

DNA Topoisomerasi

- ✓ Cosa fanno le topoisomerasi?
- ✓ Famiglie di topoisomerasi
- ✓ Reazioni catalizzate dalle topoisomerasi

Cosa fanno le topoisomerase ?

- ▶ Sono degli enzimi che modificano la topologia del DNA
- ▶ mediante la creazione di un taglio transiente e controllato.
- ▶ sul DNA singolo o doppio filamento.



✓ Azione delle topoisomerase ?

Tengono sotto controllo lo stato topologico del DNA, aiutando la doppia elica o il singolo filamento ad aprirsi (se necessario) e tornare alla conformazione DNA B.

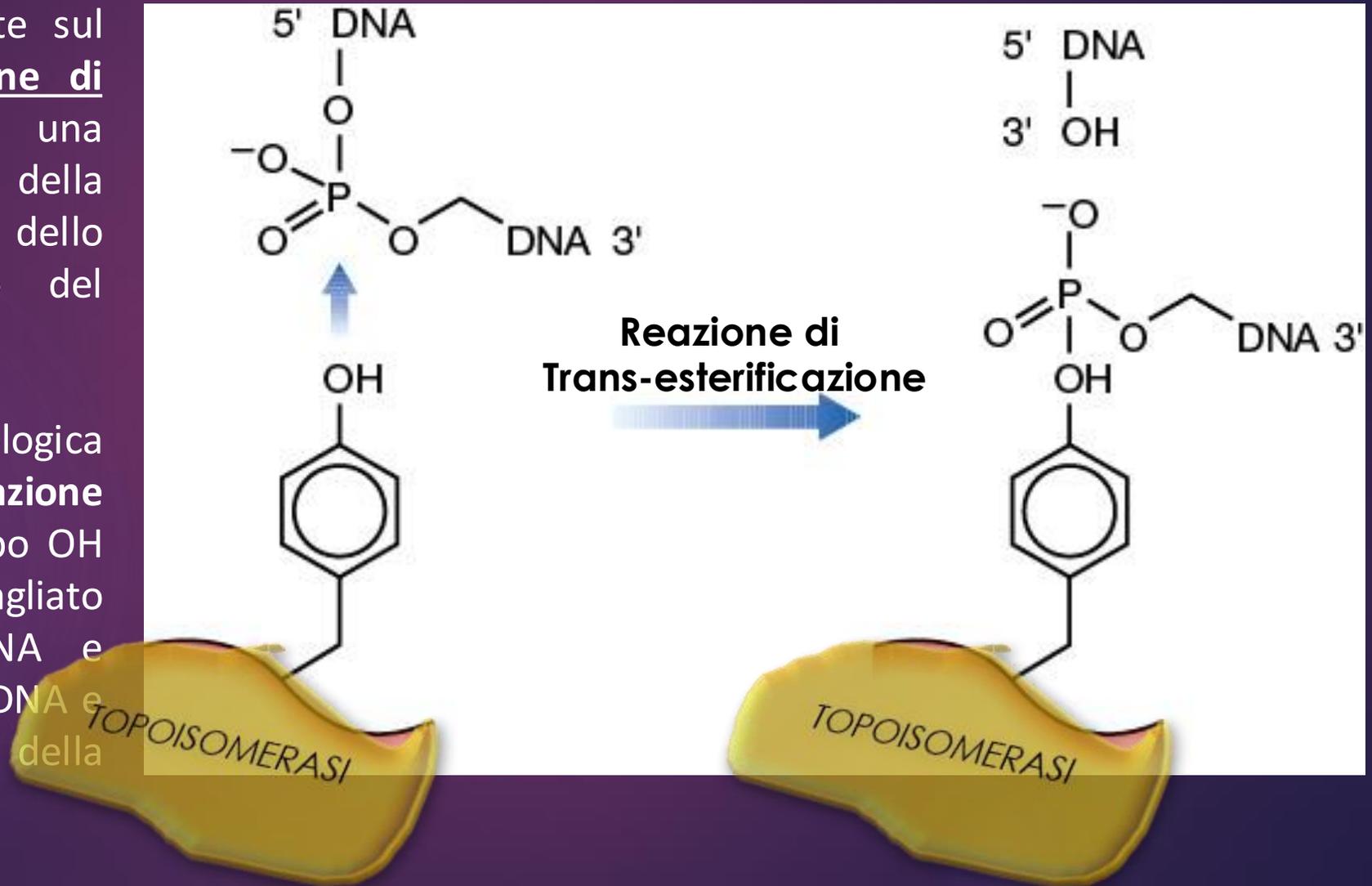
Aperto la elica, si permette ai filamenti o alla doppia elica di girare uno intorno all'altro (o passare attraverso) e rinchiudersi.

L'azione delle Topoisomerasi modifica il Lk
di una molecola di DNA circolare covalentemente chiusa
(cccDNA)

✓ Meccanismo generale: reazione di transesterificazione

Si crea un taglio transiente sul DNA grazie a una reazione di transesterificazione tra una tirosina (il Gruppo OH) della topoisomerasa e il fosfato dello scheletro zucchero-fosfato del DNA.

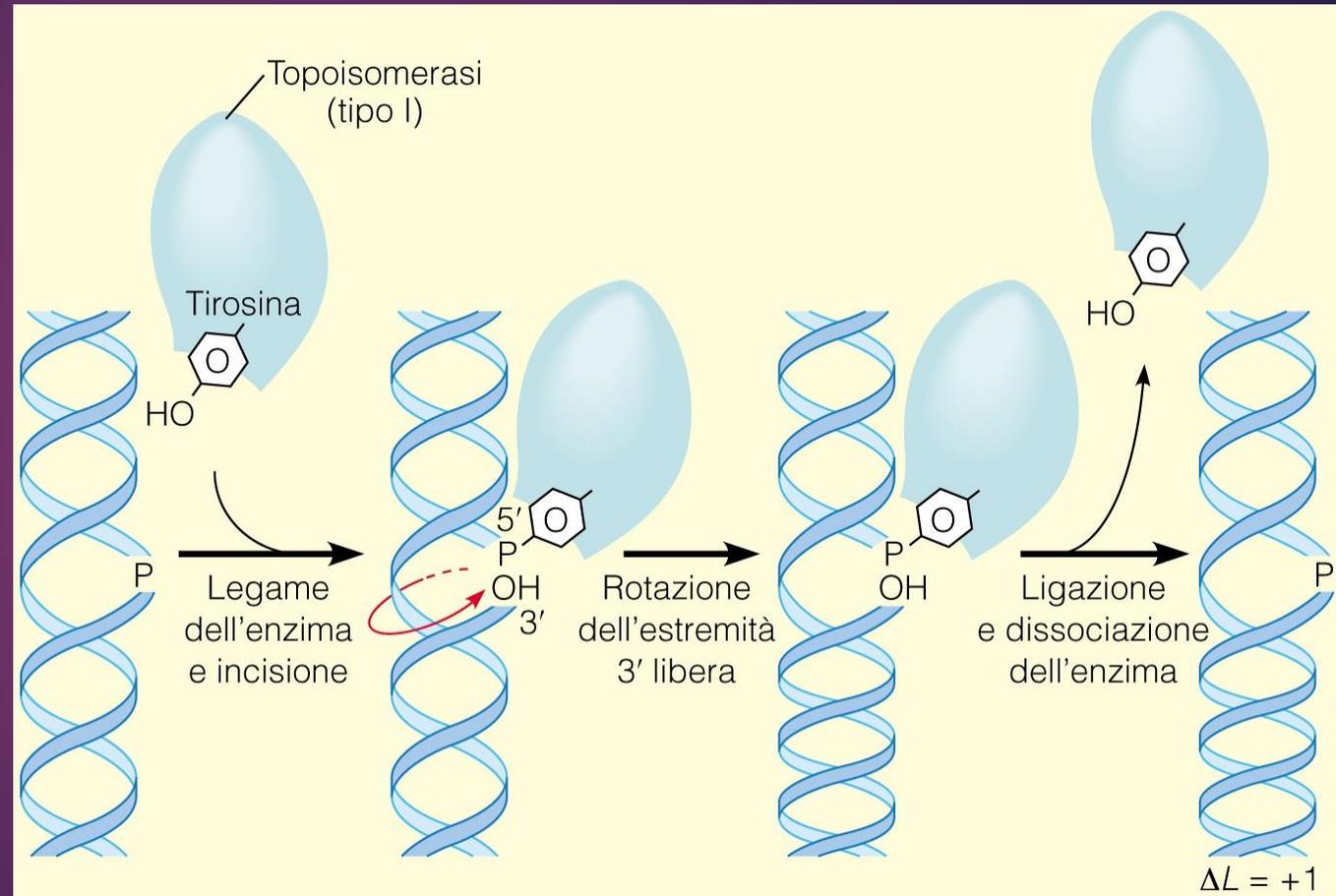
Dopo la modificazione topologica controllata, avviene la **reazione inversa** nella quale il gruppo OH libero del filamento tagliato attacca il legame Tyr-DNA e ripristina la continuit  del DNA e anche il sito attivo della topoisomerasa.



