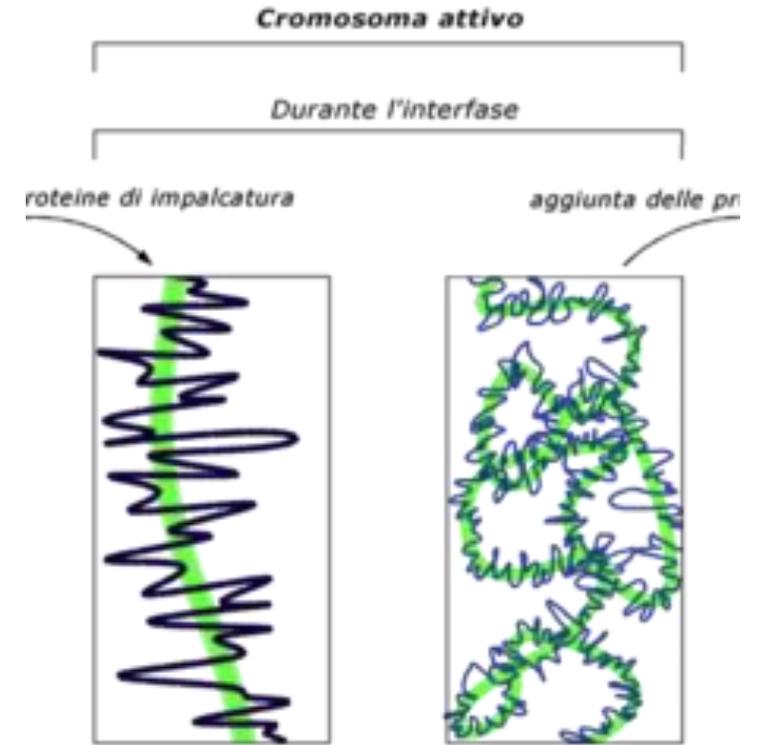


Topologia del materiale genetico

Partiamo del presupposto che il DNA ha l'estremità ancorate e senza possibilità di rotare, sia

- A segmenti, legandosi a delle proteine scaffold negli eucarioti
- Come il cromosoma batterico: circolare chiuso

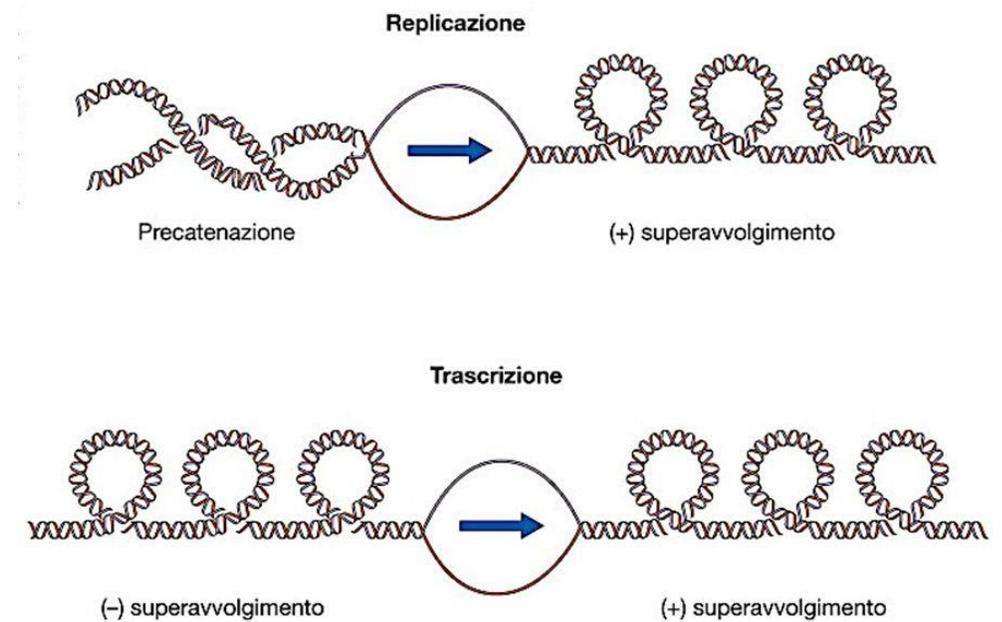
In queste condizioni, se vogliamo alterare la topologia, dobbiamo indurre delle aperture transienti a uno o due filamenti del DNA



La topologia (o arrangiamento tridimensionale) del DNA è importante perché regola ogni processo che richiede l'apertura o alterazione dell'elica del DNA e che determinano la vita cellulare:

- La replicazione e segregazione
- trascrizione
- condensazione nel nucleo cellulare
- Riparazione

Superavvolgimento del DNA



Il DNA si trova in uno stato naturale
di superavvolgimento

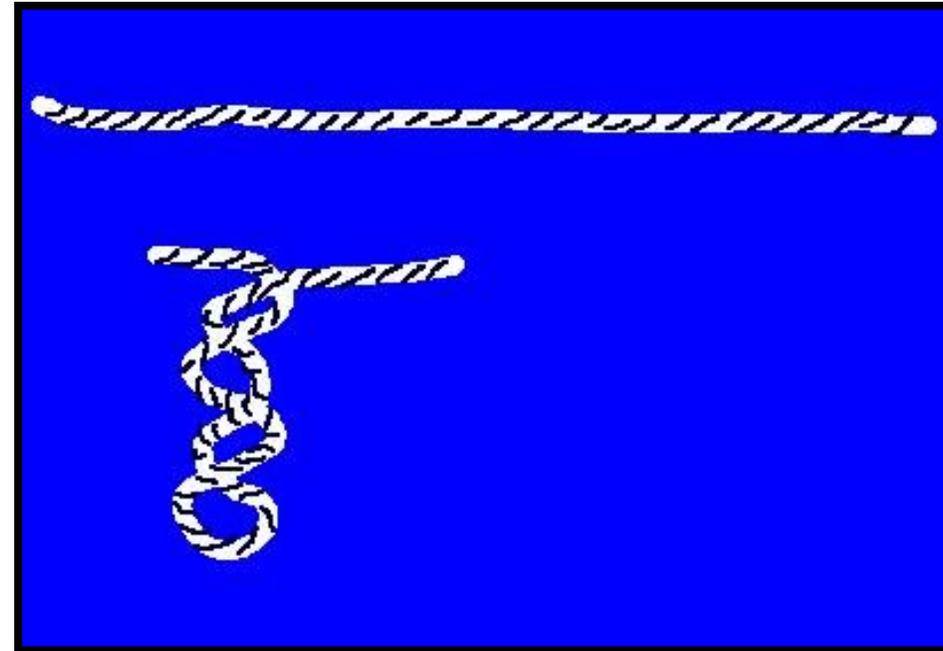
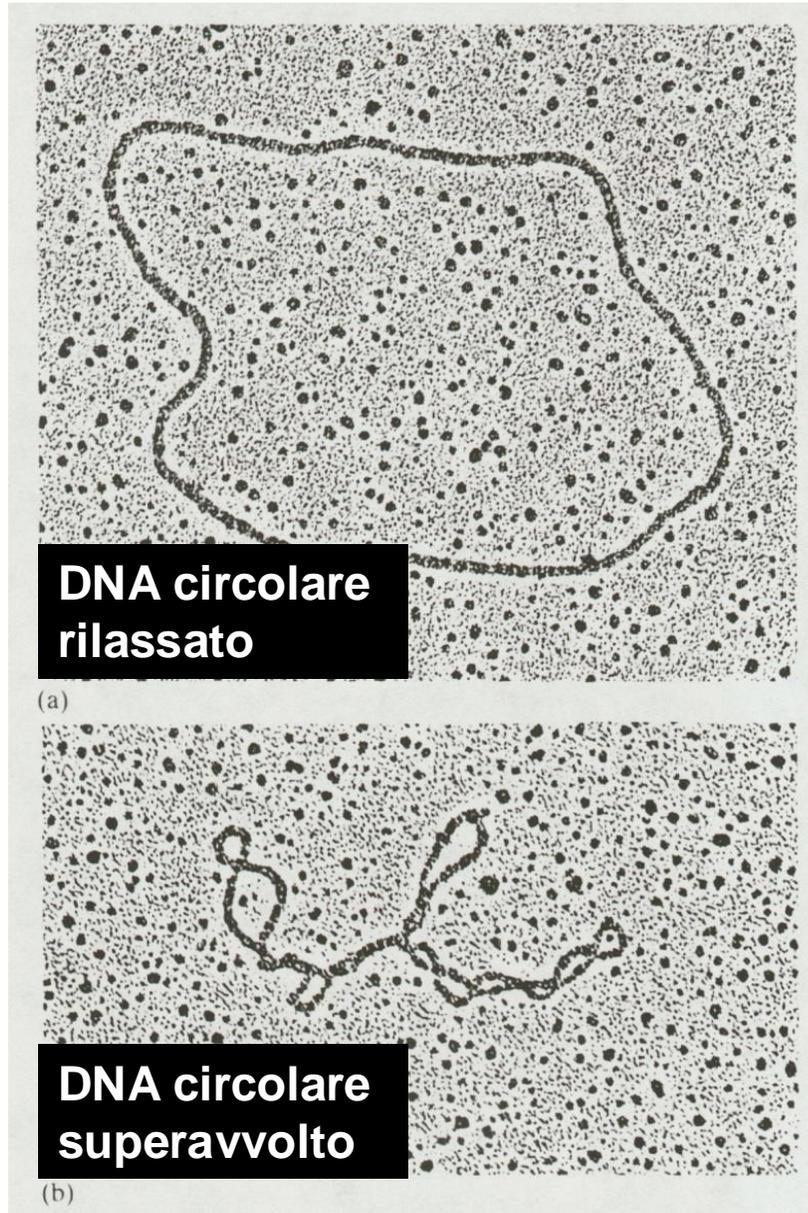
Il superavvolgimento induce uno stress torsionale che se distribuito liberamente sulla molecola indurrà la creazione di torsioni della doppia elica



Il superavvolgimento deve essere controllato!

