

Biologia Molecolare

2018 / 2019

Prof.ssa Susanna Spisani
Dipt. Biochimica e Biologia Molecolare
Via L.Borsari 46, Mammut, II piano
e-mail:susanna.spisani@unife.it
tel: 0532 455424

Testi consigliati:

Biologia Molecolare del Gene, J.D. Watson Ed. Zanichelli, 7° Ed., 2015

Biologia Molecolare, G.Capranico, E.Martegani et al. Ed. EdiSES, 2016

Biologia Molecolare F.Amaldi e coll. Casa Editrice Ambrosiana 3° Ed. 2018

Biologia Molecolare della Cellula, B.Alberts, 6°Ed. Zanichelli, 2016

**Biologia Molecolare: principi e tecniche, M.M.Cox, Ed. Zanichelli,
2013, 1° Ed.**

Biologia Cellulare e Molecolare, G. Karp 5° Ediz, EdiSES, 2015

**L'essenziale di biologia molecolare della cellula, B.Alberts e coll, Ed. Zanichelli, 4°
Ed, 2015**

**La cellula, un approccio molecolare, G.M. Cooper et al., Piccin Ed. III ediz italiana,
2012**

ACIDI NUCLEICI

Due tipi di acidi nucleici

DNA acido desossiribonucleico **1**

RNA acido ribonucleico **vari**

RNA messaggero **mRNA**

RNA transfer **tRNA**

RNA ribosomale **rRNA**

RNA con funzione catalitica **Ribozimi**

Piccoli RNA nucleari **snRNA**

Piccoli RNA interferenti **siRNA**

Micro RNA **miRNA**

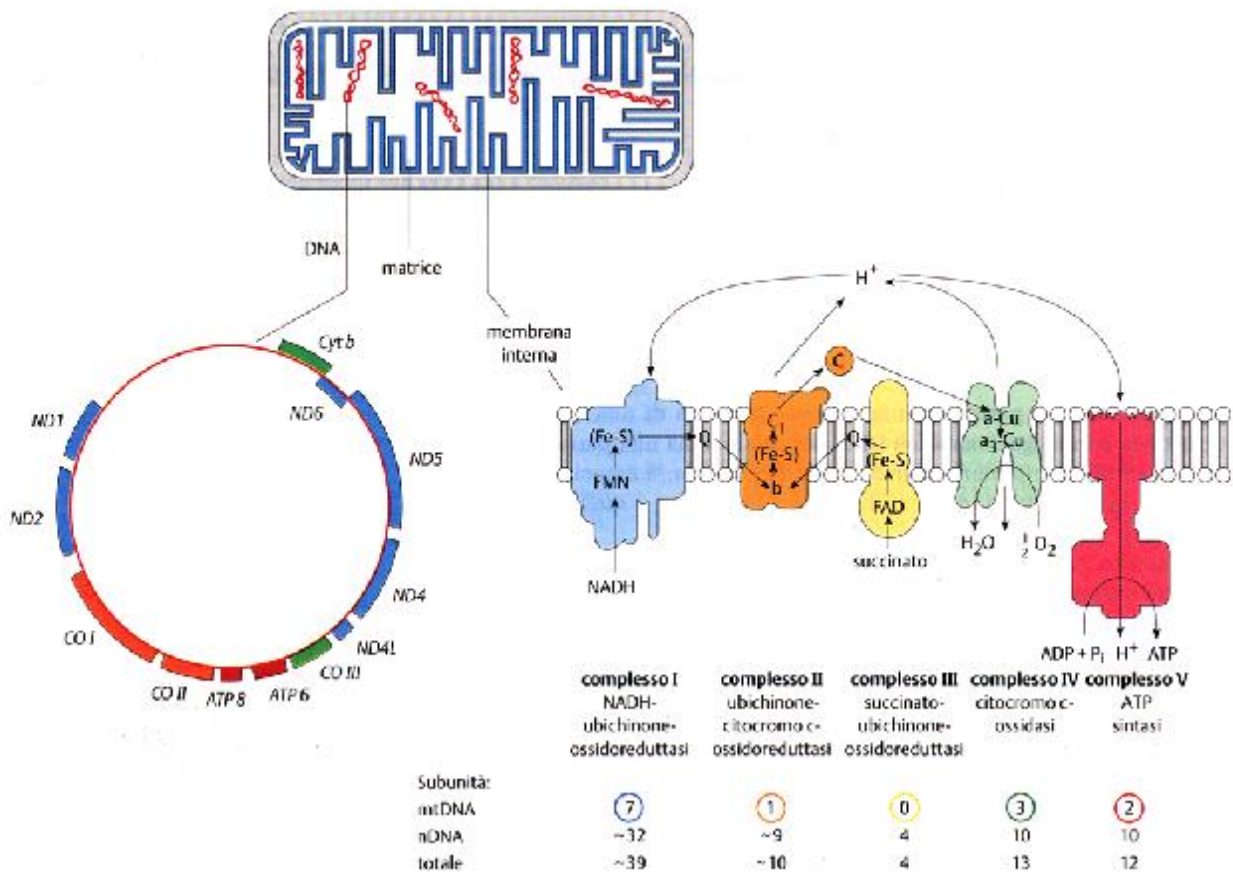
Intervengono
nell'espressione
genica

INFORMAZIONE GENETICA DI UNA CELLULA EUCARIOTICA

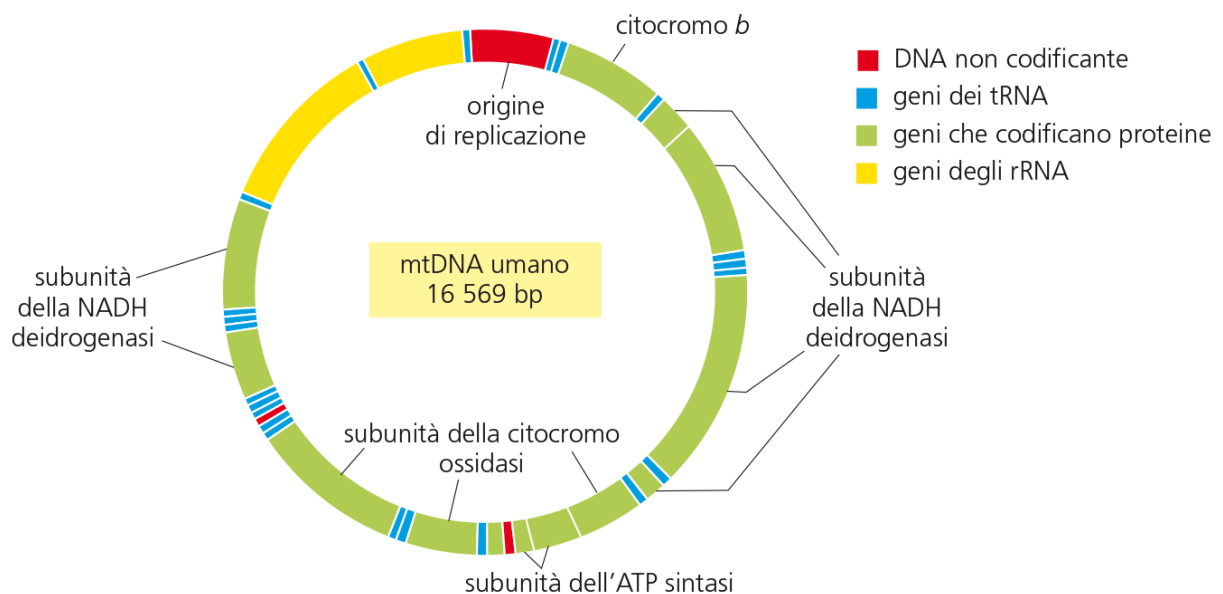


DNA MITOCONDRIALE

Il mitocondrio partecipa alla demolizione delle sostanze nutritive (ac. grassi e zuccheri), alla produzione di nucleotidi, fosfolipidi, aminoacidi ma soprattutto partecipa alla fosforilazione ossidativa. Nello spazio della matrice mitocondriale si trovano alcune molecole di DNA



Il genoma mitocondriale (mtDNA) umano è di forma anulare con due filamenti complementari: filamento H (pesante) e filamenti L (leggero)



Organizzazione genoma mitocondriale

La maggior parte dei geni (28) si trova sul filamento H

Possiede 37 geni codificanti:

- per due RNA ribosomiali (rRNA- 12S e 16S);
- 22 RNA di trasporto (tRNA);
- 13 RNA messaggero (mRNA-proteine) che fanno parte dei complessi enzimatici deputati alla fosforilazione ossidativa (respirazione cellulare).

La presenza di ribosomi permette al mitocondrio di svolgere una propria sintesi proteica

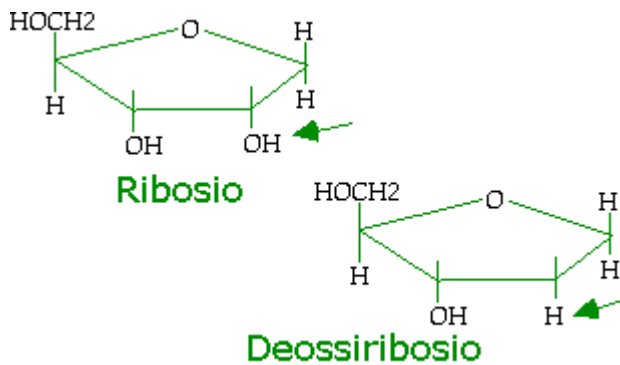
Il resto delle proteine presenti nel mitocondrio deriva da geni nucleari i cui prodotti vengono appositamente trasportati

Differenze fra genoma mitocondriale e genoma nucleare

- 1) Denso compattamento dei geni
- 2) Uso ridondante dei codoni
- 3) **Codice genetico variante**: codoni con significato diverso dal **codice genetico nucleare universale**. Ad esempio il **codone UGA**, normalmente codone di stop, codifica per il triptofano.
- 4) Il DNA mitocondriale accumula mutazioni

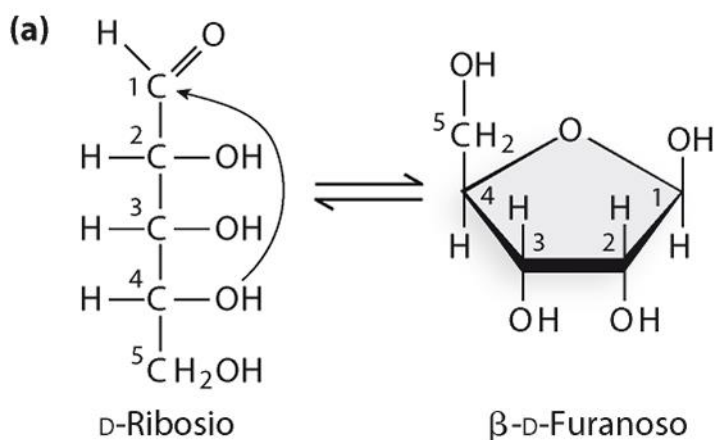
Il DNA mitocondriale umano viene ereditato per via **matrilineare**