✓ Meccanismo generale

L'interazione DNA-enzima è molto importante nel meccanismo d'azione:

1. Perché conserva l'energia del legame dello scheletro zucchero-fosfato
2. Perché l'unione DNA enzima fa sì che non si perda l'integrità della molecola durante l'evento di taglio

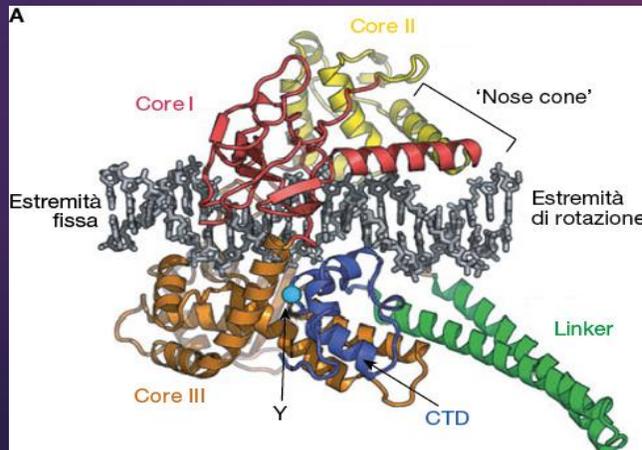


✓ Clasificazione delle topoisomerase

In funzione del numero di filamenti di DNA che sono tagliati durante la reazione catalitica, e il meccanismo usato si distinguono 2 tipi di topoisomerasi:

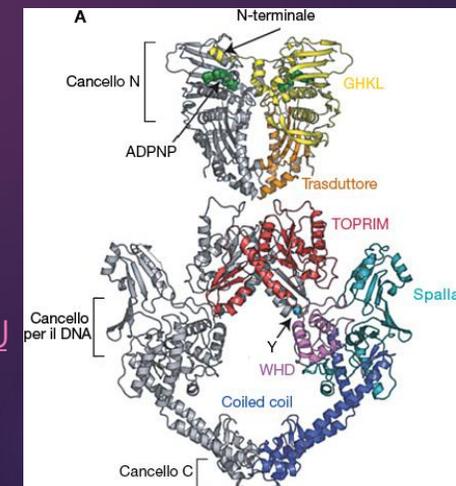
1. Topo-I

- L'enzima introduce una **singola rottura transiente** su uno dei filamenti della doppia elica passando l'altro singolo filamento attraverso o intorno.
- Ad ogni ciclo variano il numero di legame (Lk) di una unità.
- **Monomeriche**
- **Non richiedono energia**



2. Topo-II

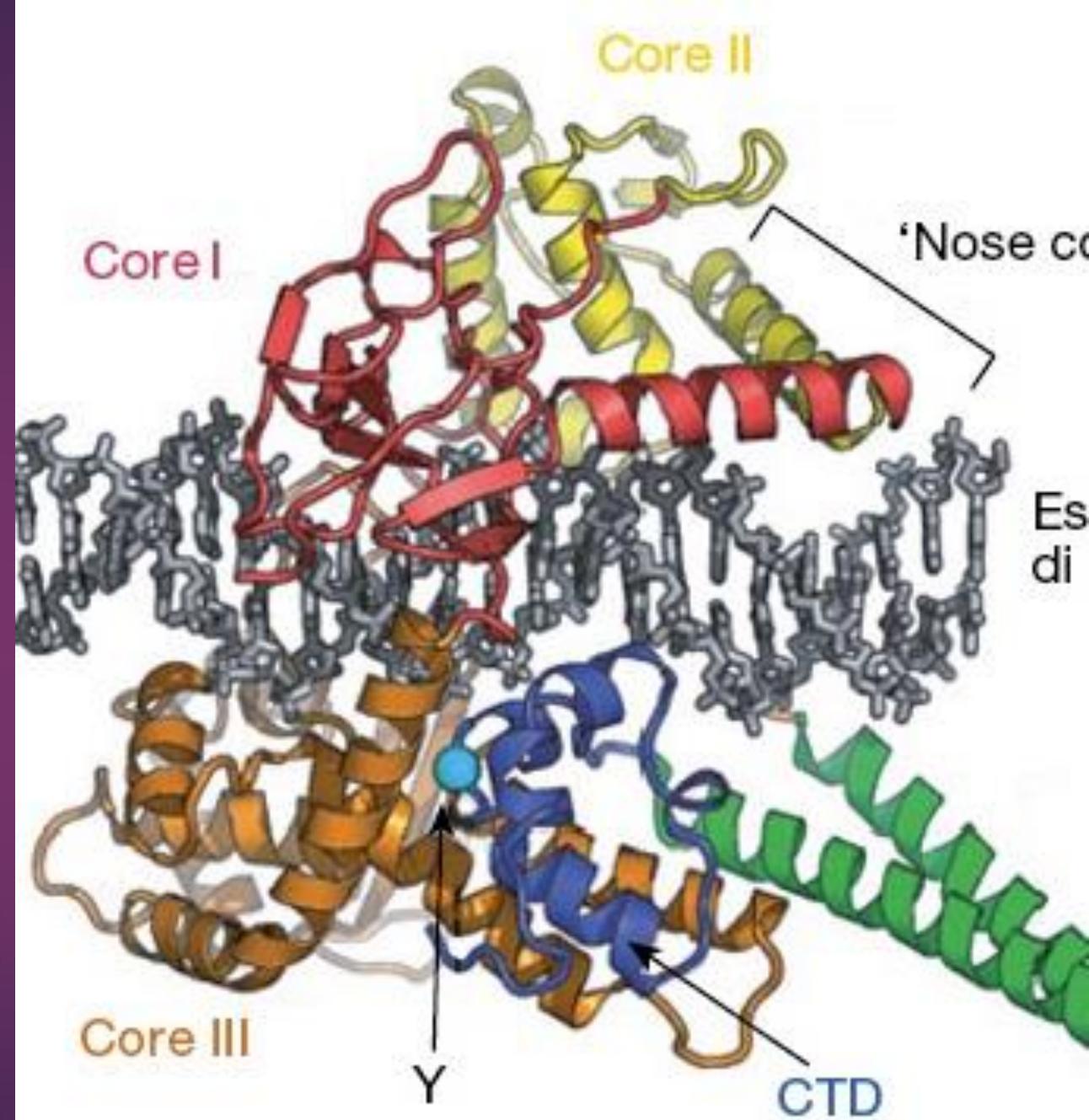
- L'enzima introduce un **taglio sfalsato a doppio filamento** sulla doppia elica, permettendo il passaggio della doppia elica attraverso la rottura che dopo viene rilegata
- Ad ogni ciclo varia il numero di legame (Lk) di 2 unità.
- Possono essere **omodimeriche** o **multimeriche**
- **ATP-dipendenti**