Topologia del DNA

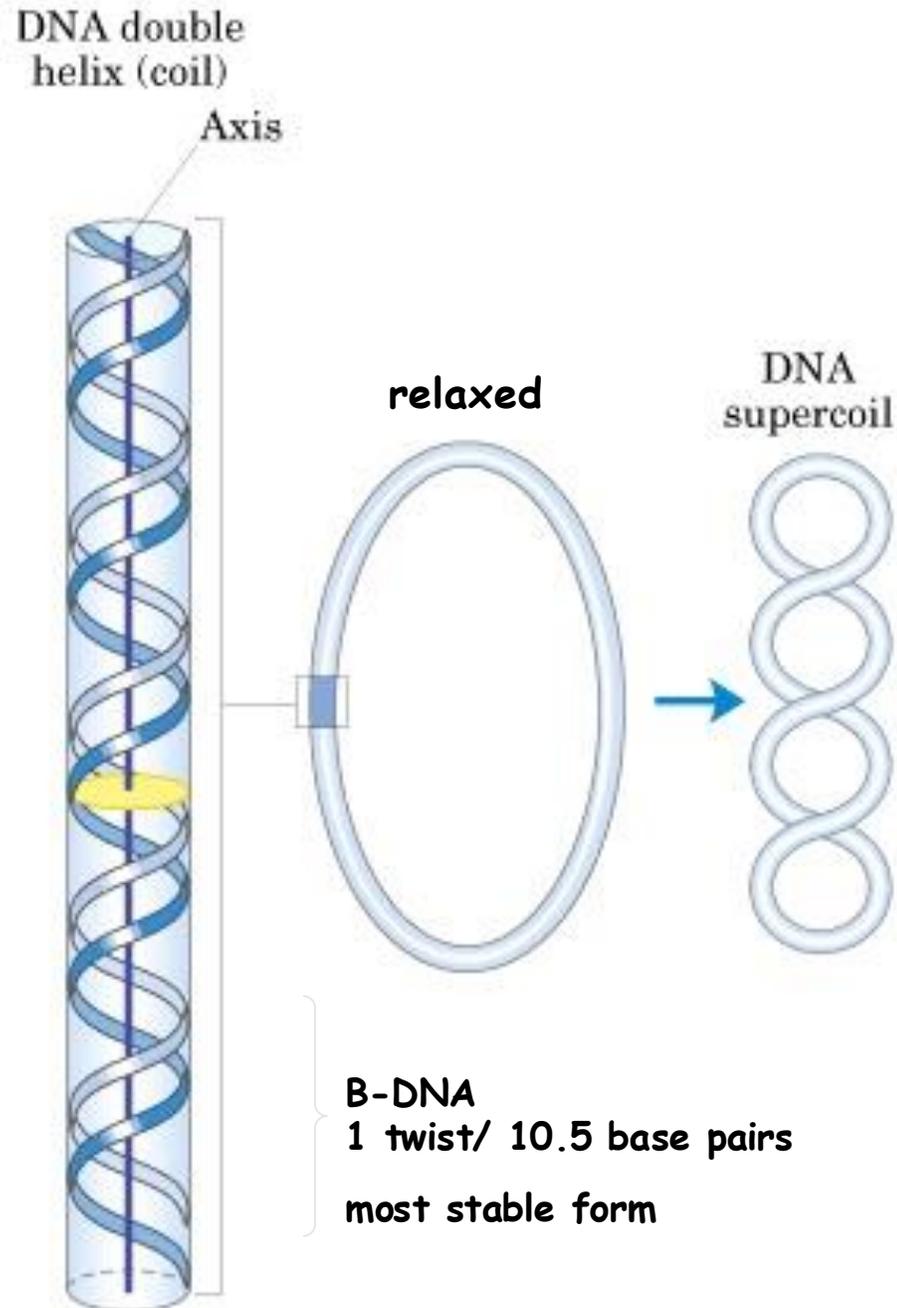
DNA superavvolto (supercoiling)



Il DNA forma strutture arrotolate in maniera analoga al cavo dei “vecchi” telefoni



Topologia del DNA



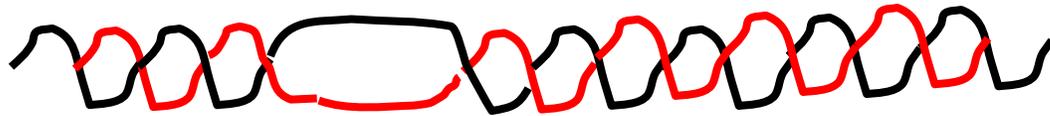
Il termine “superavvolgimento” o “superelica” si riferisce all'avvolgimento dell'asse del DNA nello spazio tridimensionale

DNA superavvolto si trova nel:

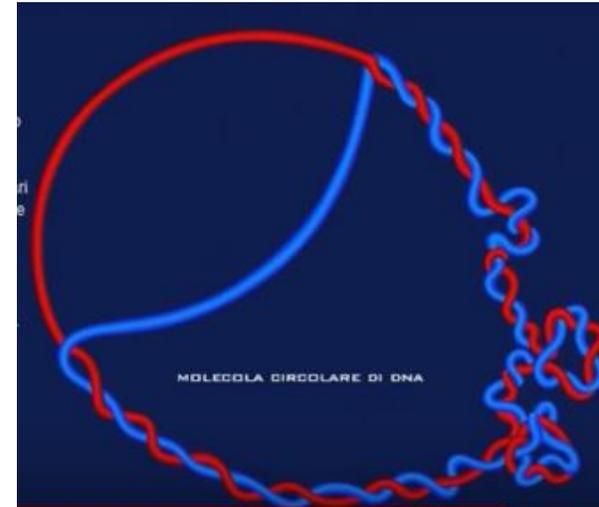
- DNA circolare chiuso
- DNA lineari le cui estremità sono ancorate (strutture del cromosoma)

DNA superavvolto contiene, come in una molla, **energia** che usa per aprire la doppia elica alle origini di replicazione o nella regione dei promotori.

Lo srotolamento locale del DNA dovuto alla separazione dei due filamenti introduce superavvolgimenti a monte o a valle dell'apertura



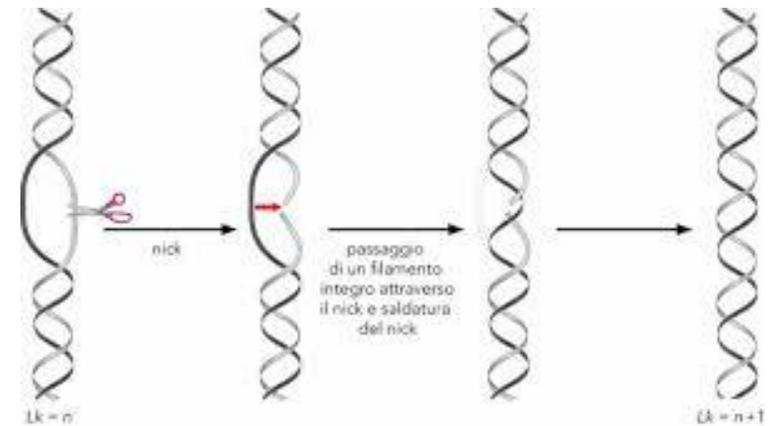
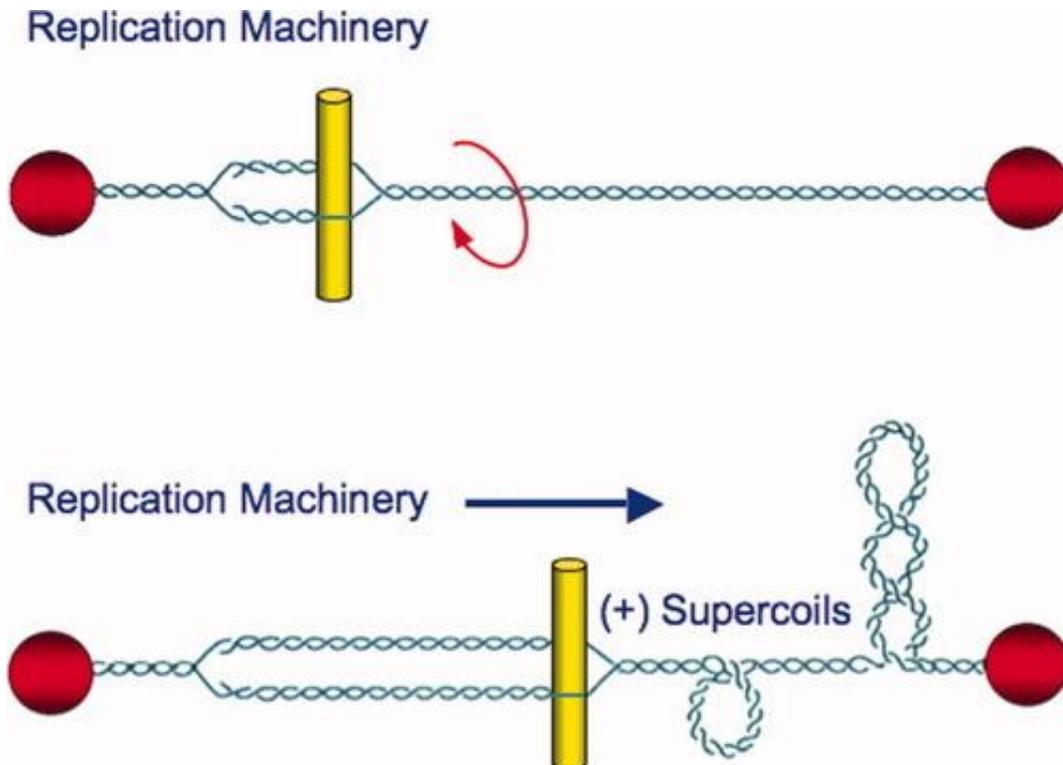
Nelle molecole di DNA circolari chiuse gli avvolgimenti non possono annullarsi alla fine dell'elica, come accadrebbe se la molecola fosse lineare.



