

ACIDI NUCLEICI: topologia del DNA e DNA topoisomerasi

SUPERAVVOLGIMENTO:

- La doppia elica può avvolgersi su se stessa e far cambiare la conformazione del DNA nello spazio
- Capire la topologia del DNA e come la cellula possa modificarla a proprio vantaggio è di fondamentale importanza in biologia molecolare

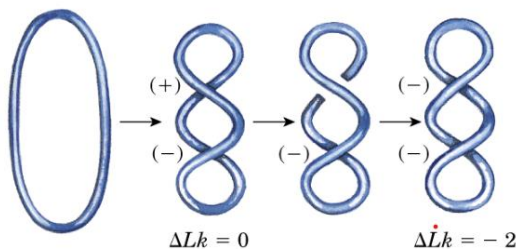
Poiché il DNA ha una struttura a doppio filamento, la separazione delle due catene porta una maggiore tensione e a un superavvolgimento se la molecola del DNA è bloccata a monte della separazione dei filamenti.

Il DNA si attorciglia su se stesso a formare delle strutture complesse dette SUPERAVVOLGIMENTI.

Lo stato topologico del DNA deve essere tenuto sotto controllo e per far questo la doppia elica deve essere aperta, fatta ruotare e poi richiusa.

Per catalizzare queste compresse reazioni di organismi contengono una classe di enzimi chiamati DNA topoisomerasi.

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



Una torsione della molecola risulta Nella formazione di un

super avvolgimento positivo (+) e negativo (-).

Il numero L è lo stesso ($\Delta Lk = 0$).

Se lo scheletro del DNA viene rotto e successivamente riscaldato, dopo che una regione della molecola è passata attraverso l'interruzione, il numero di L risulta ridotto di 2. La molecola è superavvolta negativamente ($\Delta Lk = -2$).

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

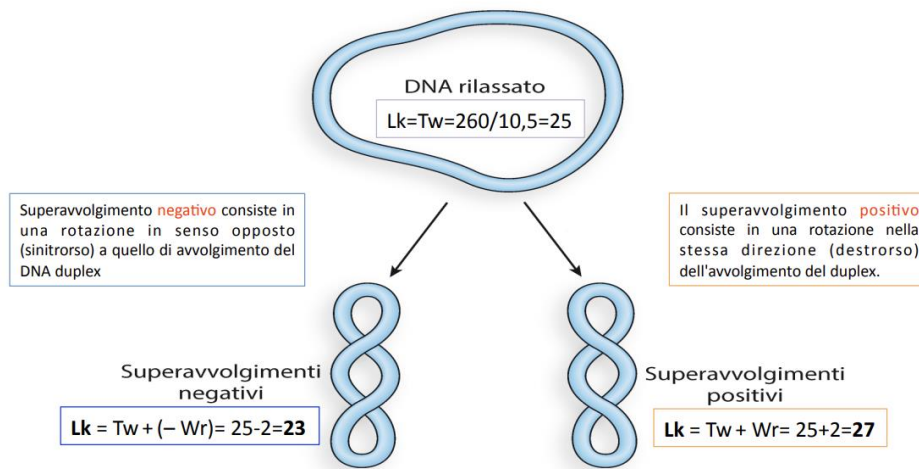
Il numero di legame L ha due componenti:

- Il numero Twisting (T= torsione): numero di giri completo.
- Il numero di Writhing o di superavvolgimento (W= contorsione): avvolgimento della doppia elica nello spazio.

$$L=T+W$$

Se si forza il DNA circolare a cambiare il suo Writhe, senza tagliarla a doppia elica, si avrà un compensativo cambiamento del Twist, mentre il numero di legame rimarrà lo stesso.

In una molecola di DNA rilassato, il parziale sottoavvolgimento o l'iperavvolgimento di due giri di elica produrranno rispettivamente un superavvolgimento negativo o positivo.



- Il DNA delle cellule (sia DNA circolari procariotici che DNA dei cromosomi eucariotici) è normalmente superavvolto negativamente.
- Dal punto di vista biologico i superavvolgimenti negativi possono essere considerati come un meccanismo di immagazzinamento dell'energia libera (tensione) che aiuta quei processi che richiedono una separazione dei due filamenti della doppia elica come la replicazione o la trascrizione.
- Le regioni di DNA superavvolto negativamente hanno la tendenza a disavvolgersi localmente, per cui la separazione dei due filamenti è più favorita nel DNA superavvolto negativamente piuttosto che nel DNA rilassato.

TOPOISOMERASI

Topoisomerasi → enzimi che alterano la topologia del DNA

- Lk (numero di legame) può essere modificato soltanto dalla rottura e riunione (formazione di legami fosfodiesterici) dell'ossatura di uno o entrambi i filamenti del DNA (proprietà topologica del DNA) grazie all'azione delle DNA topoisomerasi.
- Le topoisomerasi sono enzimi che convertono il DNA da una forma topologica all'altra, cioè da una forma superavvolta ad una rilassata e viceversa.
- Catalizzano variazioni del numero di legame.