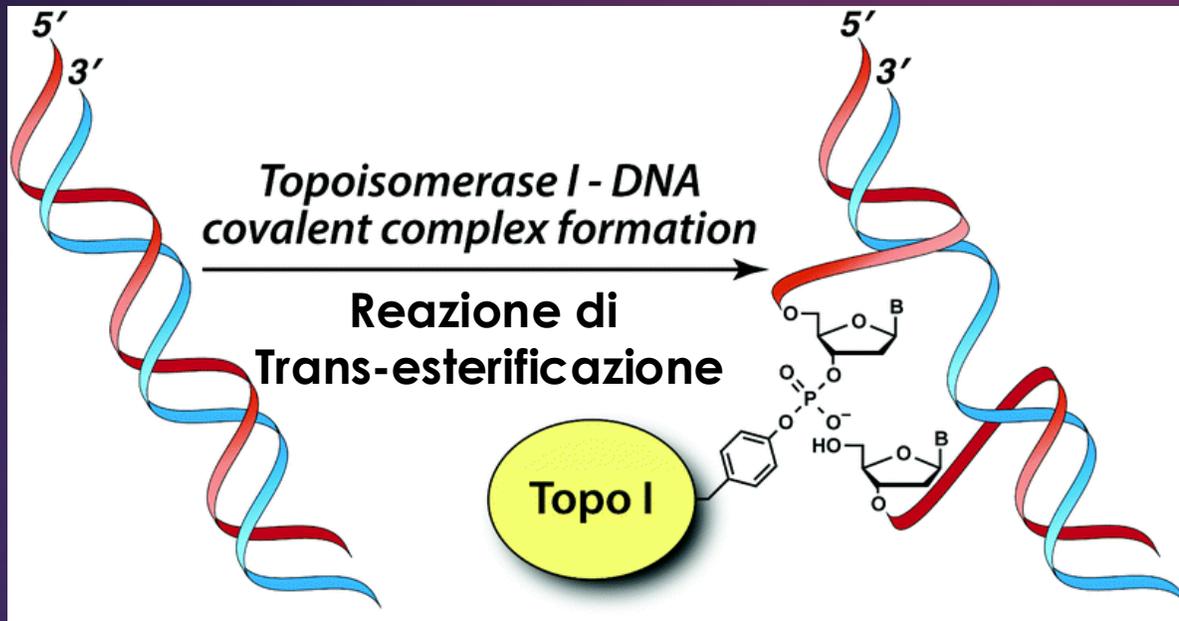
<https://www.youtube.com/watch?v=EYGrEIVyHnU>

TOPO - I

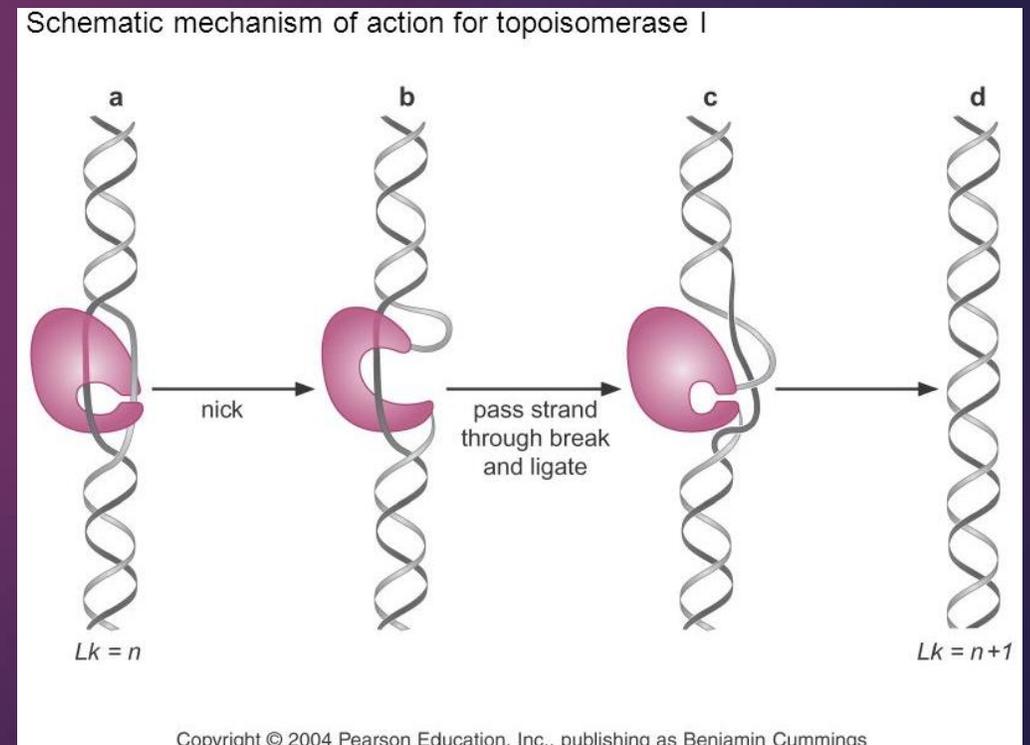
Creano delle interruzioni transitorie su un solo filamento del DNA
(modificano Lk: 1)