Il superavvolgimento deve essere controllato

Il superavvolgimento deve essere controllato e a questo scopo gli organismo possiedono una classe di enzimi chiamati **TOPOISOMERASI**

Le Topoisomerasi hanno la capacita' di tagliare in maniera transiente e controllata uno o due filamenti del DNA



Parametri che definiscono la topologia del DNA

Numero di Legame (Lk)

Twist (Tw: torsione)

Writhe (Wr: contorsione)

Equazione di Fuller

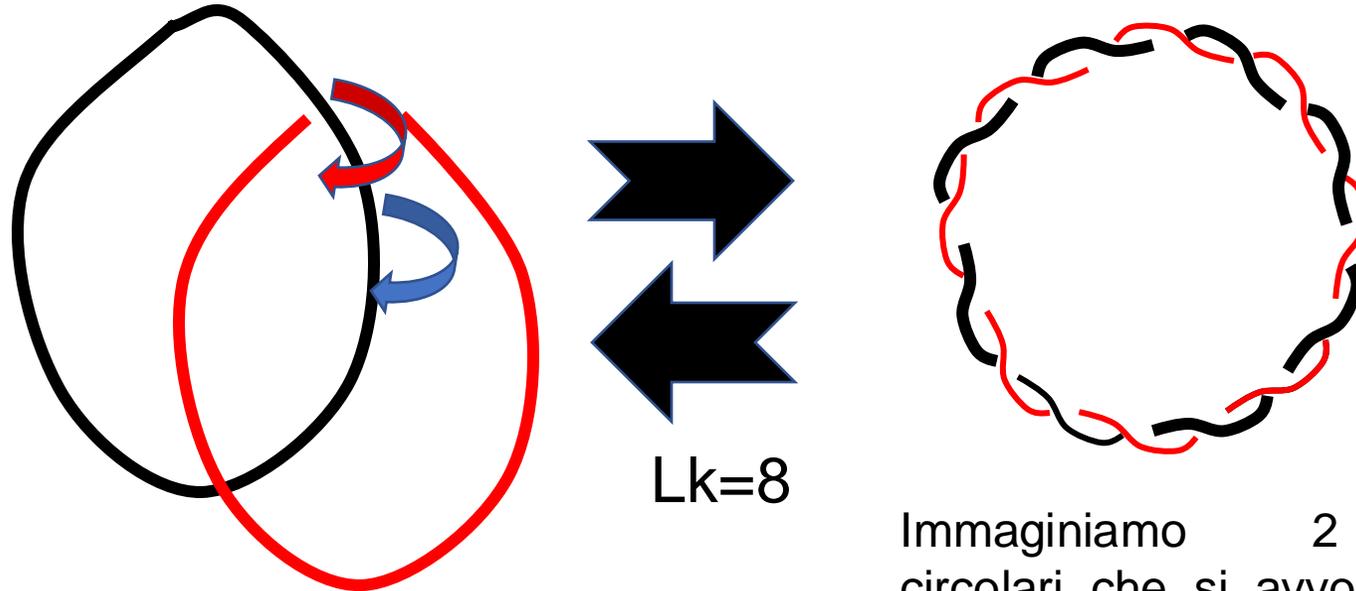
Linking number Twist Writhe

$$Lk = Tw + Wr$$

Questa equazione descrive le possibili conformazioni che il DNA assume nello spazio tridimensionale

Topologia del DNA

Numero di legame (Lk: Linking number)



Immaginiamo 2 filamenti circolari che si avvolgono uno intorno l'altro e si chiudono

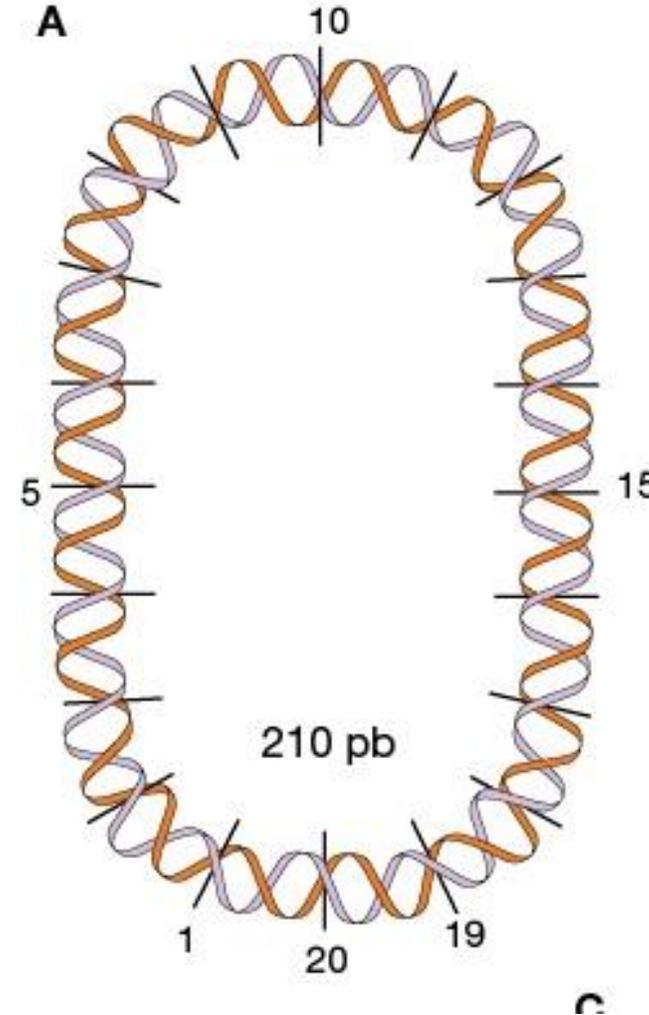
Numero di Legame: Il numero di volte che un filamento deve passare attraverso l'altro (aperto in solo punto) in modo che possano essere completamente separati e richiusi come filamenti singoli.

Topologia del DNA

Numero di legame (Lk, L)

$$Lk = \frac{\text{Lunghezza della molecola (pb)}}{\text{pb per giro d'elica}}$$

$$L = 210 \text{ pb} / 10.5 = 20$$

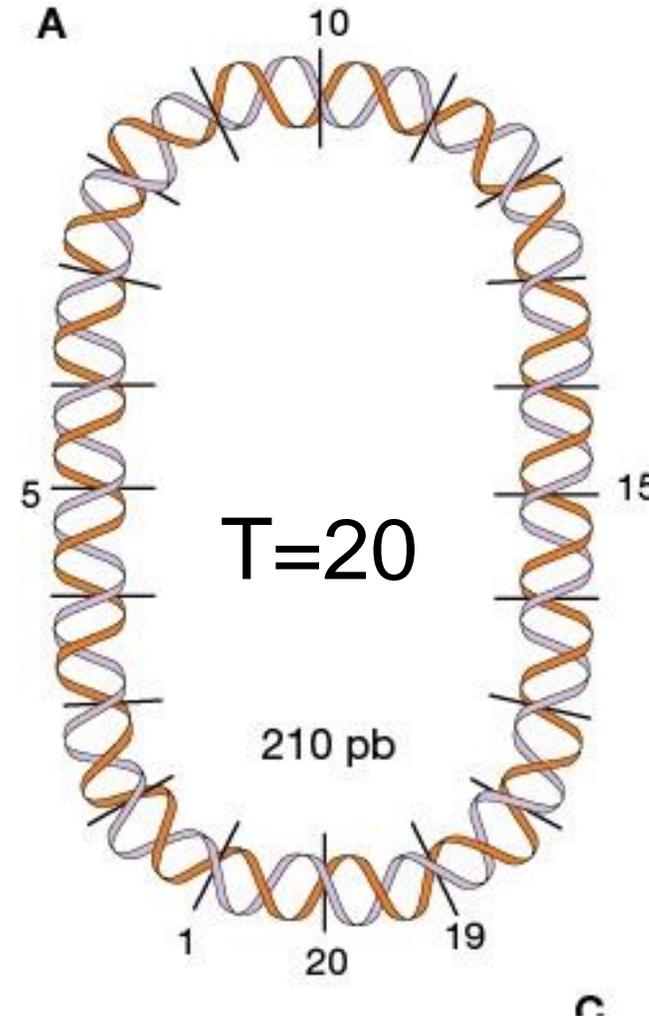


Topologia del DNA

Twist (Tw, T)

Numero di giri della doppia elica rispetto all'asse centrale.