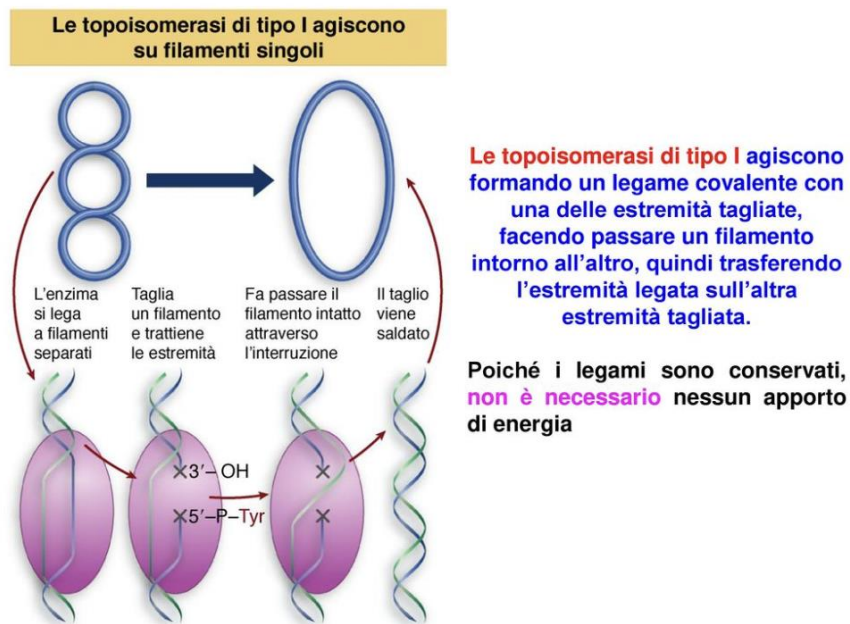
Esistono due tipologie di topoisomerasi:

- **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

MECCANISMO D'AZIONE DELLA TOPOISOMERASI I:

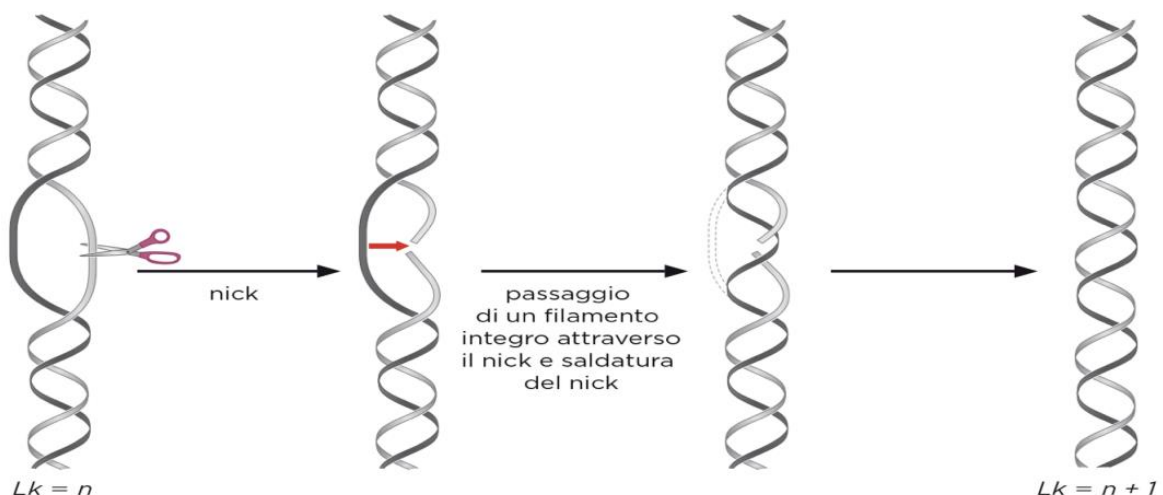


L'enzima lega il DNA nella cavità centrale e opera la rottura di uno dei due filamenti dell'acido nucleico mediante rottura del legame fosfodiesterico.

L'energia liberata dalla rottura di questo legame viene conservata mediante la formazione di un nuovo legame che coinvolge il gruppo fosfato del DNA e la tirosina, detto legame fosfotirosinico.

A questo punto l'enzima cambia conformazione e determina la rotazione del filamento libero intorno al filamento integro, alterando il numero di avvolgimento e quindi il numero di legame del DNA.