In conseguenza di ciò, il **genoma mitocondriale della prole sarà quasi uguale a quello materno** (fatte salve eventuali mutazioni)



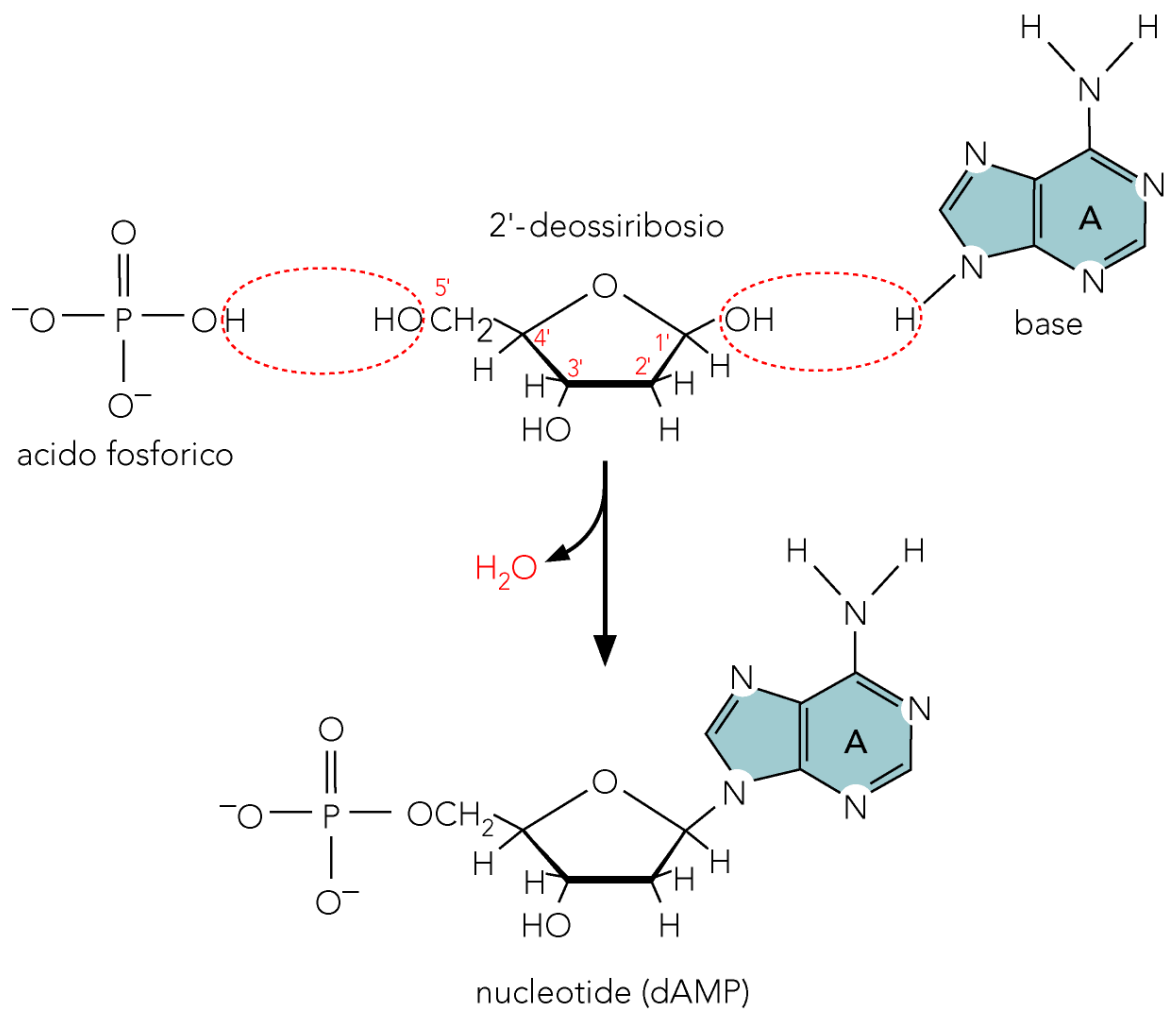
DNA = H in posizione 2' è metabolicamente **più stabile**, insensibile all'idrolisi alcalina, così è **più idoneo a fungere da molecola depositaria dell'informazione**

RNA = OH in posizione 2' **conferisce instabilità**, perché i due gruppi OH vicini in 2' e 3' lo rendono più suscettibili all'idrolisi alcalina è quindi **più adatto ad essere utilizzato e successivamente degradato**



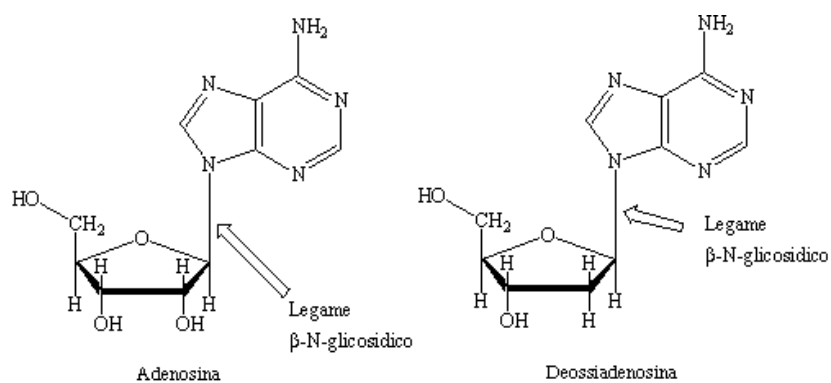
Forma ad anello lineare e chiuso del **riboso**. Quando è incorporato nei nucleotidi è solo ad anello

COX

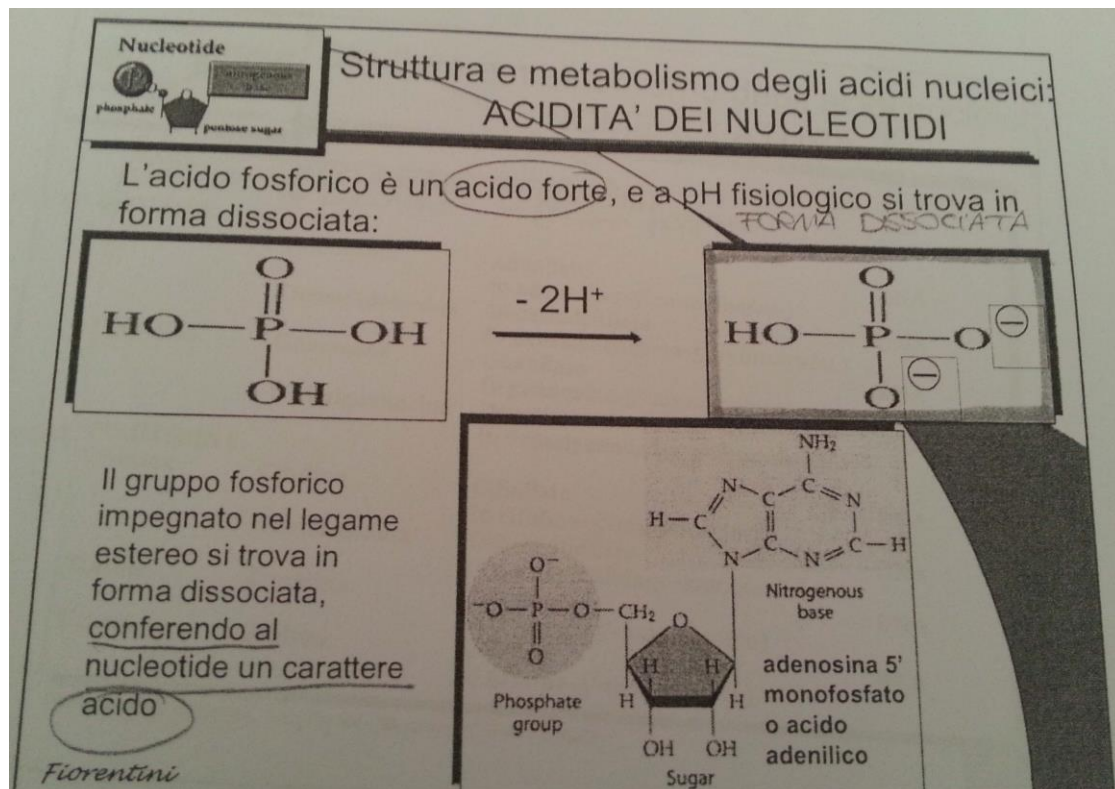
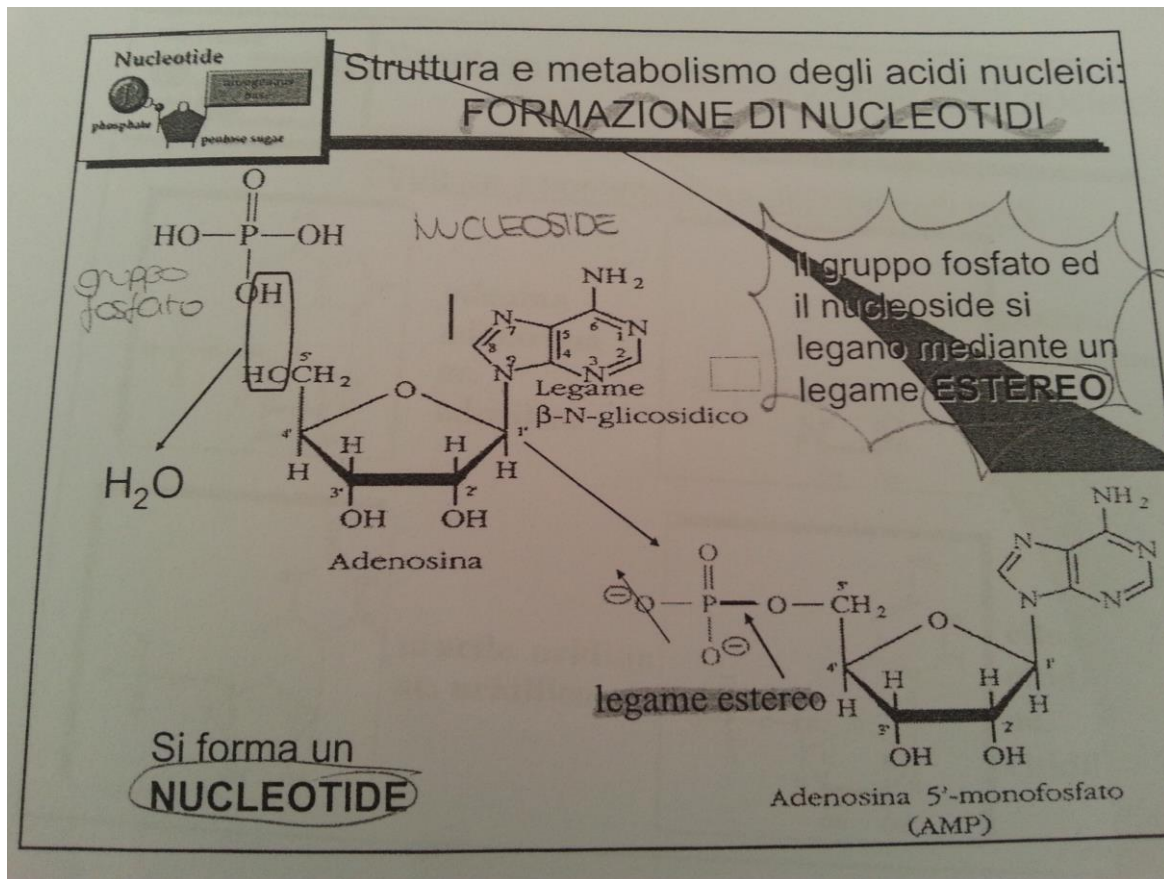