Definisce il grado di avvitemento della doppia elica



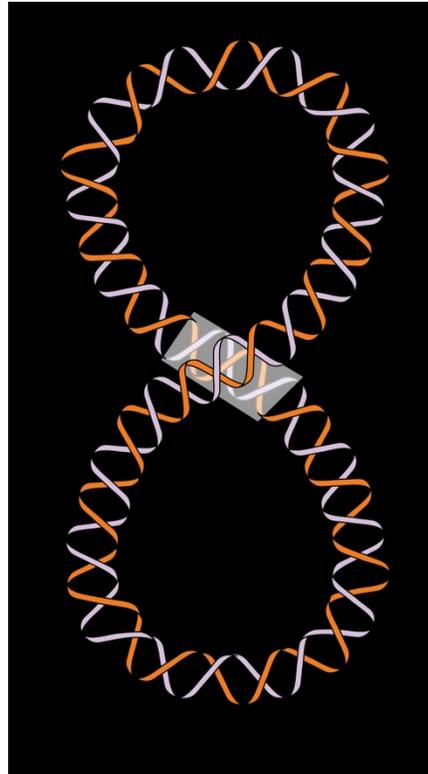
Topologia del DNA

Writhe (W_r , W)

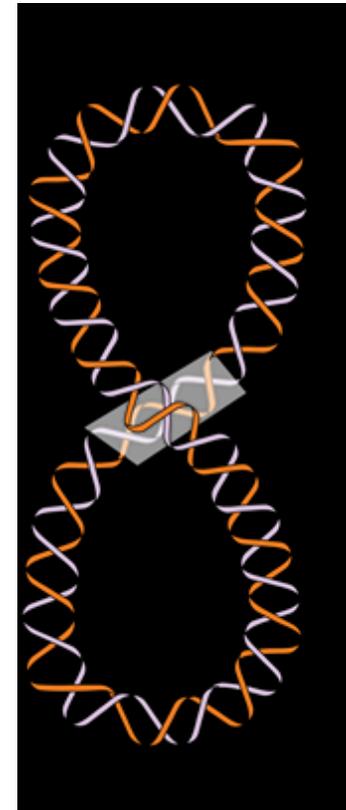
Numero di volte che all'asse centrale della doppia elica incontra se stesso formando i superavvolgimenti

Può avere un valore positivo o negativo a seconda del senso del superavvolgimento

Superavvolgimento
negativo (levogiro)



Superavvolgimento
positivo (destrorso)



Il superavvolgimento è negativo quando consiste in una rotazione in senso opposto a quello di avvolgimento del DNA.

Il superavvolgimento è positivo quando la rotazione è nella stessa direzione dell'avvolgimento del duplex.

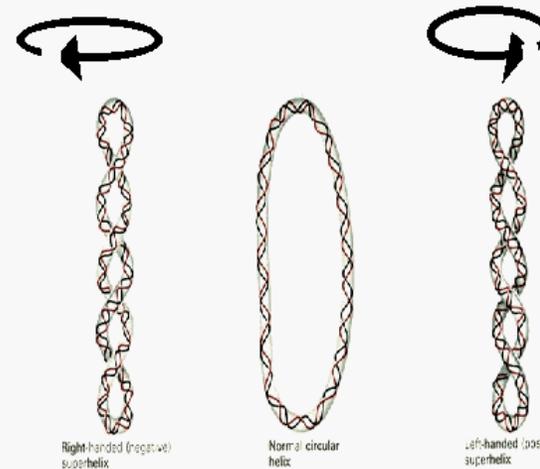
•Direzione dell'avvolgimento del DNA:



(nelle forme A e B del duplex di DNA)

DNA destrorso

•Direzione del superavvolgimento del DNA



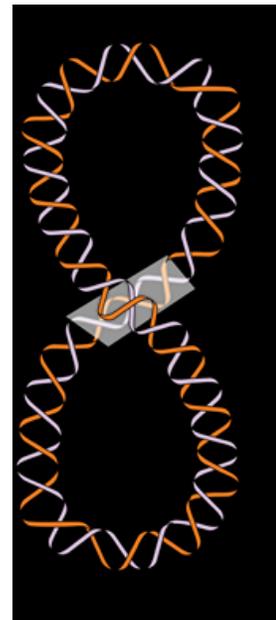
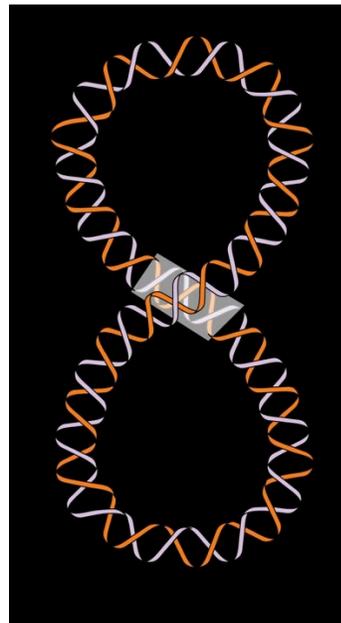
superavvolgimenti
negativi
(sinistrorsi)

DNA non
superavvolto

superavvolgimenti
positivi
(destrorsi)

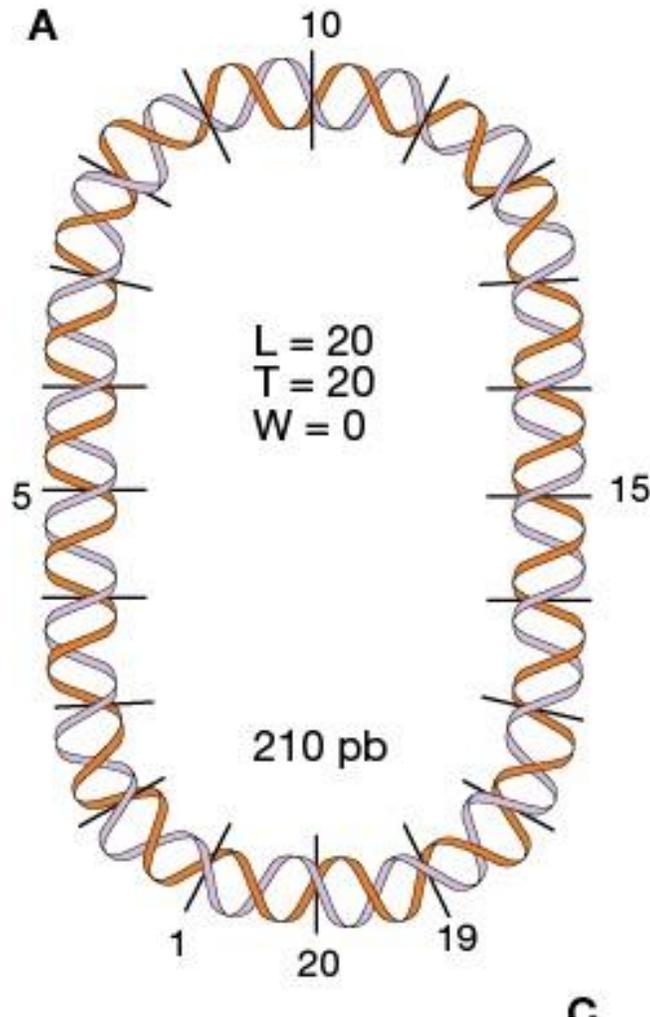
In una molecola di DNA circolare covalentemente chiusa (cccDNA) il Linking Number (Lk) rimane sempre costante

I parametri twist e Writhe si alterano in conseguenza perché la molecola di DNA tende a tornare alla conformazione di DNA B