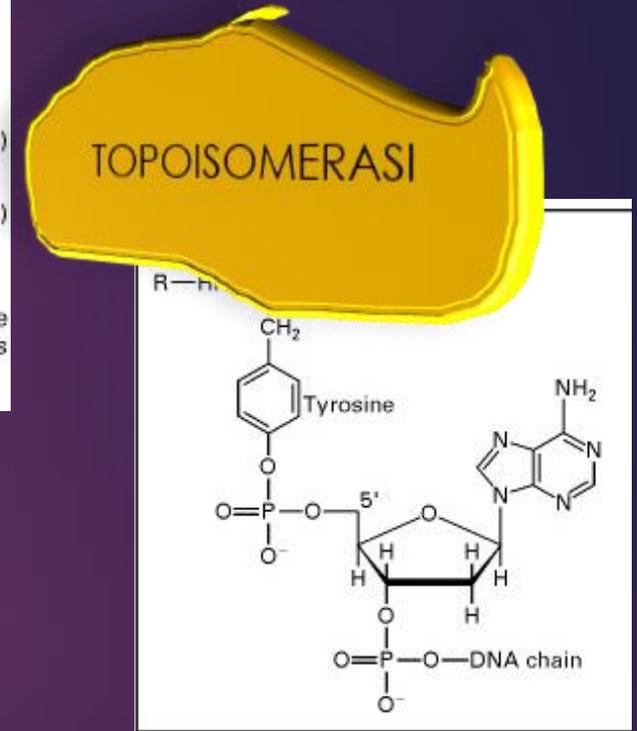
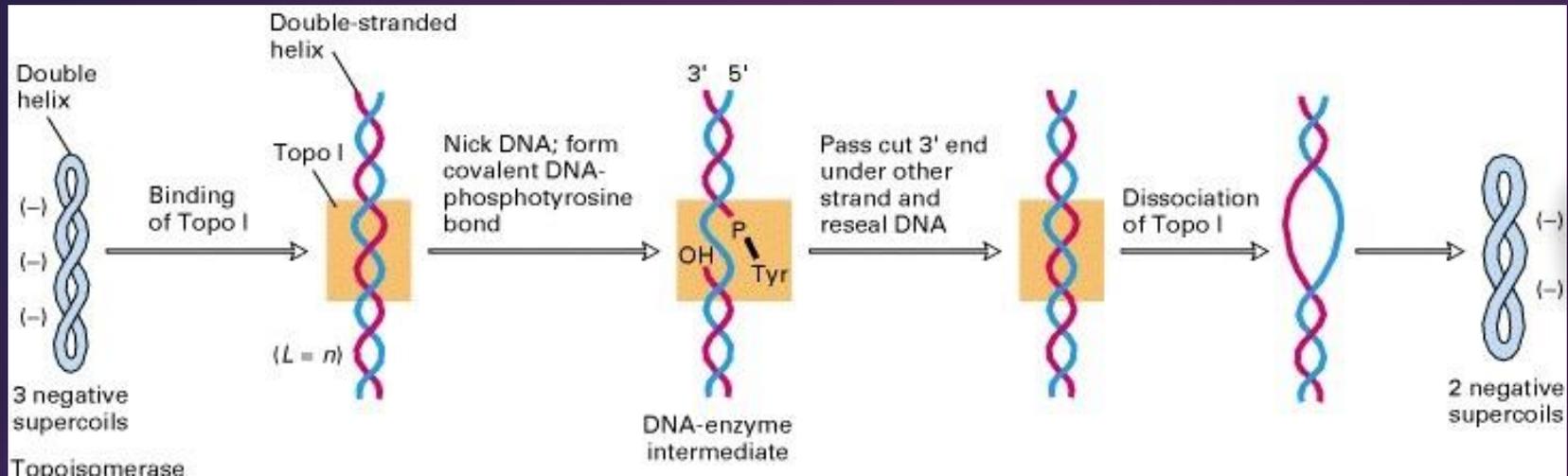
✓ Come creano il taglio transiente sul DNA?



Il processo completo di modificazione topologica usa la energia del superavvolgimento, anche se gli eventi di rottura e rilegazione non la richiedono.



TOPO - I



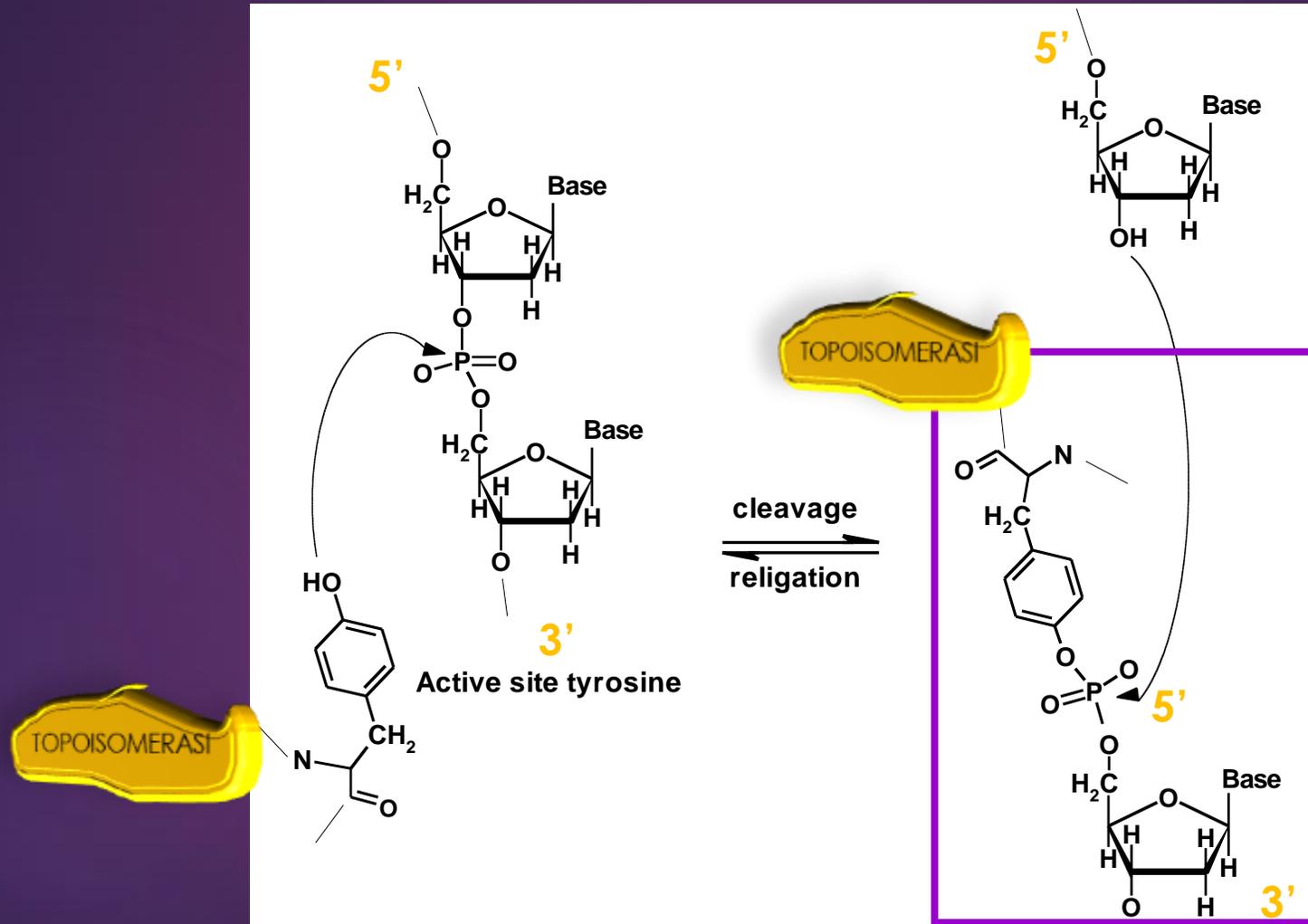
<https://www.youtube.com/watch?v=NZXimvLWglo>

Topo-**IA**: durante la reazione si legano all'estremità 5' del filamento tagliato.

Topo-**IB**: durante la reazione si legano alla estremità 3' del filamento tagliato