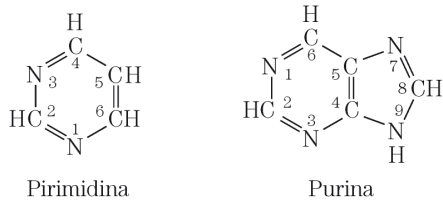
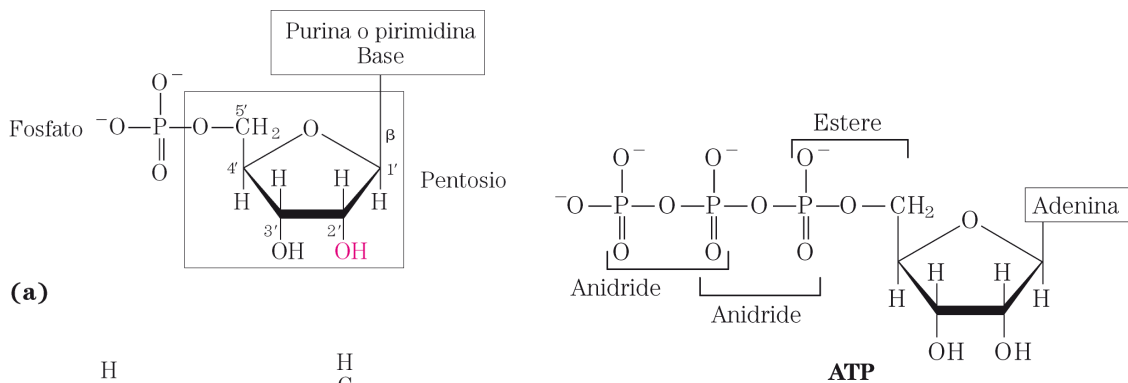
Watson

Formazione del nucleotide mediante eliminazione di acqua

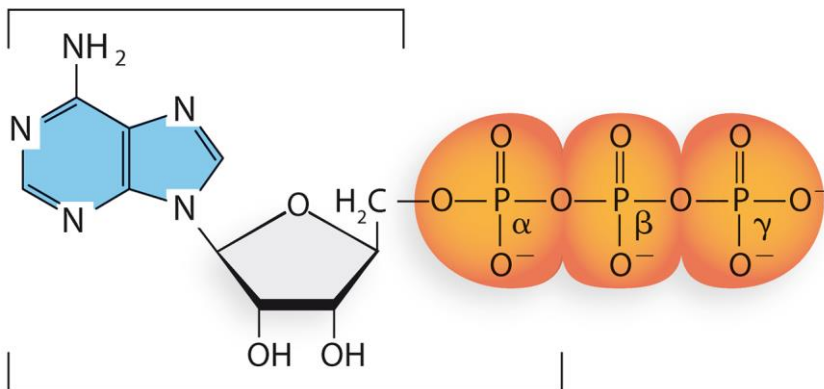


Nucleoside = zucchero + base





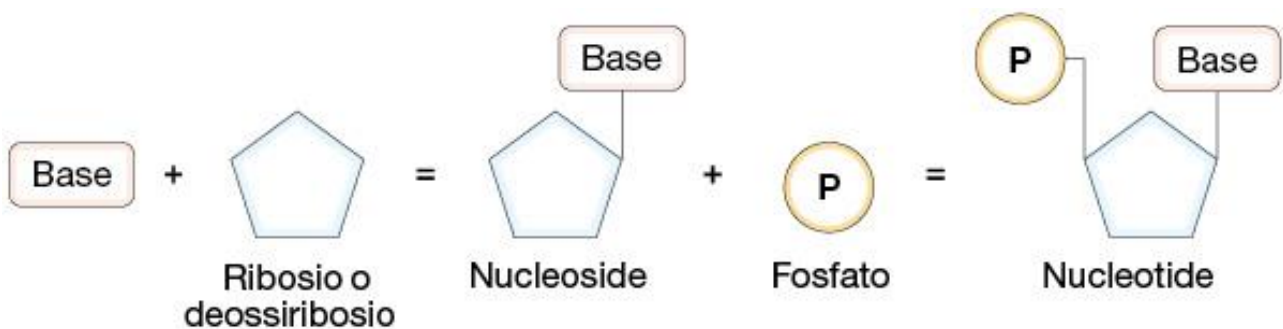
Nucleoside adenosinico (A)



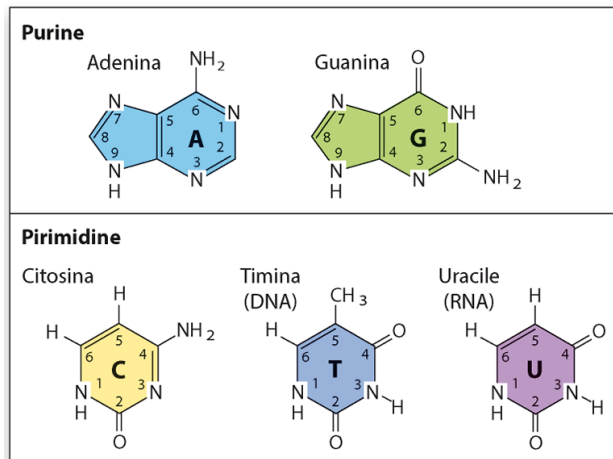
Nucleoside monofosfato (AMP)

Nucleoside difosfato (ADP)

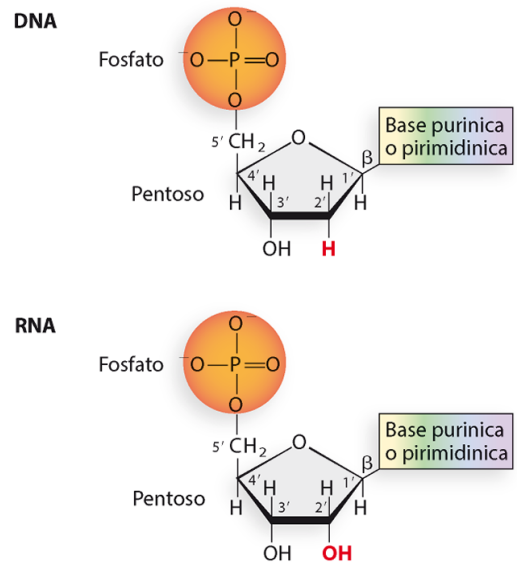
Nucleoside trifosfato (ATP)



(a)



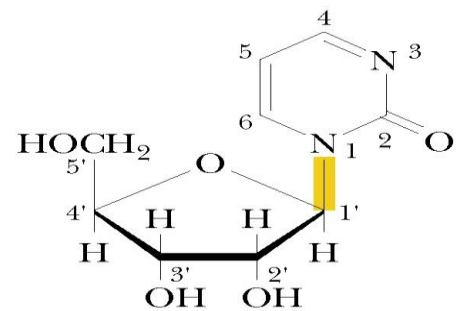
(b)



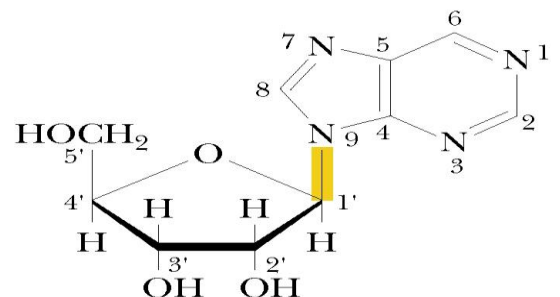
COX

BASI, NUCLEOSIDI, NUCLEOTIDI

Figura 8.10 Legami β -glicosidici legano le basi azotate e gli zuccheri per formare nucleosidi.



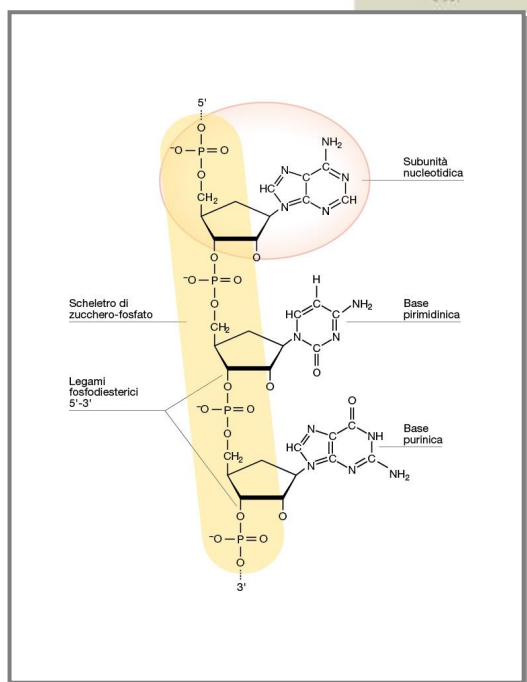
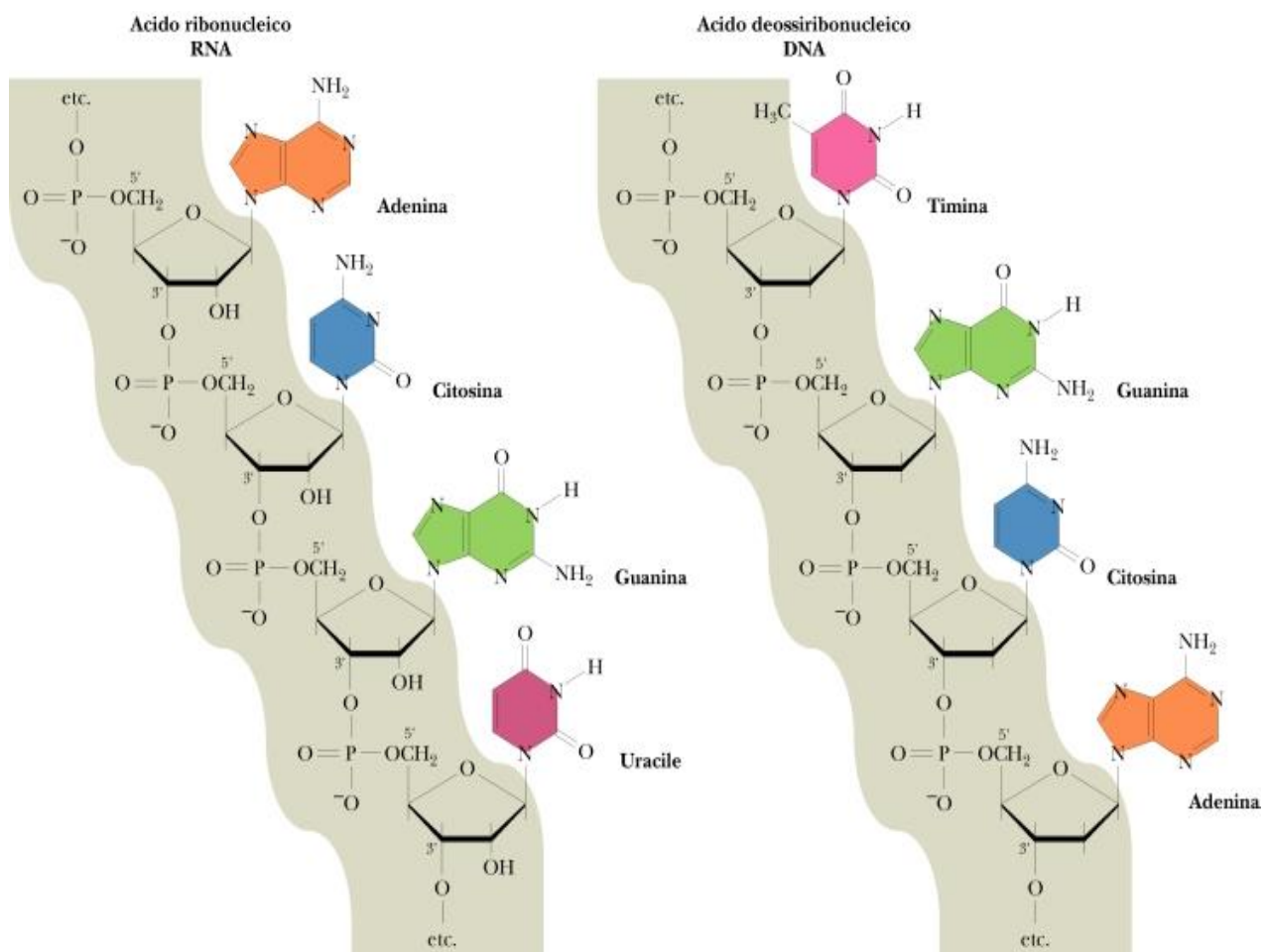
**Legame β -N₁-glicosidico
nei nucleosidi
pirimidinici**