Topologia del DNA

DNA rilassato



$$Lk = Tw + Wr$$

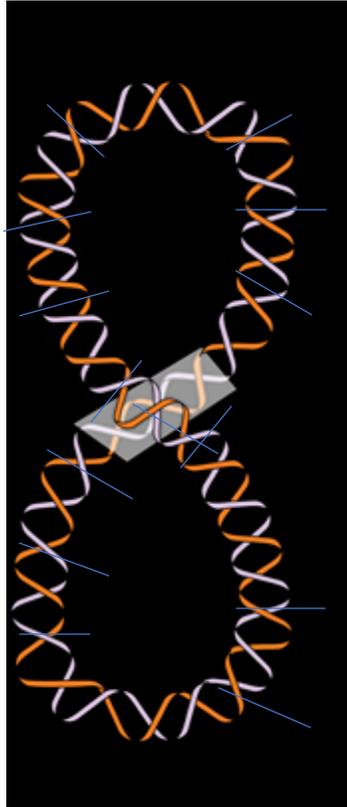
$$Lk = 210/10.5 = 20$$

$$Tw = 20$$

$$Wr = 0$$

$$\boxed{Lk = Tw + Wr}$$
$$\boxed{20 = 20 + 0}$$

Superavvolgimento positivo



$$Lk = Tw + Wr$$

$$Lk = 210 / 10.5 = 20$$

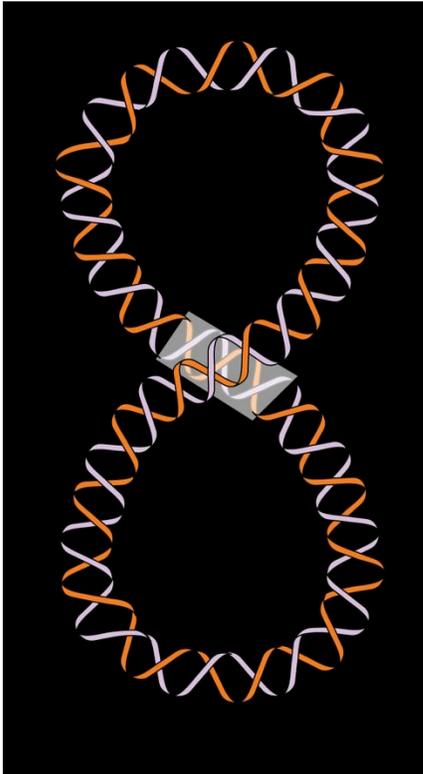
$$Tw = 19$$

$$Wr = +1$$

$$Lk = Tw + Wr$$

$$20 = 19 + 1$$

Superavvolgimento
negativo



$$Lk = Tw + Wr$$

$$Lk = 210 / 10.5 = 20$$

$$Tw = 21$$

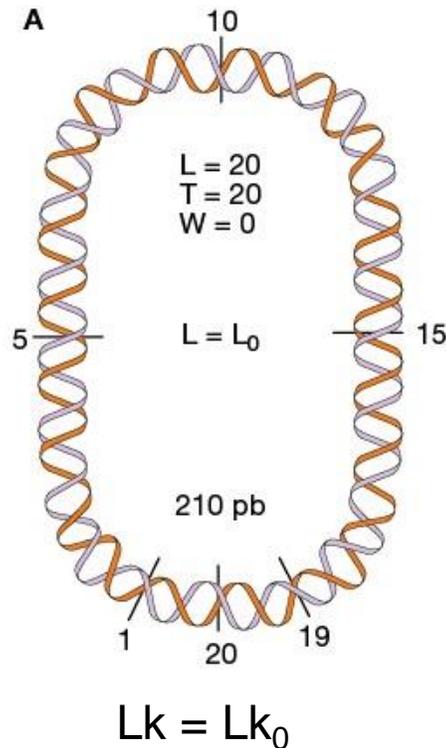
$$Wr = -1$$

$$Lk = Tw + Wr$$

$$20 = 21 + (-1)$$

$$Lk = Tw + Wr$$

se consideriamo un **cccDNA (DNA circolare chiuso covalentemente)** **privo di superavvolgimenti** (che abbiamo definito **rilassato**) il suo twist corrisponde a quello del DNA in forma B in condizioni fisiologiche (circa 10,5 paia di basi per giro d'elica).



Il linking number (Lk) di questo DNA è indicato dal simbolo **Lk₀**, e rimane costante sempre e quando la molecola rimane sempre chiusa.

Per un cccDNA di 10500 paia di basi Lk sarà uguale a +1000

$$Lk = 10500 / 10.5 = +1000$$

Lk₀ = numero di legame di una molecola di DNA circolare chiusa completamente rilassata

Calcolare il numero Lk_0

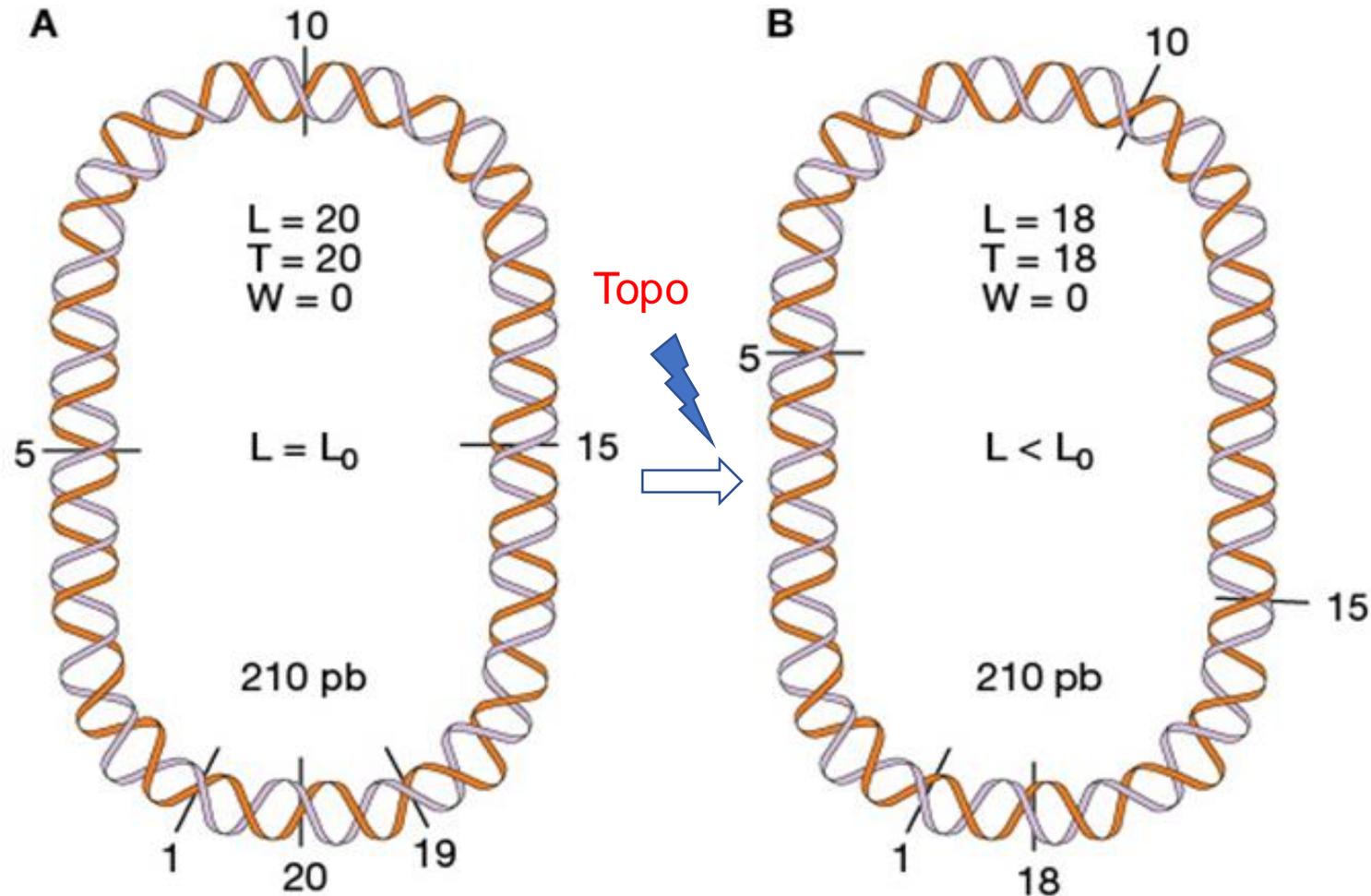
A) In una molecola di DNA circolare chiuso rilassata (Lk_0)

$$Lk_0 = \frac{\text{Numero totale di bp}}{\text{Numero of bp per giro}}$$

Esempio: DNA plasmidico lungo 3,150 bp

$$Lk_0 = \frac{3,150 \text{ bp}}{10.5 \text{ bp}} = 300$$

Il Lk può cambiare con l'azione delle Topoisomerasi



Per definire il **grado di superelicità** o superavvolgimento di una molecola di DNA o **confrontare quello di 2 molecole** dobbiamo considerare:

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0$$

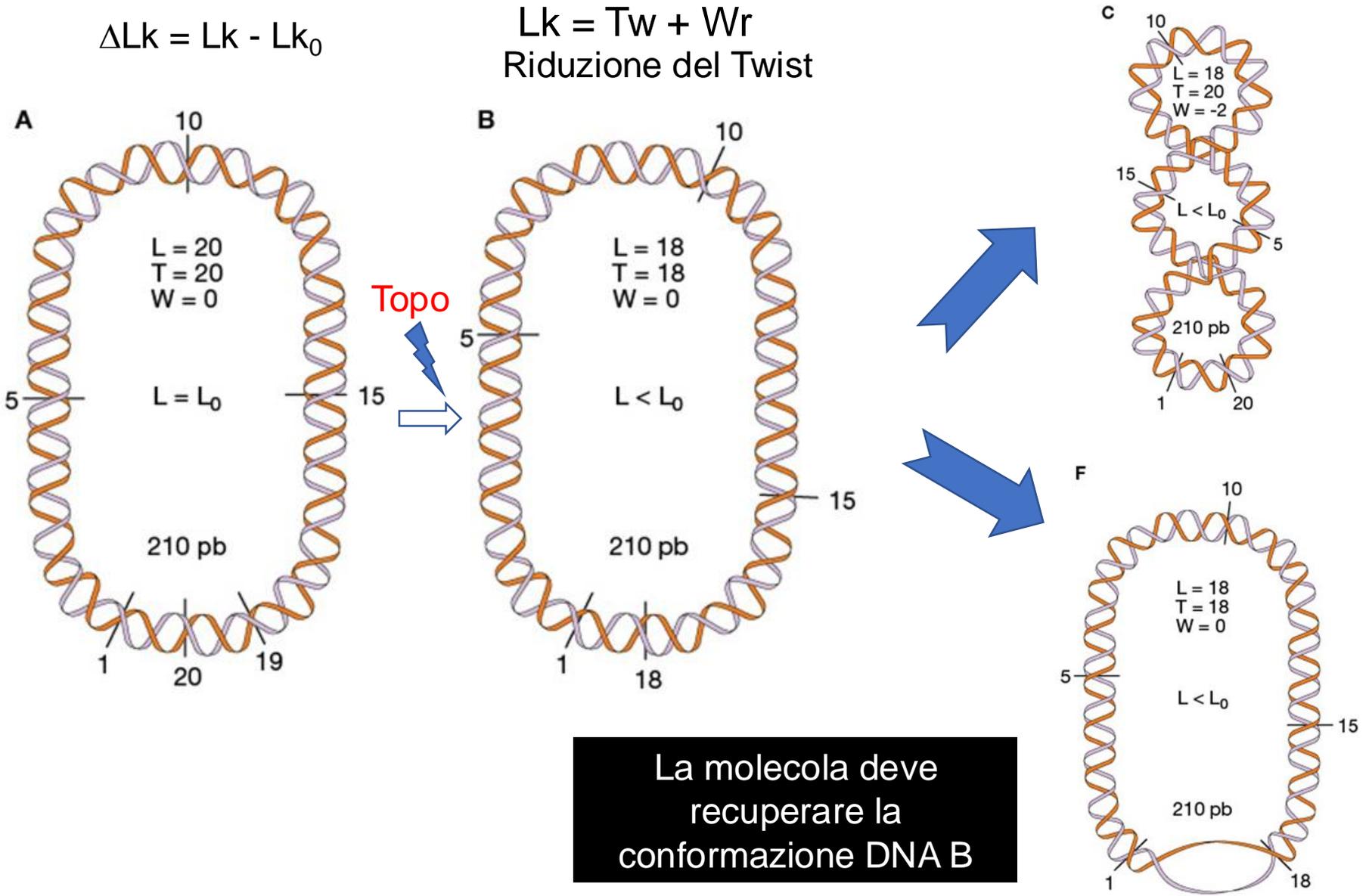


Il numero di legame può cambiare se uno o i due filamenti del duplex vengono tagliati