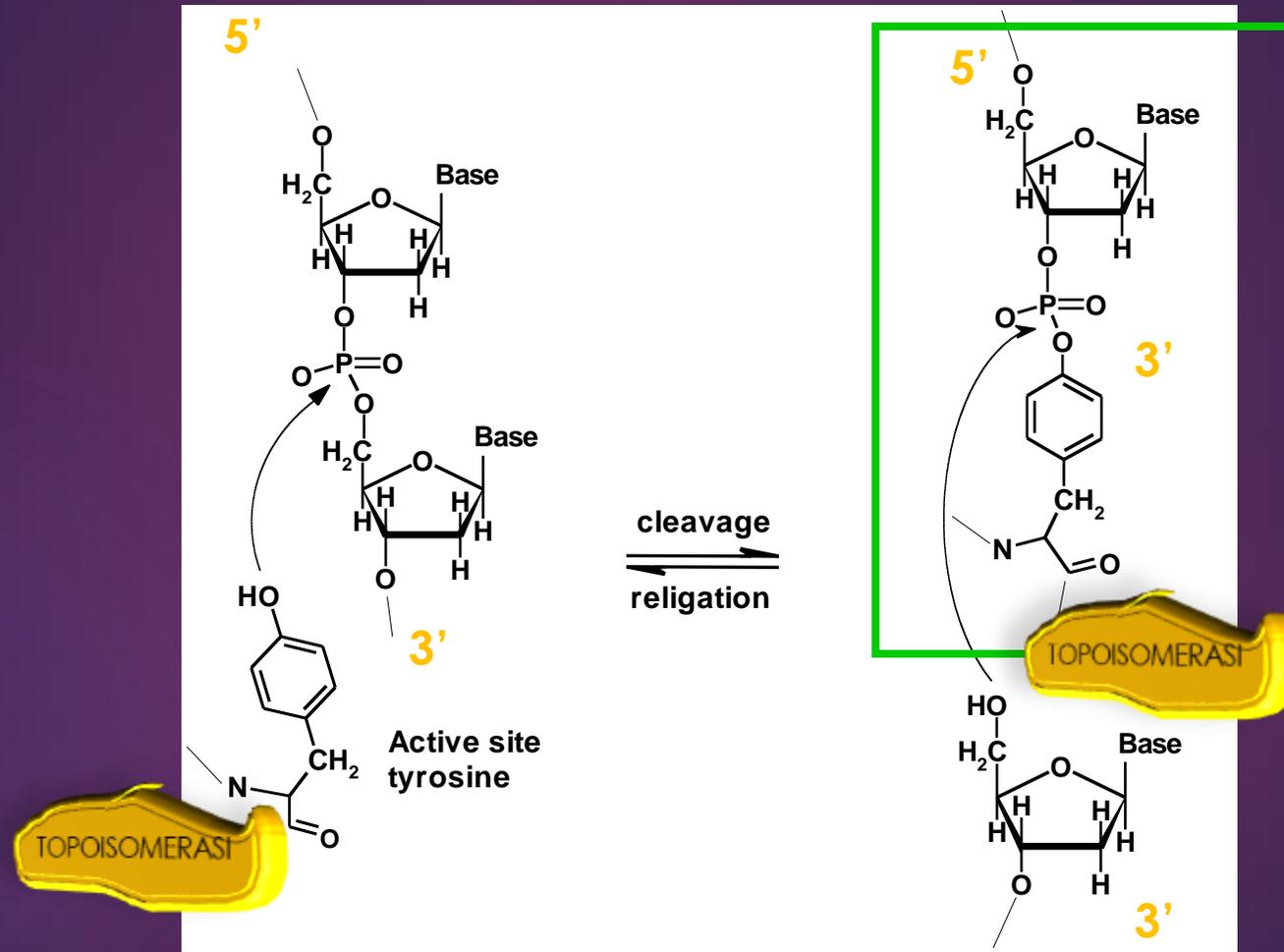
Chimica della Transesterificazione per le Reazioni di Cleavage e Religation delle Topoisomerasi IA

10



Attacco al 5' del DNA

Chimica della Transesterificazione per le Reazioni di Cleavage e Religation delle Topoisomerasi IB



Attacco al 3' del DNA

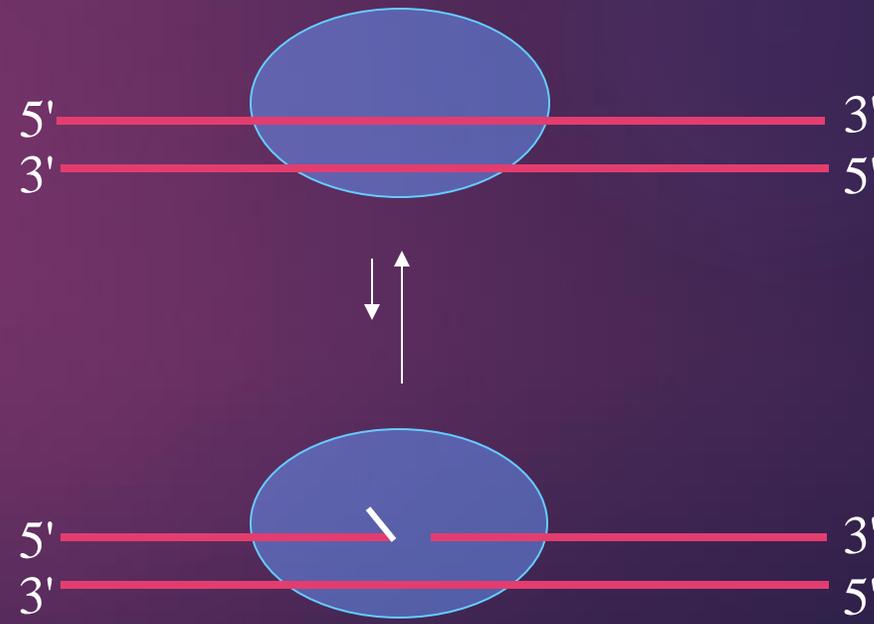
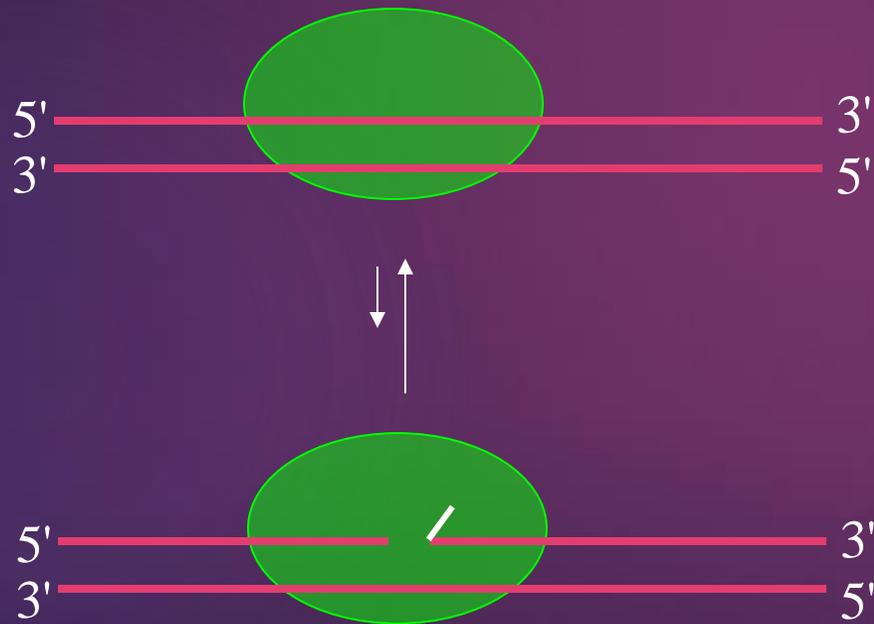
Tipo IA vs. Tipo IB

Tipo IA: Strand-passage

Tipo IB: Strand-rotation

Attacco al 5' del DNA

Attacco al 3' del DNA



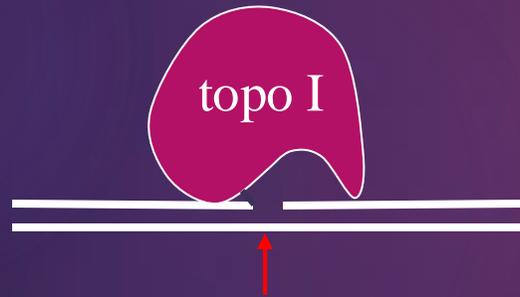
✓ Meccanismi di azione delle topoisomerase:

Tipo IA vs. Tipo IB

Tipo IA: Strand Passage

Attacco al 5' del DNA

L'enzima introduce una rottura singola su un filamento, allarga l'interruzione permettendo il passaggio dell'altro filamento attraverso la rottura che dopo viene rilegata.