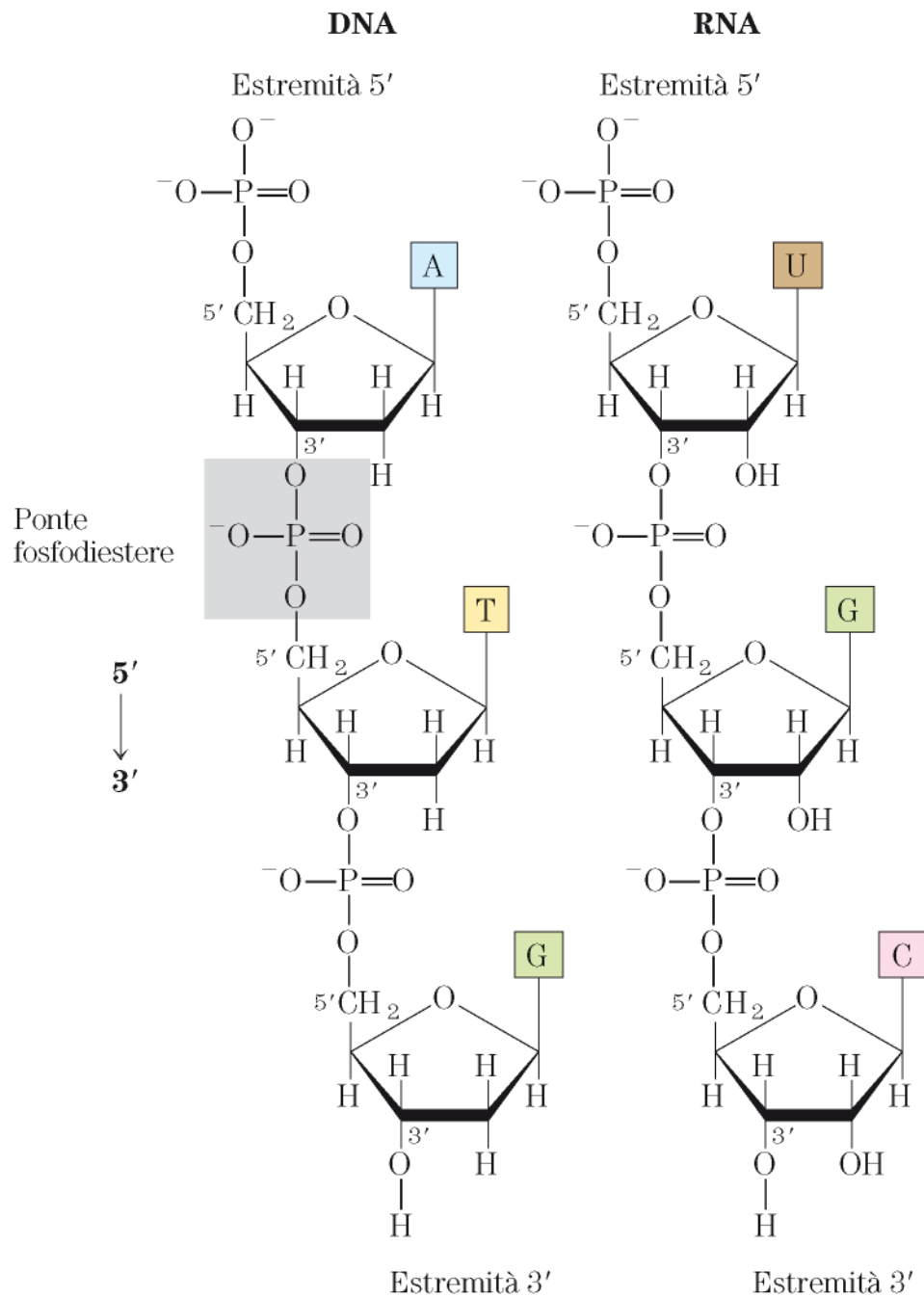
**Legame β -N₉-glicosidico
nei nucleosidi
purinici**

Struttura RNA ed DNA

Figura 8.16 I legami 3'-5' fosfodiesterici uniscono i nucleotidi insieme per formare una catena polinucleotidica.



**La catena polinucleotidica
ha una struttura ripetitiva**



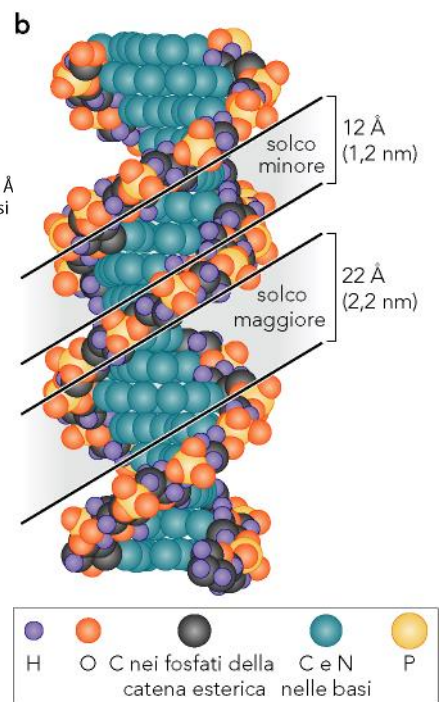
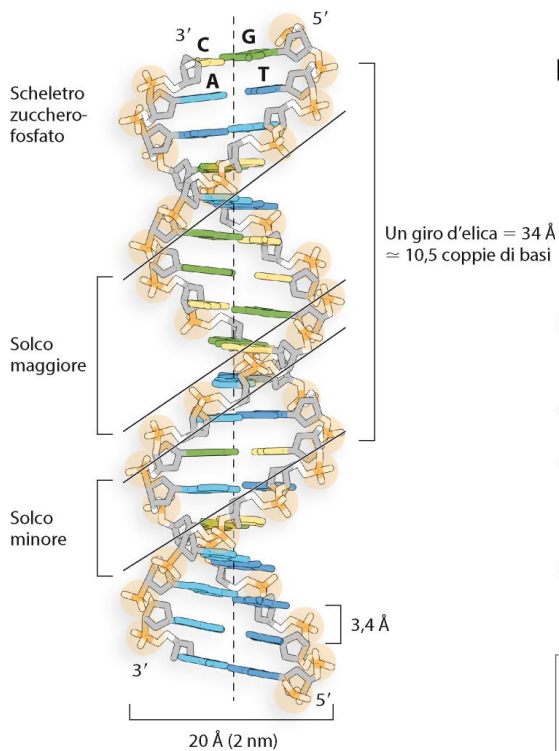
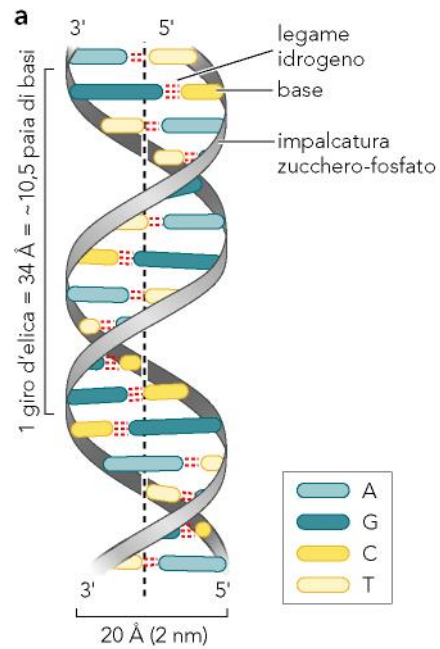
Legami fosfodiesteri nello scheletro del DNA ed RNA