$\Delta Lk < 0$, $Lk < Lk_0$ --- \rightarrow DNA superavvolto negativamente

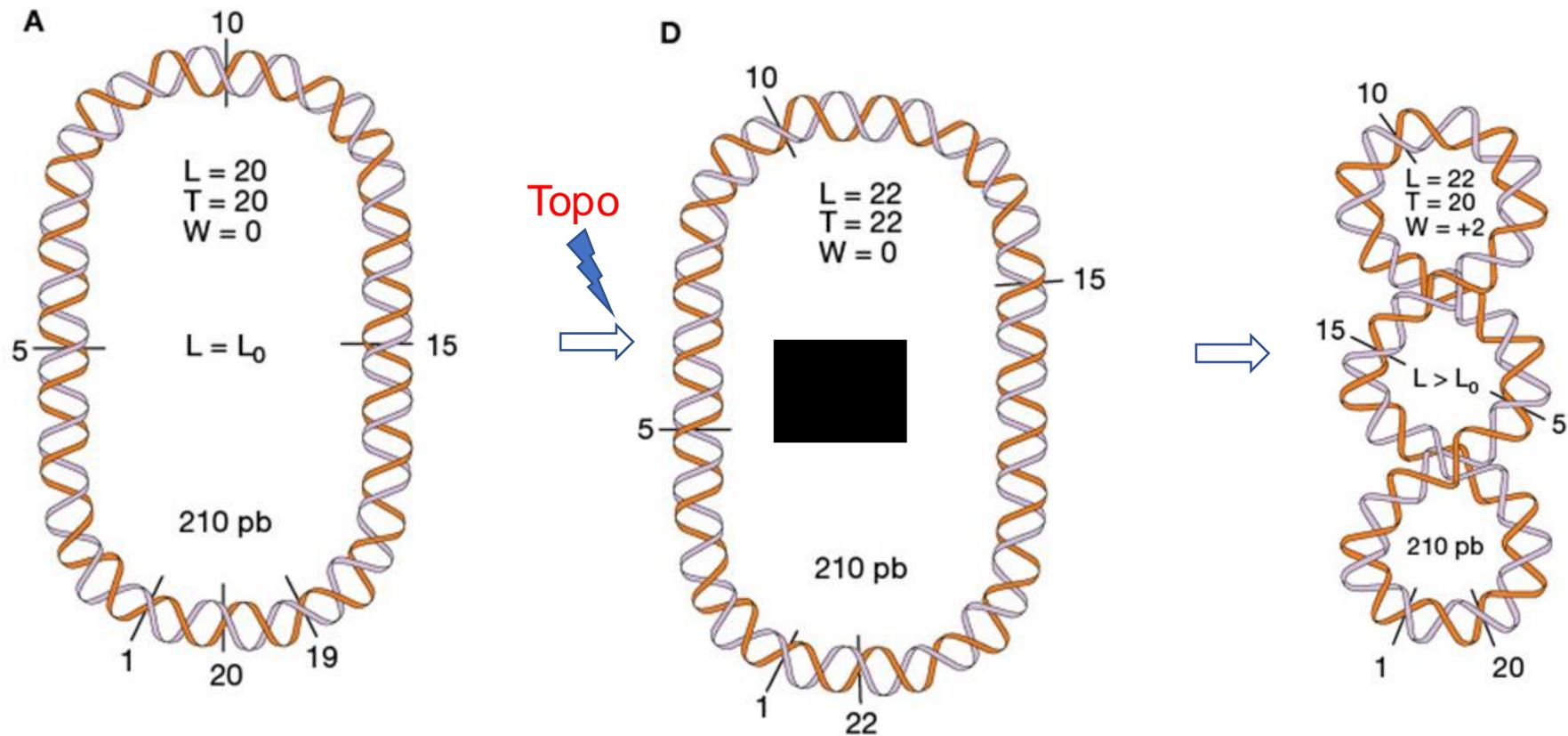
$\Delta Lk > 0$, $Lk > Lk_0$ --- \rightarrow DNA superavvolto positivamente

$\Delta Lk < 0$, $Lk < Lk_0$ --- \rightarrow DNA superavvolto negativamente



La molecola deve recuperare la conformazione DNA B

$\Delta Lk > 0$, $Lk > Lk_0$ --- \rightarrow DNA superavvolto positivamente



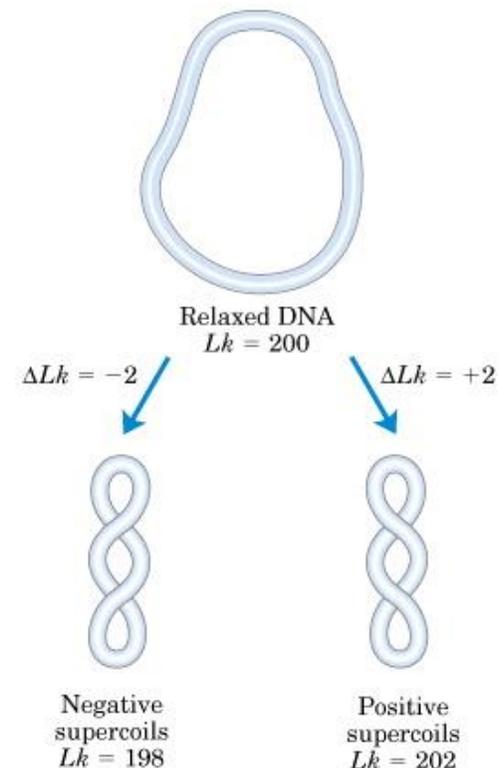
Supercoils positivi e negativi

Supercoils negativi

- Generati "svolgendo" una molecola di DNA circolare chiusa
- Il valore ΔLk è un intero negativo
- Lk più basso di Lk_0

Supercoils positivi

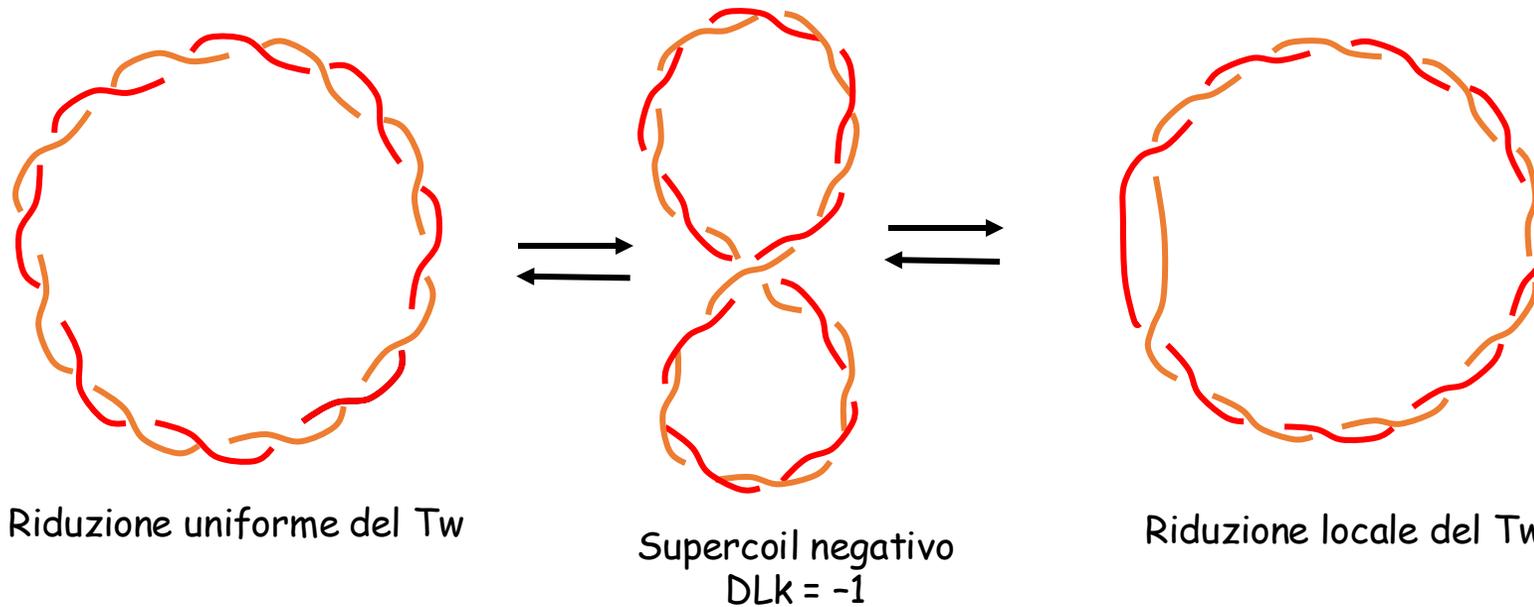
- Generati "riavvolgendo" una molecola di DNA circolare chiusa
- Il valore ΔLk è un intero positivo
- Lk più alto di Lk_0