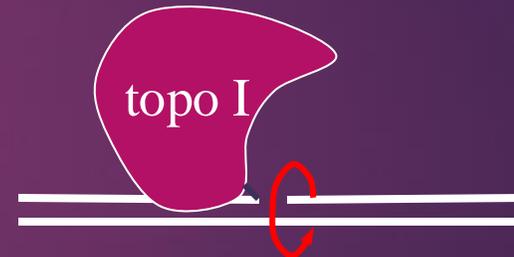
Type IA

Enzyme-bridging mechanism

Tipo IB: Rotazione Controllata

Attacco al 3' del DNA

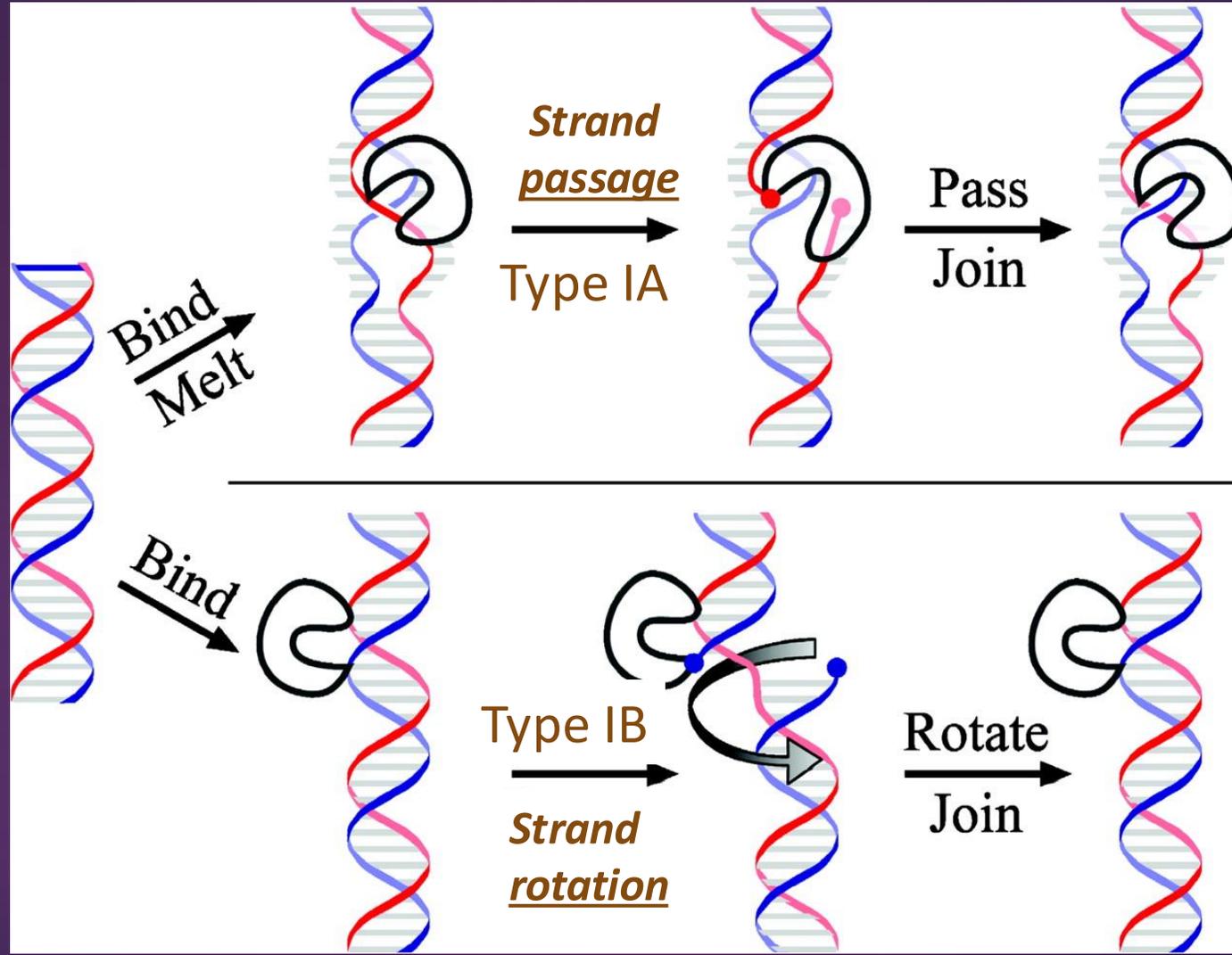
L'enzima introduce una singola rottura su uno dei filamenti della doppia elica, permettendo la rotazione su se stesso del filamento intatto.



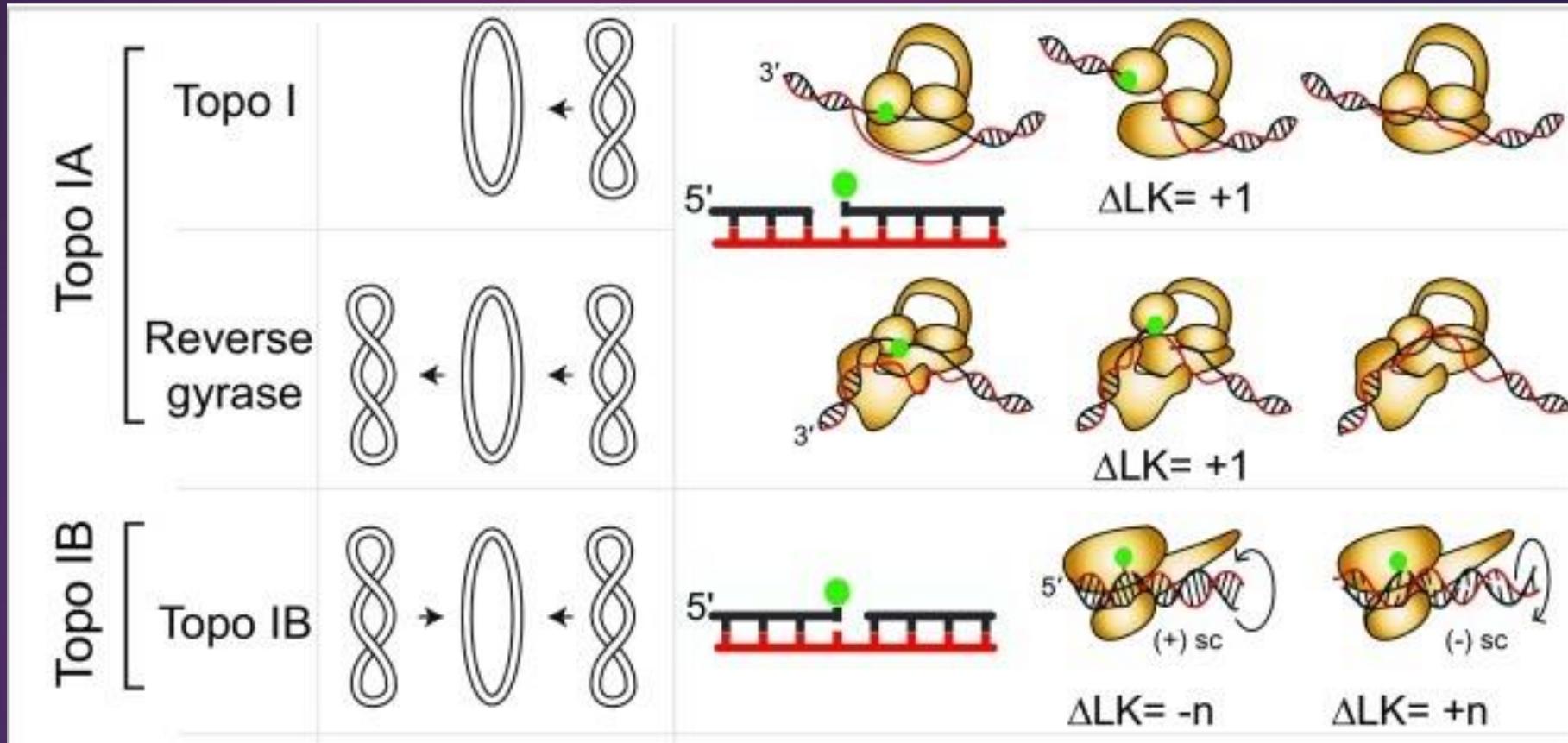
Type IB

Rotational mechanism

- Requires single-stranded DNA for binding.
- Only one supercoil can be relaxed per cycle.