I filamenti hanno una polarità

Lehninger

STRUTTURA AD ELICA DEL DNA

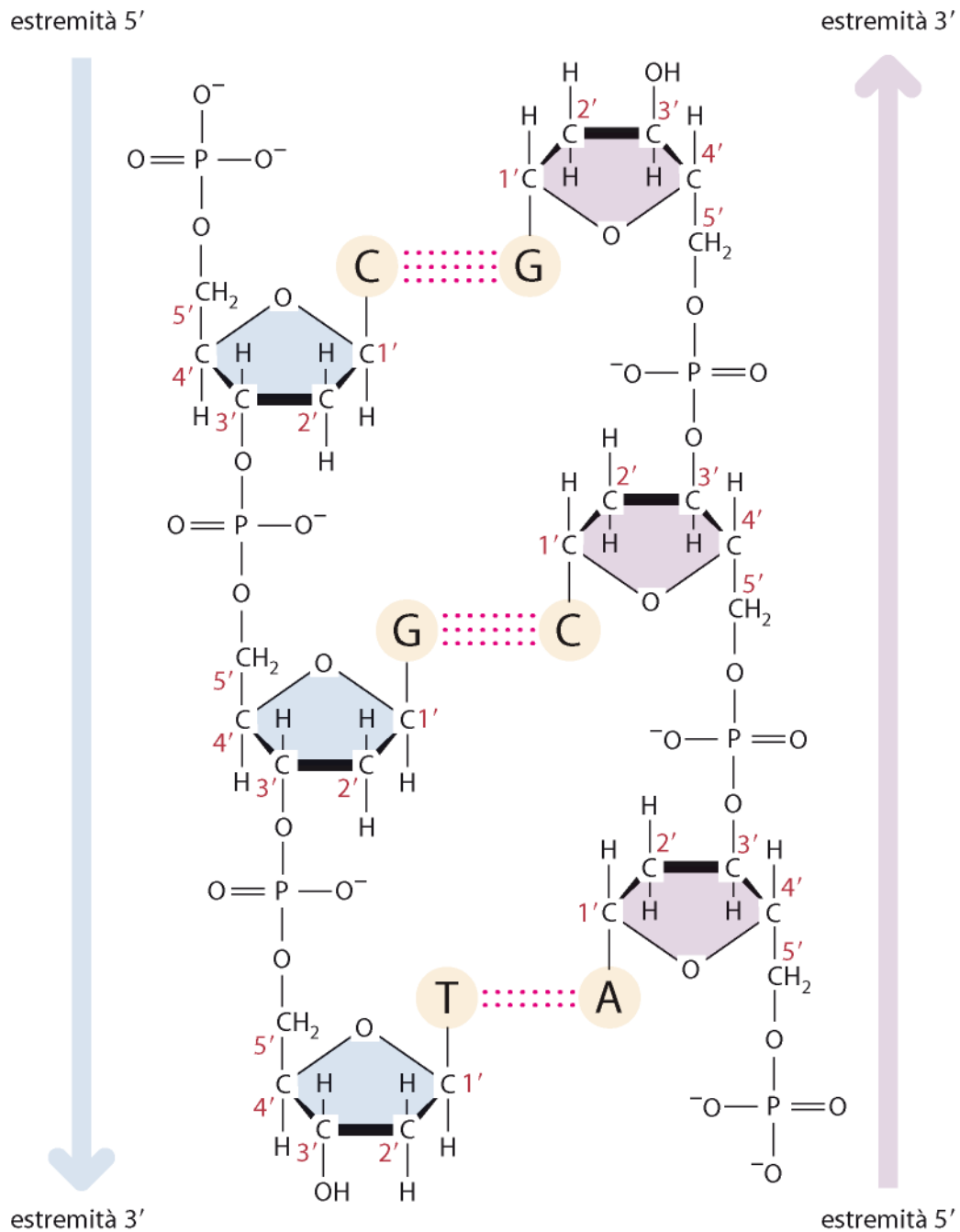
Struttura secondaria

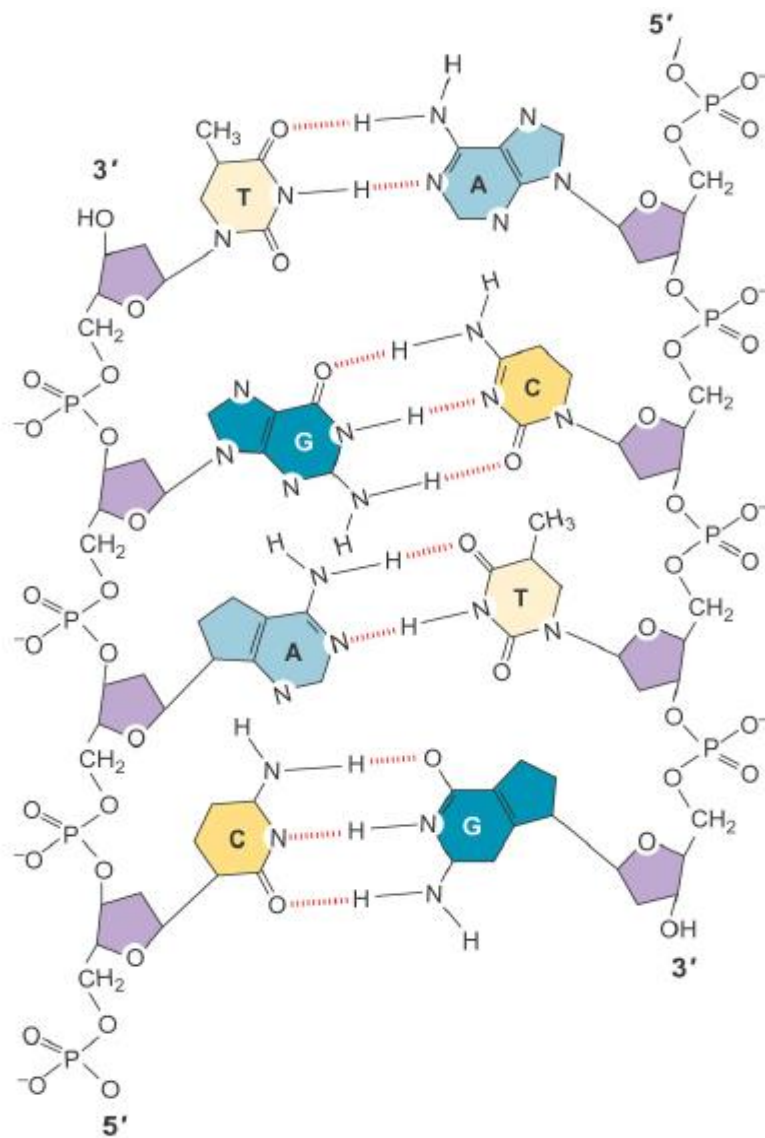


Proprietà del DNA

Complementarietà tra le basi

Le due catene sono antiparallele





Le due catene di DNA si associano mediante l'appaiamento delle basi formando la doppia elica.

A – T G – C

2 tipi di scanalature: principale e secondaria che si formano in quanto i legami glicosidici di una coppia di basi non sono diametralmente opposti

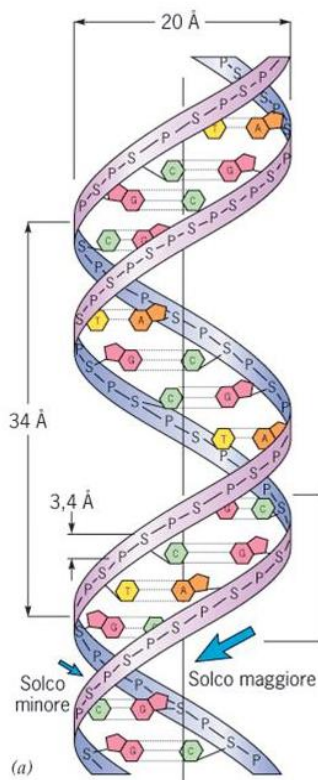
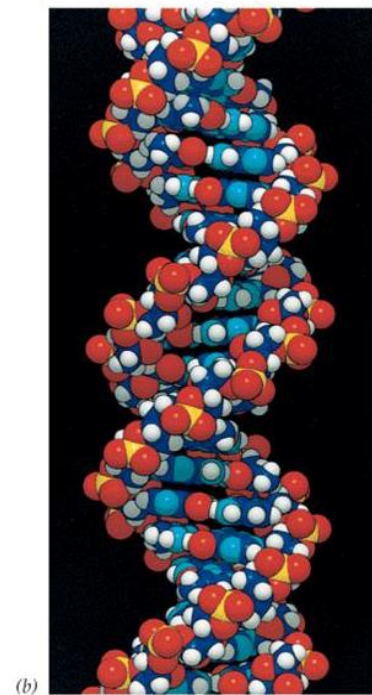
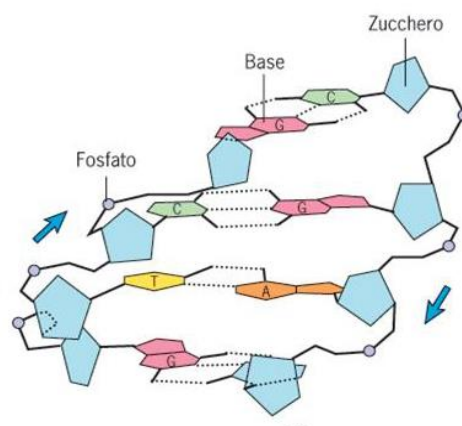
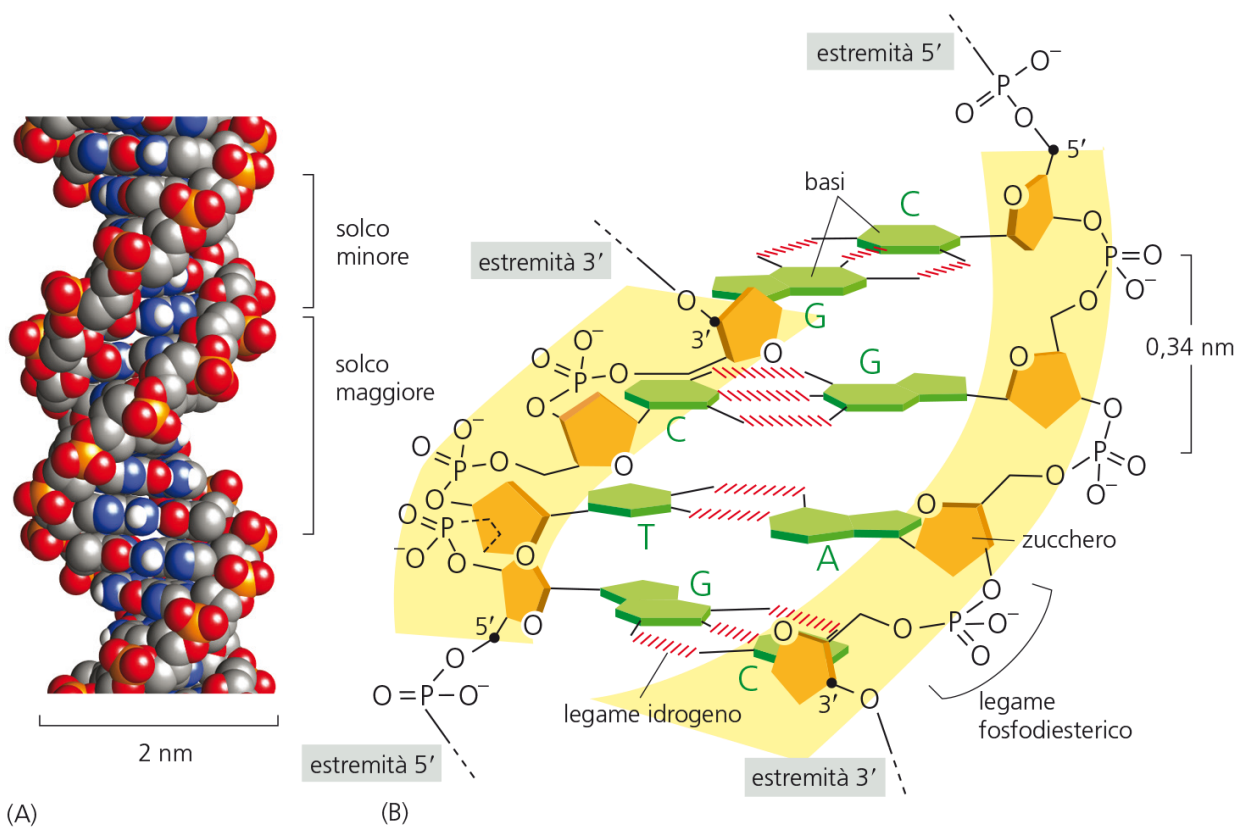