L'energia libera dei Superavvolgimenti Negativi
favorisce l'apertura del DNA

$$Lk = Tw + Wr$$

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0$$



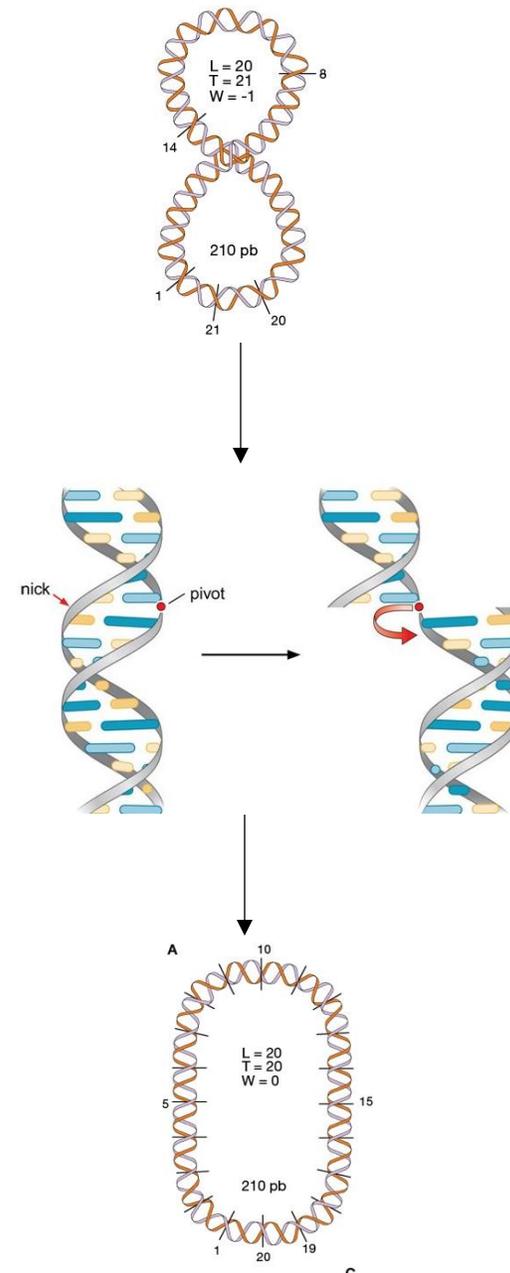
I supercoils negativi sono necessari per l'inizio della trascrizione

I supercoils positivi resistono alla denaturazione

Gli eventuali superavvolgimenti presenti su un cccDNA non rilassato, invece, possono essere **rimossi con degli enzimi TOPOISOMERASI**, che idrolizzano uno o più (dipendendo del numero di superavvolgimenti) legami fosfodiesterici in ciascuna molecola.

Una volta che il DNA è stato interrotto, ovvero si forma un **nick** (per nick si intende l'interruzione di un legame fosfodiesterico su un solo filamento della doppia elica) esso non è più topologicamente costretto e i due filamenti possono ruotare l'uno rispetto all'altro **in modo controllato** per recuperare il Lk_0 (e la conformazione DNA B).

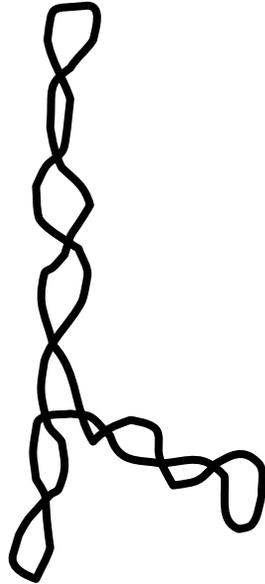
Se il nick viene riparato, il cccDNA sarà rilassato ed avrà un Lk uguale a Lk_0



Ci sono due tipi di superavvolgimento:

Plectonemico

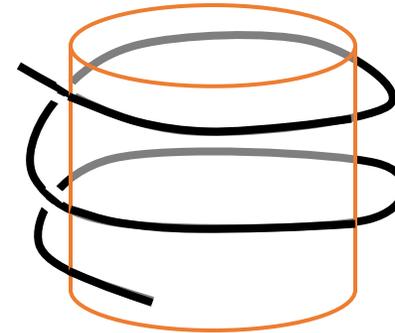
avvolgimento del DNA nudo
su se stesso



I superavvolgimenti plectonemici sono generati a partire da forze topologiche o torsionali intrinseche al DNA

Toroidale o solenoidale

DNA avvolto intorno all'ottamero istonico u altre proteine



I superavvolgimenti toroidali sono generati dal piegamento che il DNA subisce a seguito dell'interazione con alcune proteine (istoni, DNA girasi, etc).

Microfotografie elettroniche di molecole di DNA
circolare chiuso con superavvolgimento

Plectonemico

Rilassato

Gradi crescenti di superavvolgimento

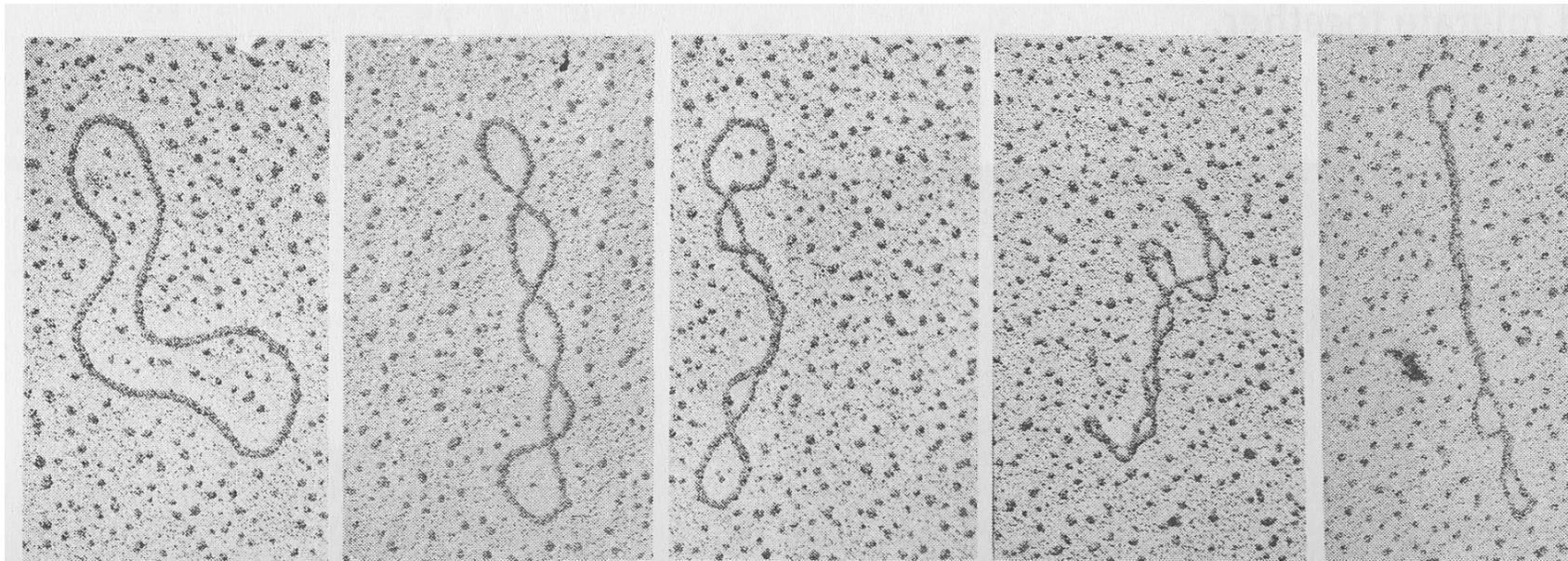
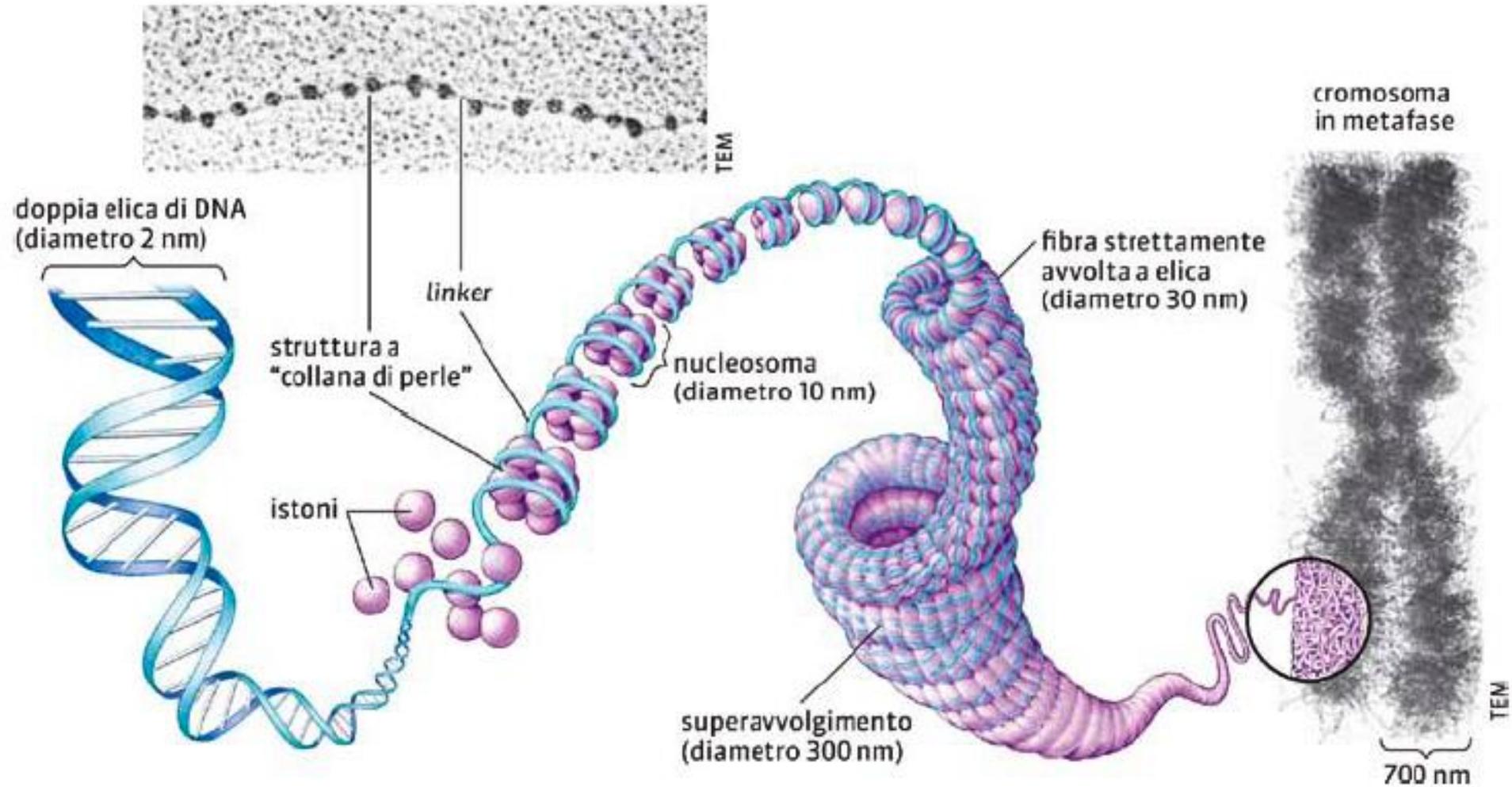