(+) (-)



La **Girasi Inversa** è una topoisomerasi atipica (con anche attività elicastica) presente esclusivamente negli organismi termofili sia batteri che Archaea ed è in grado di **introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA B** (ATP-dep)

Il superavvolgimento positivo è considerato un elemento chiave per **l'adattamento alle alte temperature** in quanto stabilizza la doppia elica prevenendo la denaturazione, e favorisce una rapida renaturazione dopo il passaggio dei complessi trascrizionali e replicativi. Sebbene il ruolo in vivo della Girasi Inversa non sia ancora chiaro, **si è ipotizzato che**, data la sua peculiare presenza negli organismi termofili, **possa intervenire nell'adattamento di tali organismi alla vita ad alte temperature**

Topoisomerasi IA può Catenare e Decatenare DNAs

17



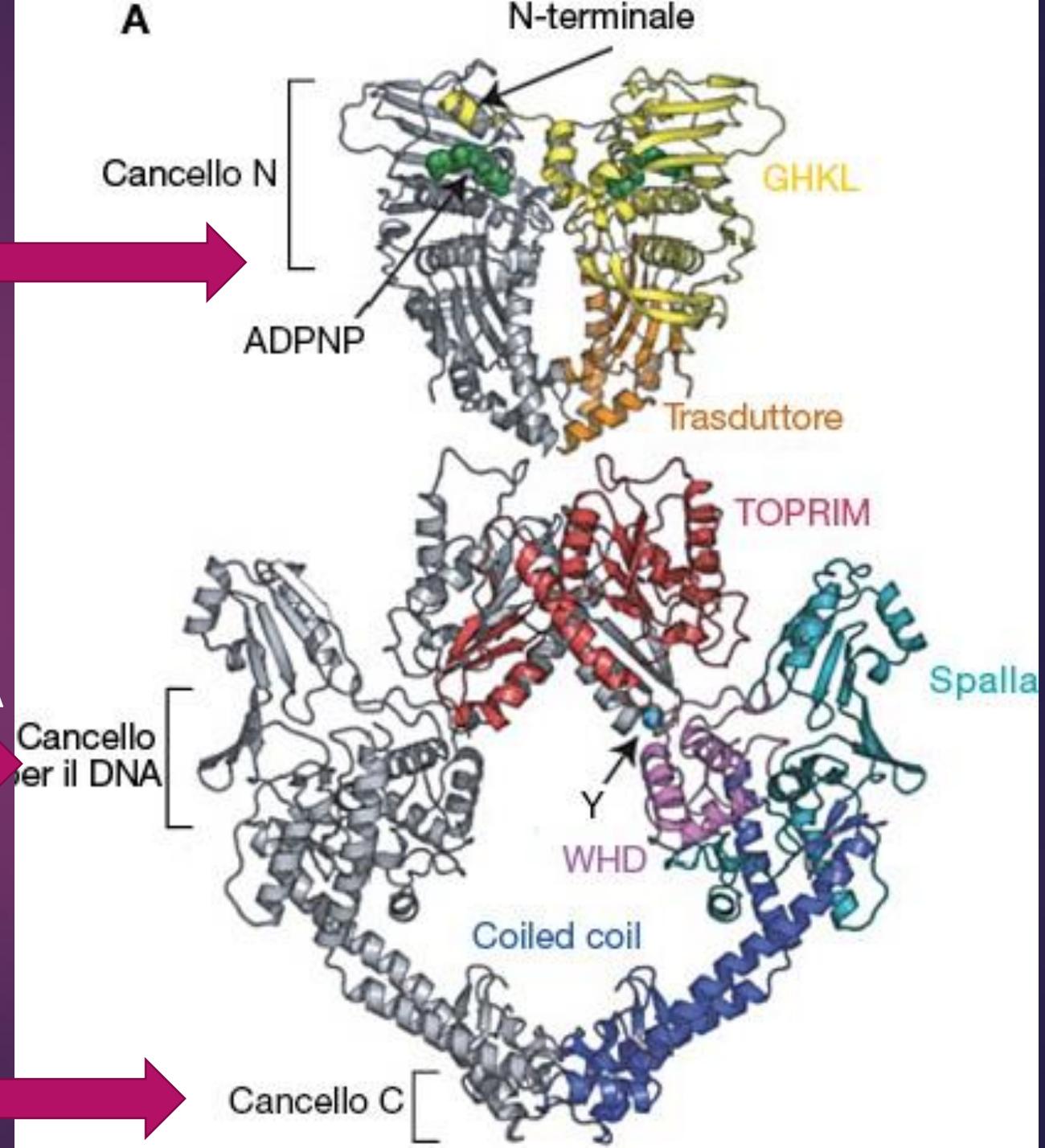
Gapped circle + duplex circle
or
(Nicked circle + duplex circle)
(ss circle + duplex circle)
(Two ss circles)

TOPO – II : meccanismo a doppio cancello

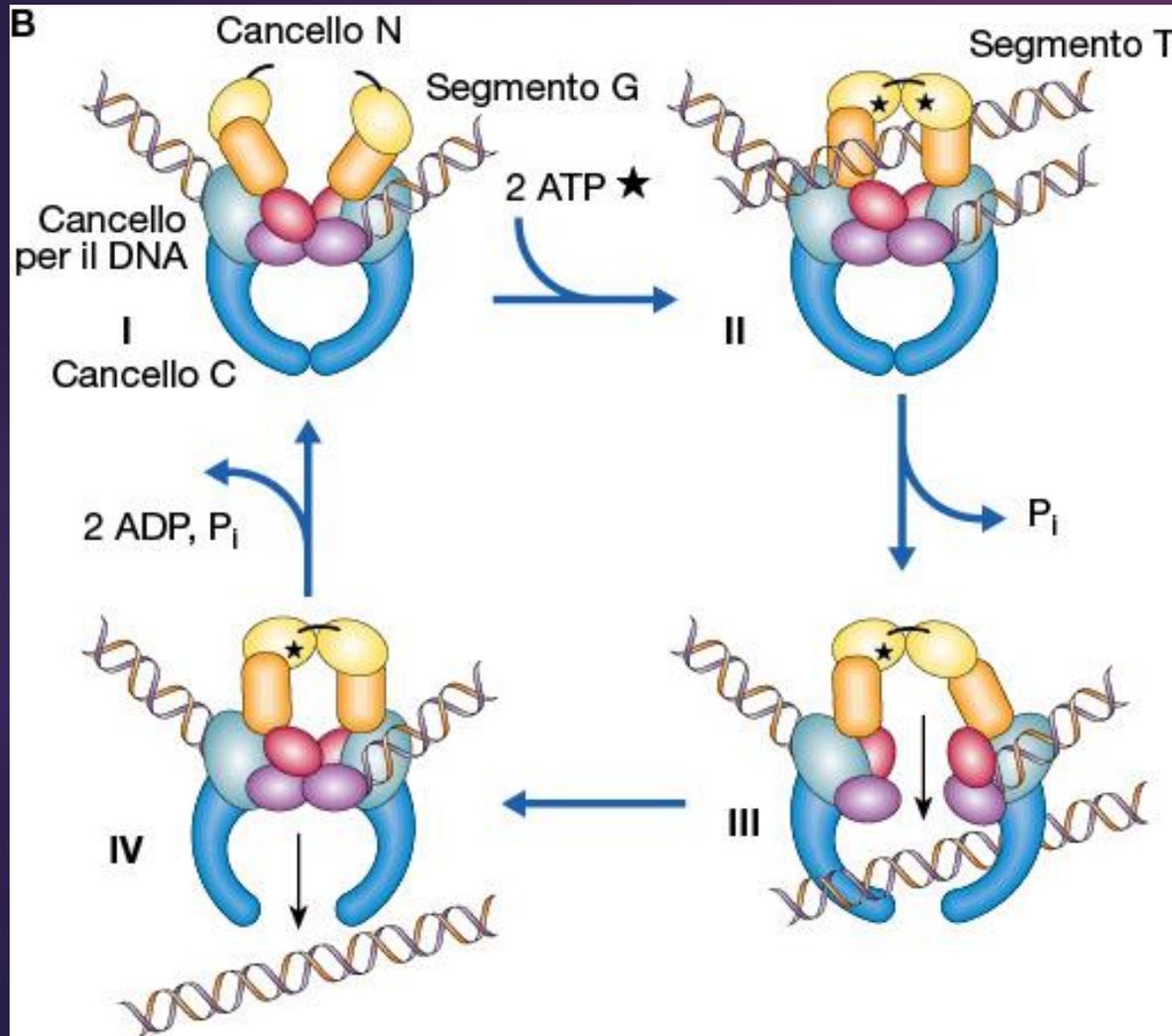
Idrolisi 2 molecole ATP necessaria per chiusura cancello N