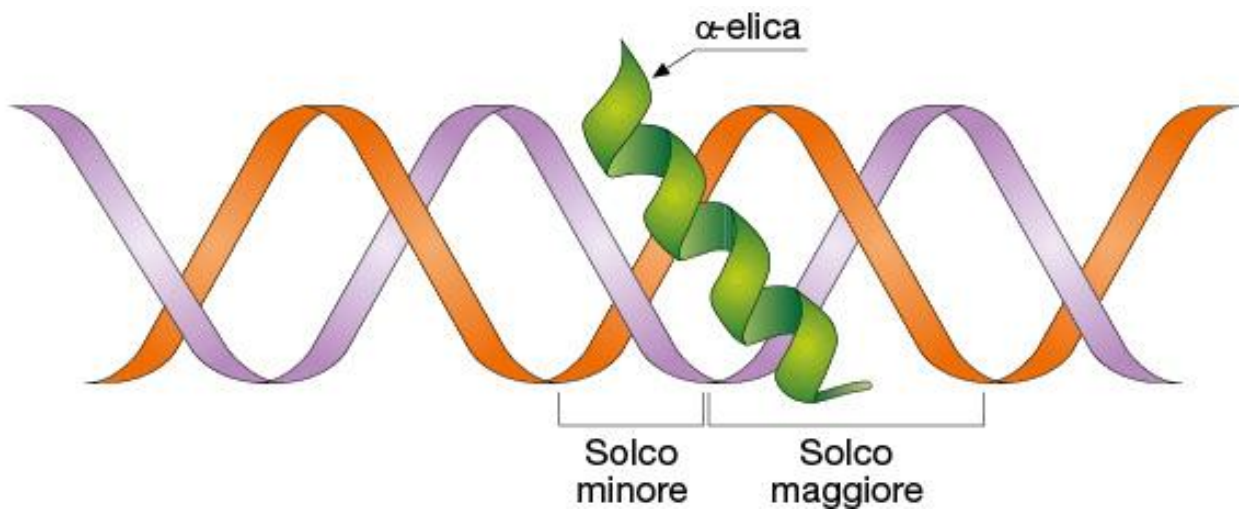
FIGURA 10.10 La doppia elica. (a) Rappresentazione schematica di una doppia elica di DNA. (b) Modello spaziale del DNA nella conformazione B. (B: PER GENT. CONC. DI NELSON MAX, LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL LABORATORY AND THE DEPARTMENT OF ENERGY). *continua*



Karp

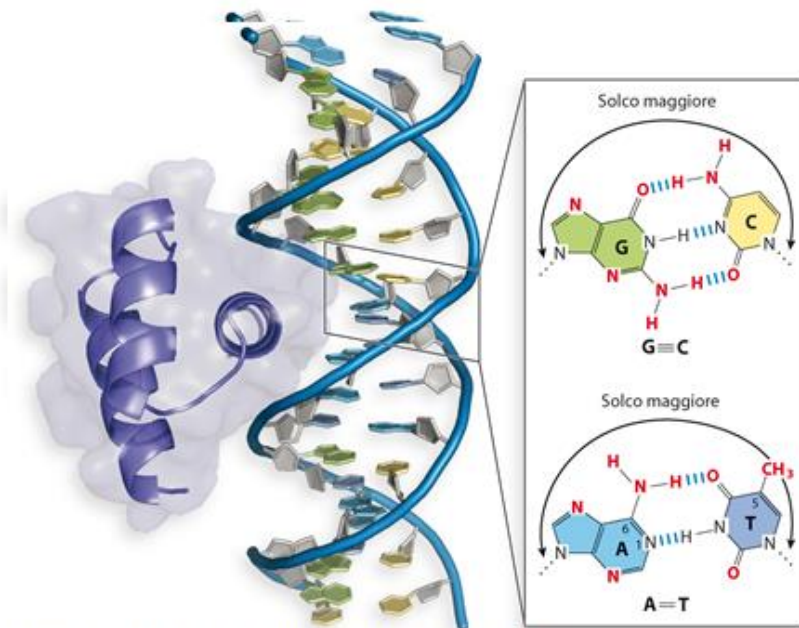


Alberts



Amaldi

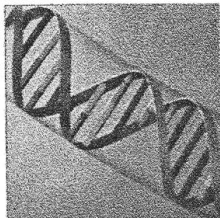
Le proteine interagiscono preferibilmente con il solco maggiore



M. W. Cox - J. Oudry - M. O'Donnell, BIOLOGIA MOLECOLARE, Zanichelli editore S.p.A. Copyright © 2013

5 / 4

Cox 2013



Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: FORZE CHE STABILIZZANO LA DOPPIA ELICA

INTERAZIONI DA IMPILAMENTO

Le coppie di basi impilate l'una sull'altra formano legami di Van Der Waals. Queste forze sono deboli, ma additive

■ INTERAZIONI IDROFOBICHE

L'impilamento delle basi le une sulle altre determina di fatto l'esclusione dell' H_2O dall'interno della doppia elica, creando una zona idrofobica; ciò aumenta enormemente la stabilità dell'elica

■ LEGAMI AD IDROGENO TRA LE BASI

costituiscono una forza stabilizzante significativa

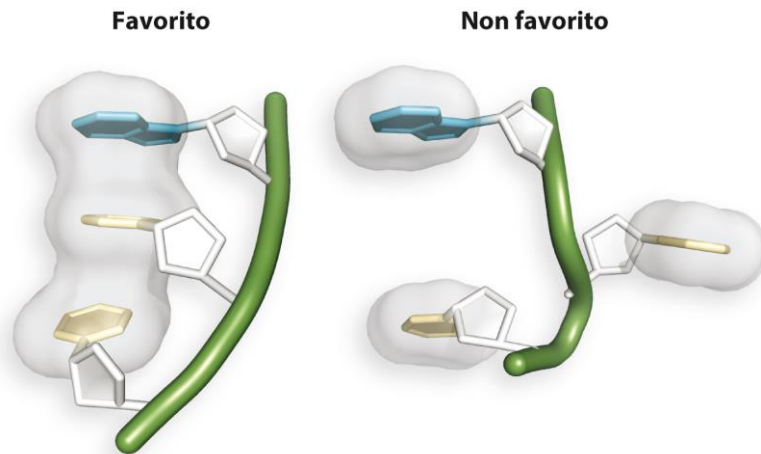
■ INTERAZIONI IDROFILICHE

Lo scheletro covalente idrofilo si trova all'esterno della molecola, a contatto con l' H_2O , elemento con il quale ha grande affinità

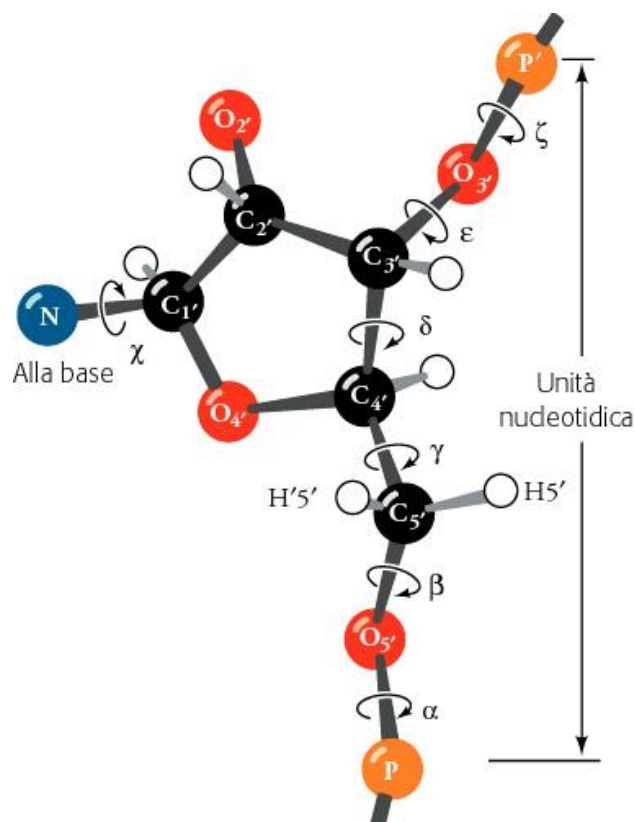
■ INTERAZIONI ELETTROSTATICHE

la potenziale instabilità risultante dalla repulsione tra i gruppi fosforici negativi è bilanciata da interazioni elettrostatiche tra tali gruppi ed i cationi intracellulari, come Mg^{++} e Ca^{++}

Fiorentini

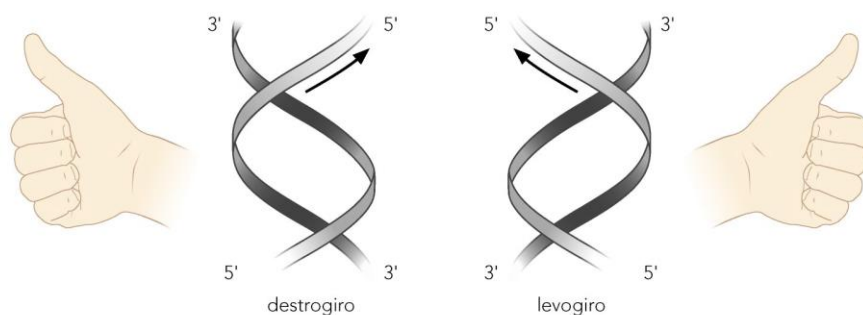


La **flessibilità** dei nucleotidi negli acidi nucleici **è limitata dagli angoli di rotazione** permessi intorno ai legami glicosidici, dal ripiegamento dell'anello del ribosio e dagli angoli di torsione dello scheletro covalente zucchero-fosfato



I sette angoli di torsione che determinano la conformazione di una unità nucleotidica