Figure 1-24

Electron micrographs of DNA (mini ColE1 plasmid dimer, 5 kb), selected to show degrees of supercoiling from fully relaxed (left) to tightly coiled (right). (Courtesy of Ms L Polder)

From Kornberg and Baker, DNA Replication
2nd edition, W.H. Freeman, 1992.

Toroidale o solenoidale



Poiché, ΔLk e Lk_0 sono dipendenti dalla lunghezza del DNA, è più semplice esprimere il superavvolgimento della molecola come:

«densità di superelica» σ

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$$

Se sigma è negativo -> il DNA è lasco

Se sigma è positivo -> il DNA è compatto

Le molecole di DNA circolare sia batteriche che eucariotiche sono **normalmente superavvolte negativamente con un valore di σ di circa -0,06**. In questo modo, nei DNA superavvolti la separazione dei due filamenti è favorita rispetto a quanto succede nel DNA rilassato.

Problem 1:

Calcolare la densita' di superelica di un plasmide di DNA lungo 5000 bp (base pairs) contenente 25 superavvolgimenti positivi (DNA B).

$$Lk_0 = 5000 / 10.5 = 476$$

$$Lk = 476 + 25 = 501$$

$$\Delta Lk = 501 - 476 = 25$$

$$\sigma = 25 / 476 = 0.05 \quad \longrightarrow \quad \text{Sono stati aggiunti un 5\% di giri positivi nella molecola del DNA}$$

DNA piu' compatto

Problem 2:

Calcolare la densita' di superelica di un plasmide di DNA lungo 4200 bp (base pairs) contenente 26 superavvolgimenti negativi (DNA B).

$$Lk_0 = 4200 / 10.5 = 400$$

$$Lk = 400 - 26 = 374$$

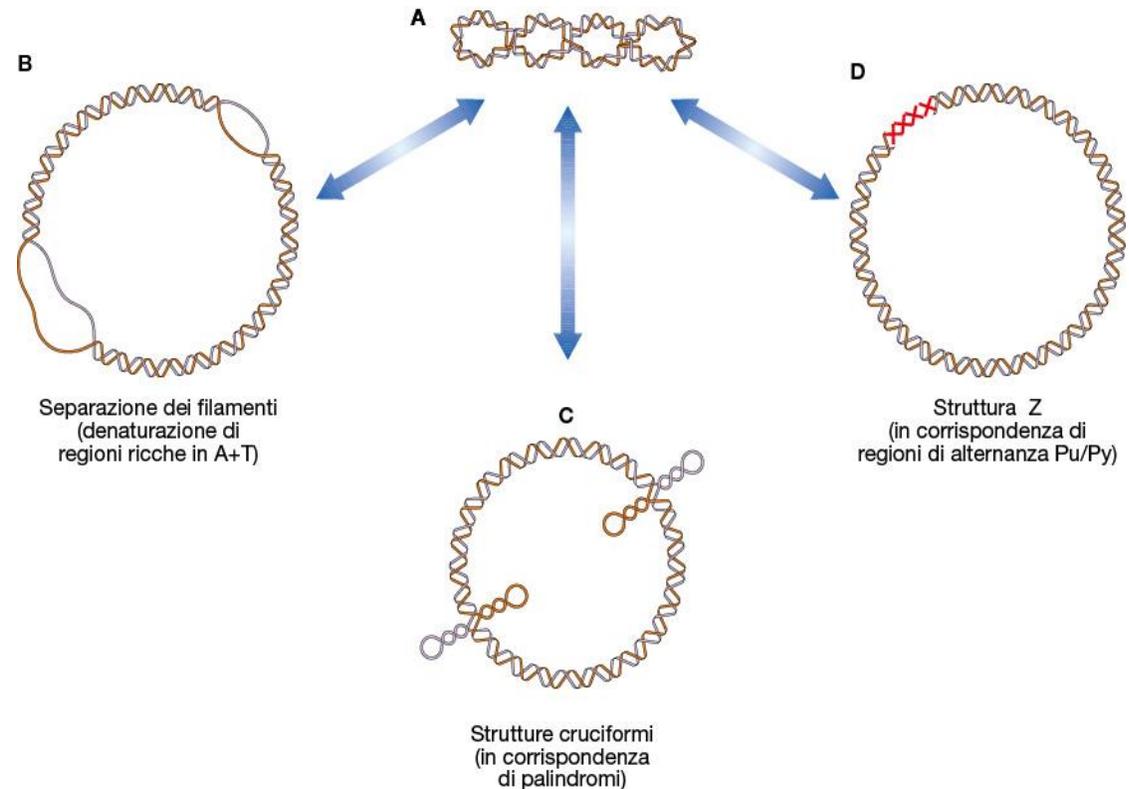
$$\Delta Lk = 374 - 400 = -26$$

$$\sigma = -26 / 400 = -0.065$$
  Sono stati aggiunti un 6,5% di giri negativi nella molecola di DNA

DNA piu' lasco

Il superavvolgimento negativo, avendo verso opposto rispetto all'avvolgimento del DNA destrorso, **causa una diminuzione delle costrizioni topologiche permettendo al DNA di subire transizioni strutturali** che non potrebbe compiere se fosse rilassato. La molecola di DNA superavvolta negativamente contiene energia libera perché tende a tornare al suo stato DNA B

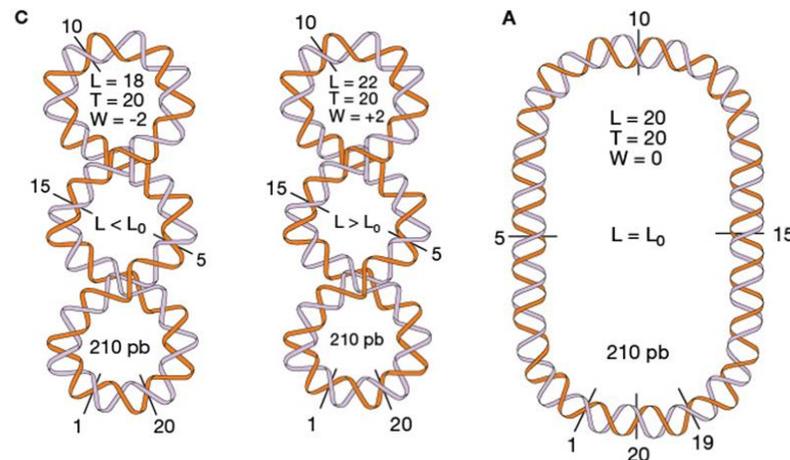
L'energia in eccesso posseduta dal DNA superavvolto negativamente, può essere utilizzata per fornire l'energia necessaria a **separare la molecola nei due filamenti che la compongono** o, almeno, per dare l'avvio a tale processo



TOPOISOMERI

cccDNAs di uguale lunghezza che differiscono solo per il numero di legame

- Stesso numero di bp, stessa sequenza ma diverso grado di superavvolgimento
- La loro formazione e interconversione necessita l'intervento di TOPOISOMERASI che tagliano uno o 2 filamenti del DNA.



I topoisomeri possono essere distinti e visualizzati mediante corsa elettroforetica in gel di Agarosio