Creano delle interruzioni transitorie su entrambi i filamenti del DNA (modificano Lk: 2)

Vengono tagliati entrambi i filamenti del DNA con due tirosine (Tyr -Y) covalentemente legate in 5'



TOPO – II : meccanismo a doppio cancello

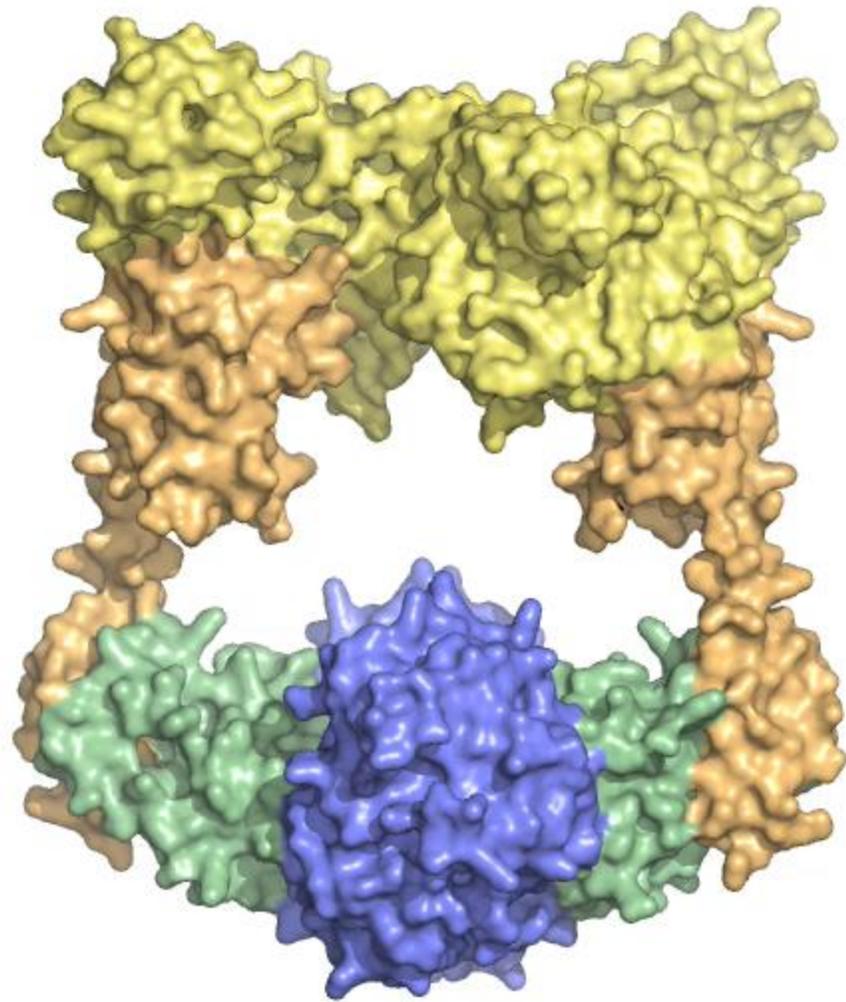


Cancello N: apertura pronta ad accogliere il **segmento T** (*transport*, da trasportare) con il **segmento G** (*Gate*) già inserito

Il legame del ATP permette il cambio di conformazione che chiude il cancello N con il segmento T dentro.

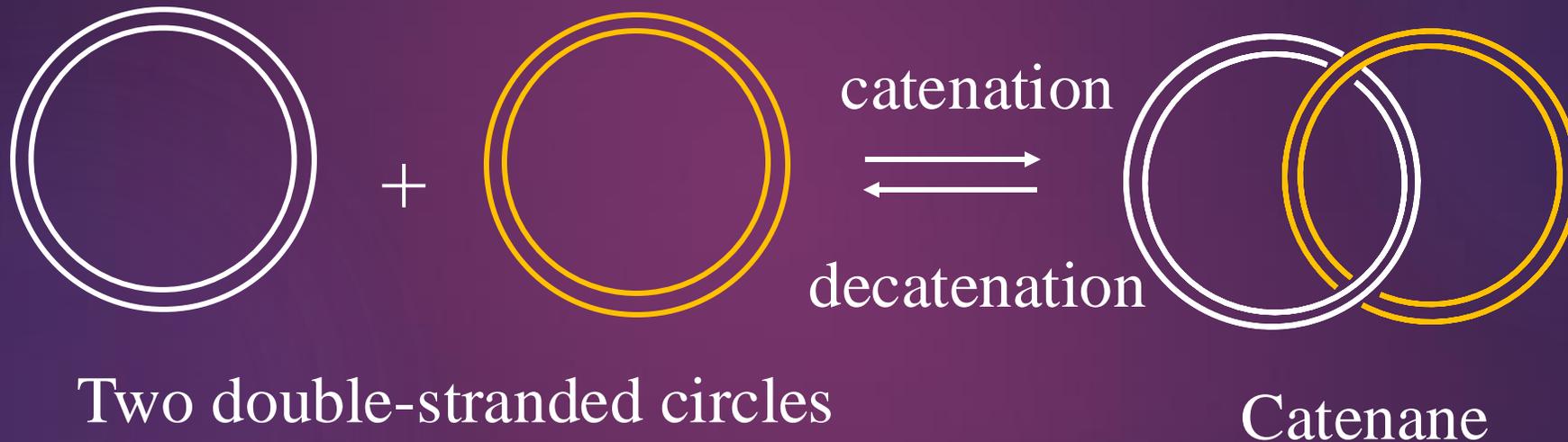
Cancello C: Dove è inserito il primo frammento di doppio filamento chiamato segmento G e che verrà tagliato per permettere il passaggio del segmento T (*transport*)

L'idrolisi del ATP cambia la conformazione della topo II, taglia il segmento G permettendo il passaggio del segmento T e provocando l'apertura del cancello C



<https://www.youtube.com/watch?v=3QWA-tFdGN8>

Topoisomerase II possono Catenare e Decatenare due duplex di DNA circolare



(+) (-)