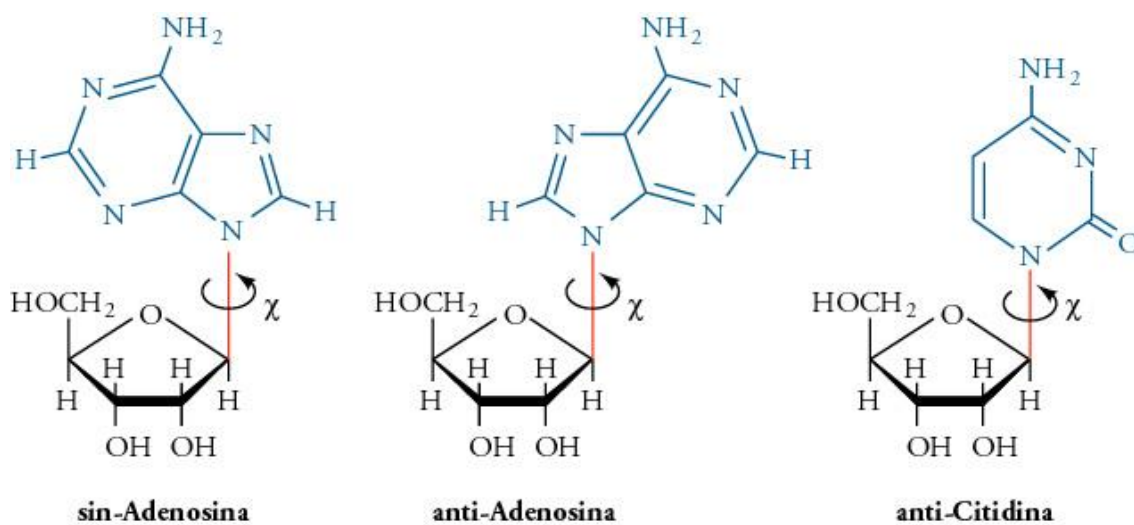
	Tipo di elica		
	A	B	Z
Forma	Più larga	Intermedia	Più allungata
Altezza occupata da una coppia di basi	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Diametro dell'elica	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Senso	Destrogiro	Destrogiro	Levogiro
Legame glicosidico	<i>anti</i>	<i>anti</i>	<i>anti</i> per C, T <i>sin</i> per G
Coppie di basi per giro dell'elica	11	10,4	12
Passo dell'elica	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
Angolo formato dalla coppia delle basi con la perpendicolare all'asse dell'elica	19°	1°	9°
Scanalatura principale	Stretta e molto profonda	Ampia e molto profonda	Piatta
Scanalatura secondaria	Molto larga e poco profonda	Stretta e molto profonda	Molto stretta e profonda



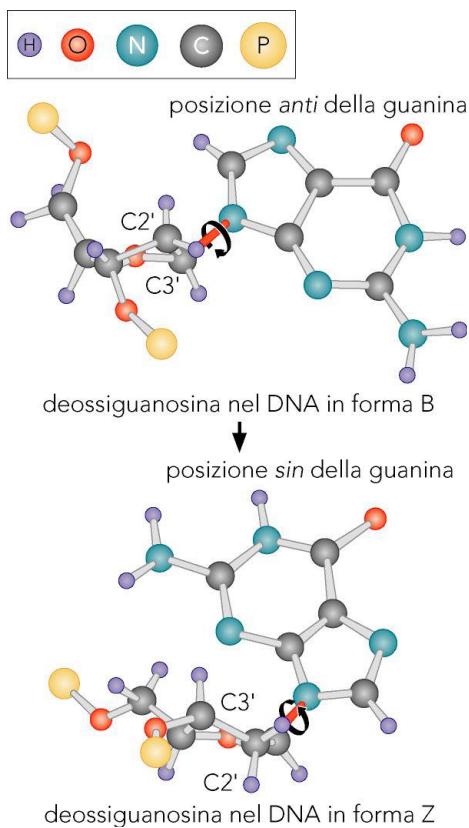
La struttura degli **Acidi Nucleici**

Il legame della base al deossiribosio può presentarsi nella conformazione **SIN** e **ANTI**. Nella **forma** **destrogiro** del DNA le basi sono sempre in conformazione **ANTI**.

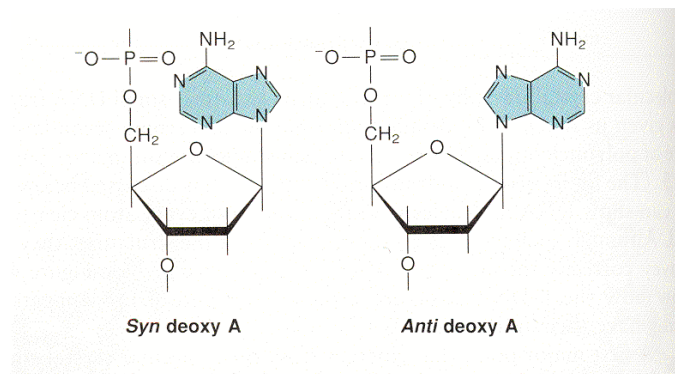
Nella maggior parte degli acidi nucleici a doppia elica, le basi sono nella conformazione anti



Nella struttura Z del DNA si osserva un'alternanza di purine e pirimidine dove le purine (G) assumono una conformazione SIN mentre le pirimidine (C) hanno la conformazione canonica ANTI provocando un **pattern a zig-zag** dei gruppi fosfato da cui il nome **Z-DNA**

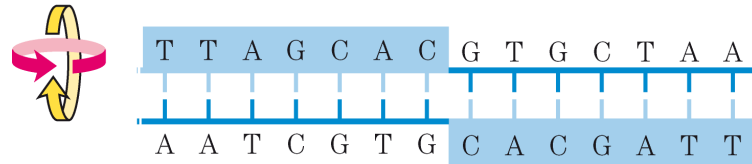


5'-GCGCGCGCGC-3'
3'-CGCGCGCGCG-5'
isole CG

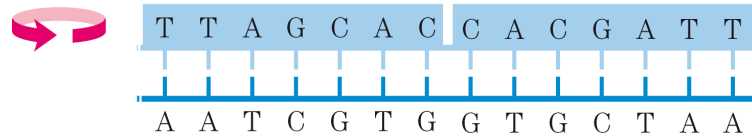


Sequenze di DNA che adottano strutture insolite

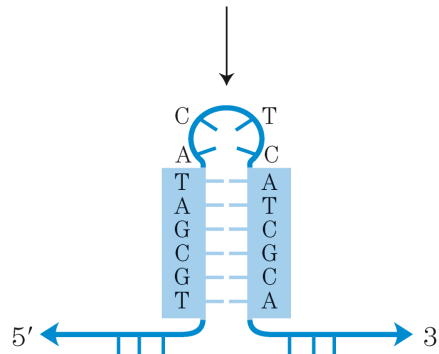
Palindromo



Ripetuto speculare

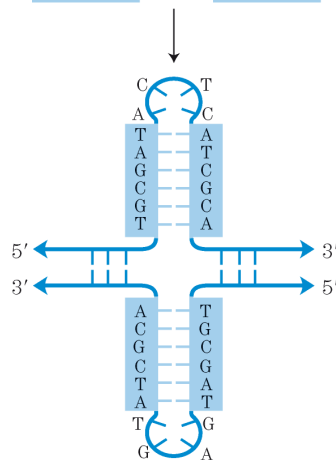


Ripetizioni invertite



(a)

Struttura a forcina



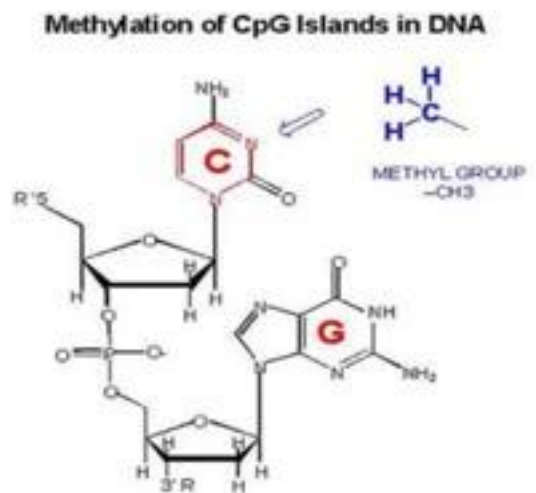
(b)

Struttura a croce

Lehninger

METILAZIONE DI BASI DEL DNA

La metilazione del DNA è una delle più importanti **modificazioni post-replicative** del genoma. Consiste nel legame covalente di gruppi metilici alle basi azotate del DNA.

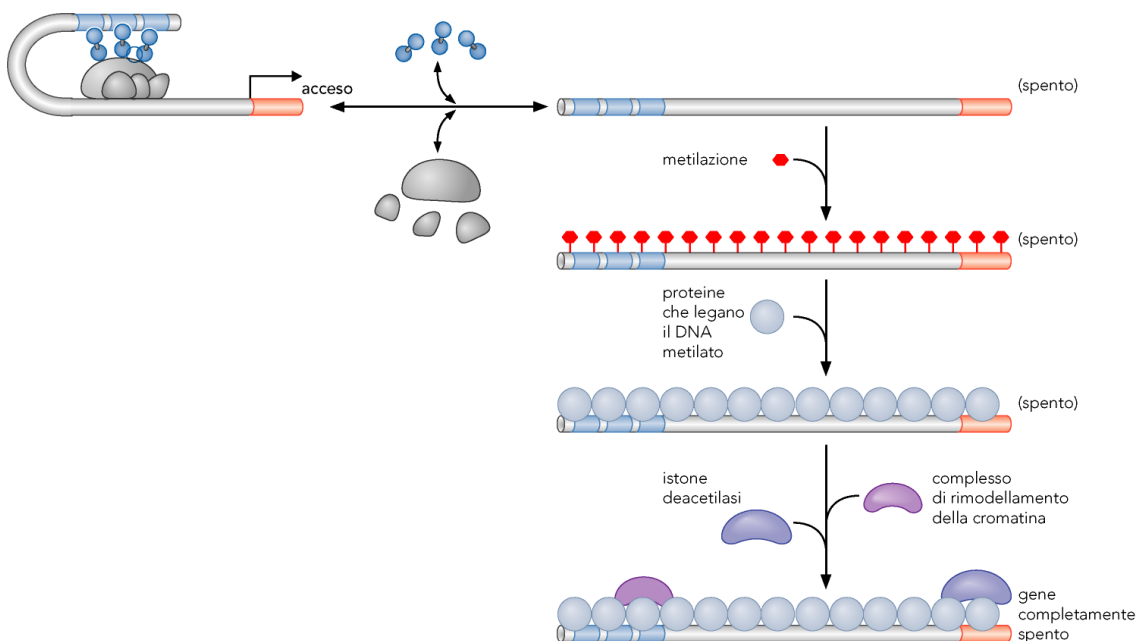


Metiltransferasi

Eucarioti: Questo tipo di metilazione si raggruppa in particolari zone del genoma eucariotico chiamate anche **isole CpG**.