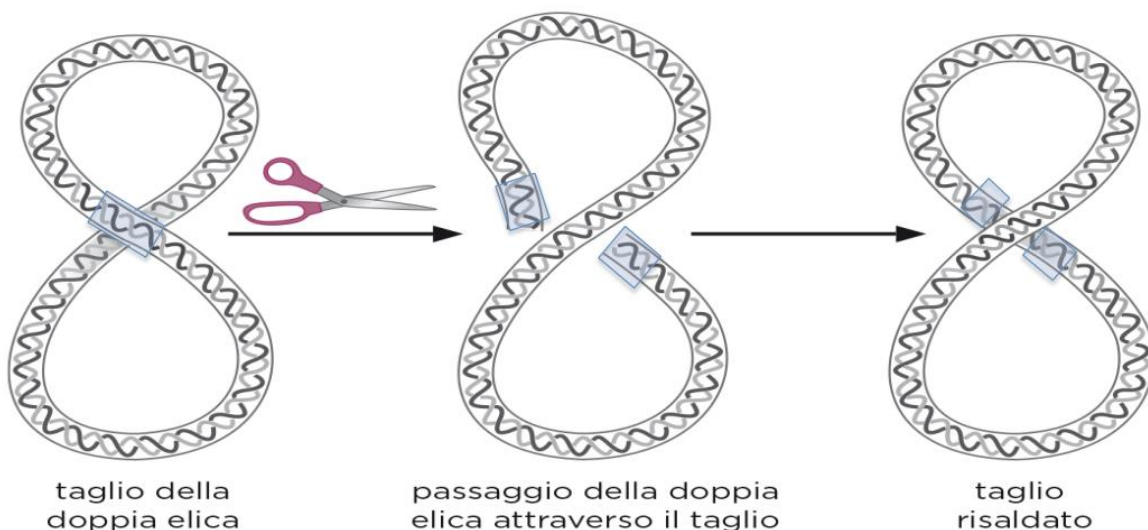
Al termine del processo l'enzima ripristina il legame fosfodiesterico ricavando l'energia dall'idrolisi del legame fosfotirosinico temporaneamente realizzato.



MECCANISMO D'AZIONE DELLA TOPOISOMERASI II:

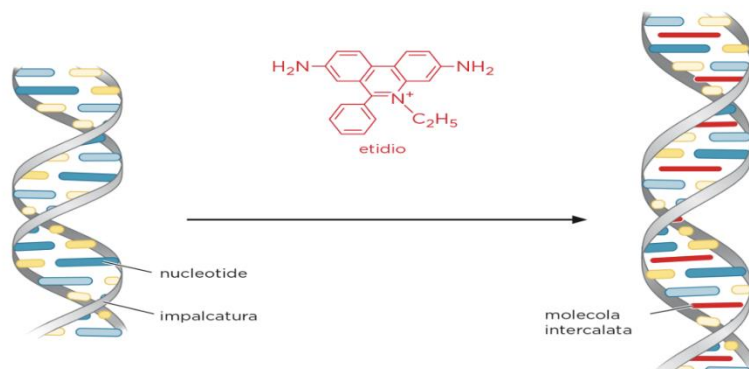
- Tipo II: fanno passare un tratto di doppia elica intatta attraverso il taglio, prima di risaldarla
- Lk cambia di due unità alla volta
- Utilizzano l'ATP per recuperare la forma iniziale dopo ogni ciclo
- DNA girasi (topoisomerasi II batterica): anziché rilassare, introduce superavvolgimenti (-)
- Responsabile del superavvolgimento del cromosoma, utile per facilitare lo svolgimento della doppia elica.

L'attacco dell'enzima avviene su entrambi i filamenti di DNA che vengono quindi tagliati in modo analogo a quanto accade per le topoisomerasi I, con la formazione di legami covalenti fosfotirosinici reversibili su con entrambi i filamenti. Una volta realizzato il taglio, l'enzima trasporta il doppio filamento integro attraverso la fessura realizzata nel doppio filamento tagliato, determinando una variazione nel numero di superavvolgimenti della molecola o la liberazione di una molecola intrappolata nell'altra. Il trasporto del duplex integro attraverso la porta realizzata nel duplex tagliato richiede consumo di ATP.



Agenti che intercalano il DNA:

Bromuro di etidio → un intercalante che modifica la topologia del DNA. Il bromuro di etidio è una molecola idrofobica planare che aumenta lo spazio esistente tra le coppie di basi adiacenti, distorce il regolare andamento delle impalcatura del DNA: la doppia elica si allunga e diminuisce il superavvolgimento.



TOPOISOMERASI come bersaglio di farmaci:

- Lo stato topologico del DNA è correlato alla sua funzione. Senza le topoisomerasi le cellule non possono replicarsi, impacchettare il loro DNA oppure esprimere i loro geni, quindi sono costretti a morire.
- Gli inibitori delle topoisomerasi sono diventati importanti agenti farmacologici contro le malattie infettive e il cancro.
- Alcuni dei più importanti agenti chemioterapici usati nel trattamento del cancro sono inibitori delle topoisomerasi umane.
- Aumentano i livelli del danno del DNA nelle cellule bersaglio in rapida crescita. Tuttavia anche i tessuti non cancerosi possono essere colpiti, ne derivano una tossicità più generale ed effetti collaterali indesiderati.