La metilazione del DNA in queste regioni che sono poste generalmente a regioni intorno ai promotori è un fenomeno che interviene:

- nel **controllo dell'espressione genica**,
- nella **struttura cromatinica (rimodellamento)**,
- nell'**inattivazione del cromosoma X**,



I promotori dei geni housekeeping possiedono isole CpG ipometilate

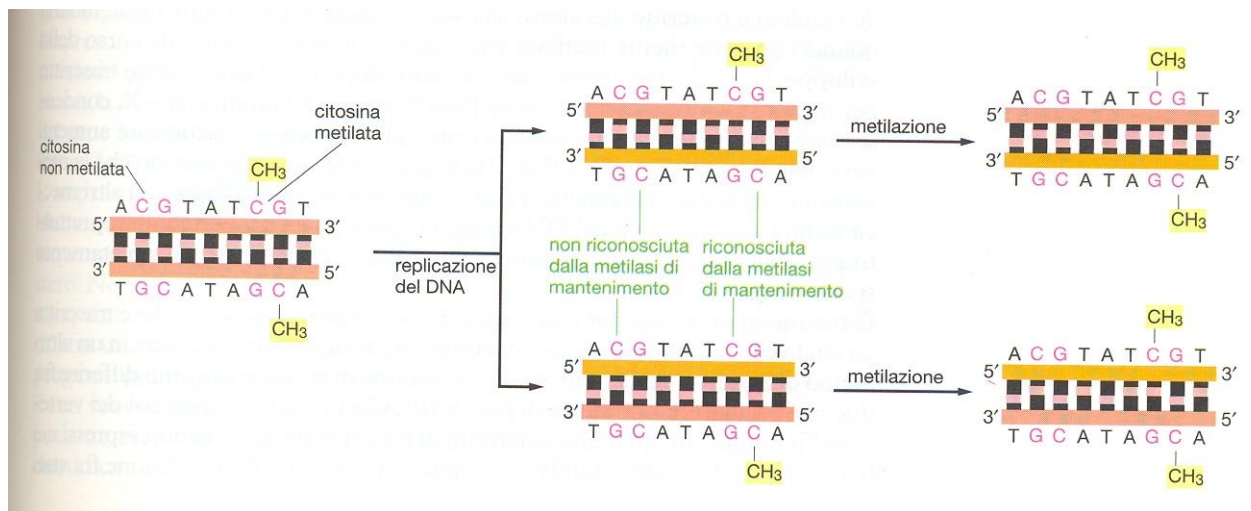
Metilazione del DNA = Silenziamento di un gene

Questo meccanismo di repressione, insieme ad altri meccanismi di controllo dell'espressione genica, stabiliscono una forma particolarmente efficiente di repressione genica. Questa combinazione di meccanismi assicura che i geni eucariotici non necessari possano essere repressi ad alti livelli.

Esempi di sinergia:

- I gruppi metilici delle citosine sporgono dal solco maggiore, interferendo con l'attacco di proteine di regolazione;
- Proteine che si legano al DNA metilato, modificando a loro volta altre proteine, come gli istoni, portano il DNA (cromatina) in uno stato repressivo

Una volta che uno schema di metilazione è stato stabilito, ciascun sito di metilazione viene ereditato da una generazione cellulare ad un'altra



E' una modifica EPIGENETICA

Ci sono cambiamenti fenotipici che non dipendono da cambiamenti della sequenza nucleotidica

DNA SUPERAVVOLTO

E' un aspetto particolare delle molecole di DNA,

SUPERAVVOLGIMENTO: avvolgimento di qualcosa che è già avvolto

Struttura terziaria

Il DNA circolare chiuso può essere attorcigliato e formare superavvolgimenti



E' in genere la manifestazione di una tensione strutturale e rappresenta una forma di immagazzinamento di energia.

Il superavvolgimento del DNA

Importante aspetto intrinseco alla struttura terziaria del DNA

Ubiquitario nel DNA cellulare

Altamente regolato in ogni cellula



Il DNA deve essere altamente compattato per trovare spazio all'interno della cellula

L'impacchettamento deve permettere l'accesso all'informazione contenuta nel DNA (replicazione, trascrizione)

La Duplicazione e la Trascrizione richiedono una temporanea separazione delle eliche di DNA senza che la molecola subisca danni

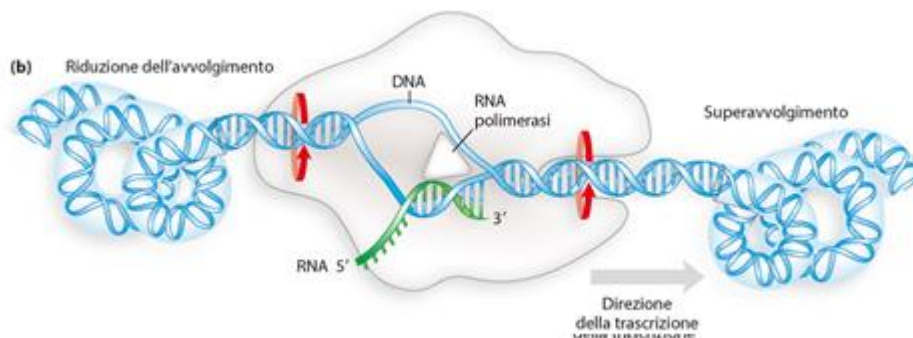


Il superavvolgimento è indotto dalla separazione delle catene di una struttura a doppia elica

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

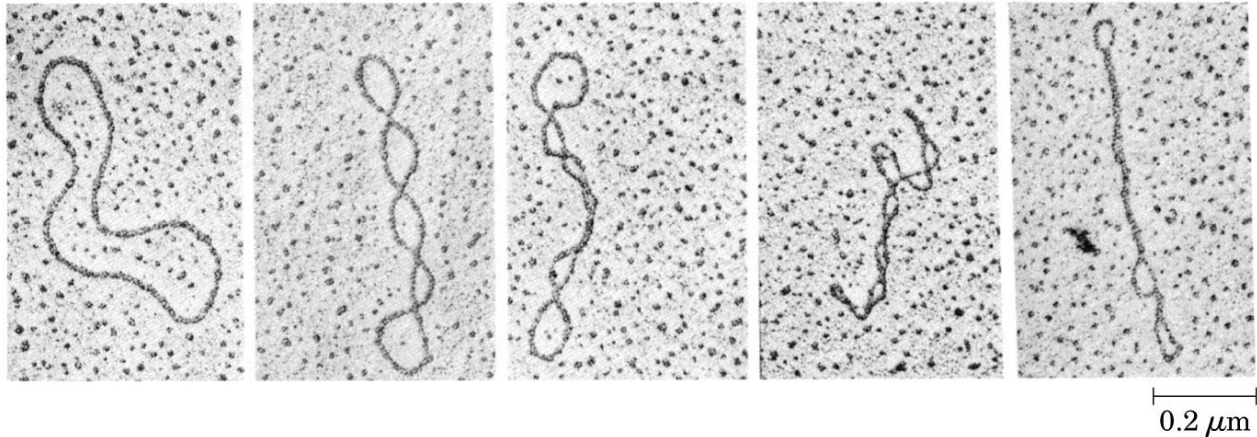


IL SUPERAVVOLGIMENTO AVVIENE QUANDO IL DNA È SOTTOPOSTO AD UNA SORTA DI DEFORMAZIONE STRUTTURALE

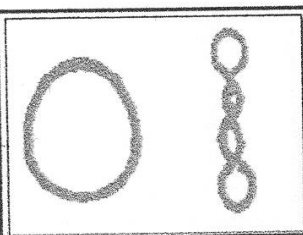


Anche la replicazione o la trascrizione del DNA, che richiedono una temporanea separazione delle eliche, comportano un aumento della tensione e producono qualche forma di superavvolgimento.

Il superavvolgimento avviene quando il DNA è sottoposto a una sorta di deformazione strutturale.



Un DNA superavvolto occupa meno spazio



Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAUVVOLGIMENTI

- Immaginando di avere due filamenti aventi le estremità libere, si può variare il numero di avvolgimenti di un filamento attorno all'altro mediante semplice rotazione
- La tensione torsionale così introdotta si "scaricherà" da sola lasciando libere di ruotare le estremità
- Ma le estremità dei filamenti di DNA dei procarioti non sono mai libere, essi infatti hanno DNA circolari
- Affinchè una doppia elica di DNA sia rilassata e priva di tensione torsionale esiste un numero ideale di paia di basi per ogni giro d'elica, pari a **10.5**
- Se tale numero aumenta o diminuisce si introdurrà nella molecola una tensione torsionale, che provocherà un superavvolgimento

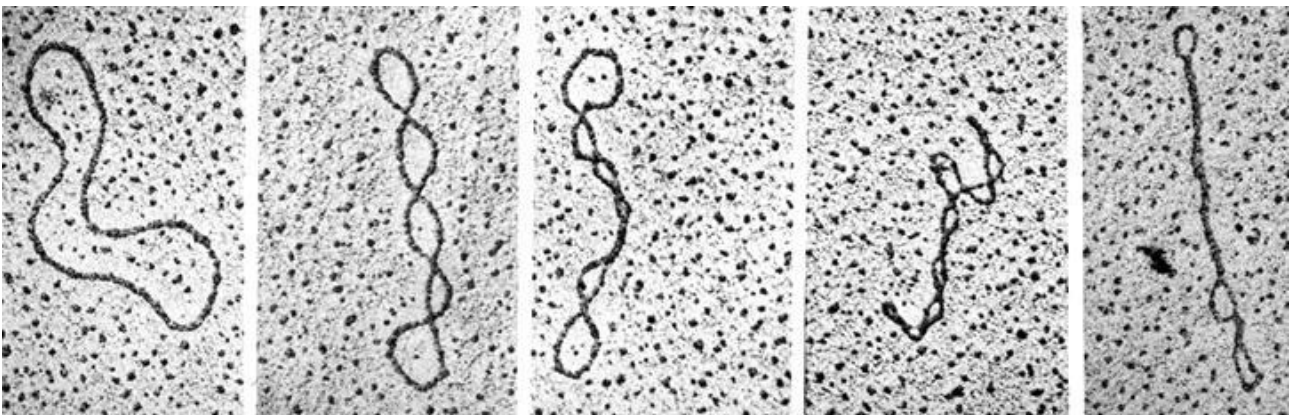
Fiorentini

Topologia del DNA

La **topologia** è una scienza che studia proprietà strutturali di un oggetto che non cambiano sotto continue deformazioni

PROPRIETÀ TOPOLOGICHE DEL DNA
non è alterato dalla torsione e dal ripiegamento
dell'asse

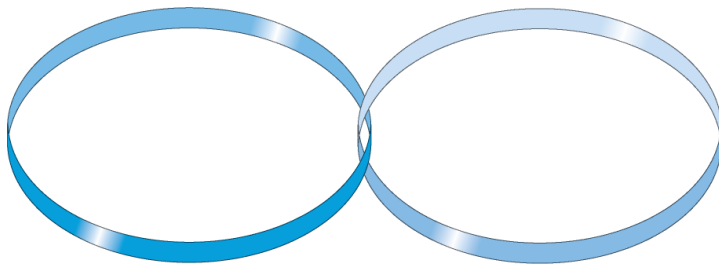
Può essere modificato soltanto con la rottura ed il
ricongiungimento della sua ossatura



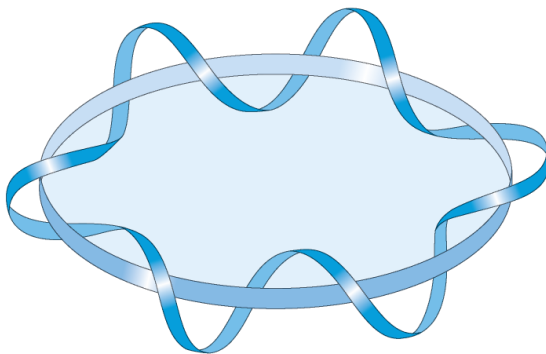
Una proprietà topologica è il numero di legame LK

IL NUMERO DI LEGAME LK

IL NUMERO di avvolgimenti della doppia elica attorno al proprio asse



(a) $Lk = 1$



(b) $Lk = 6$

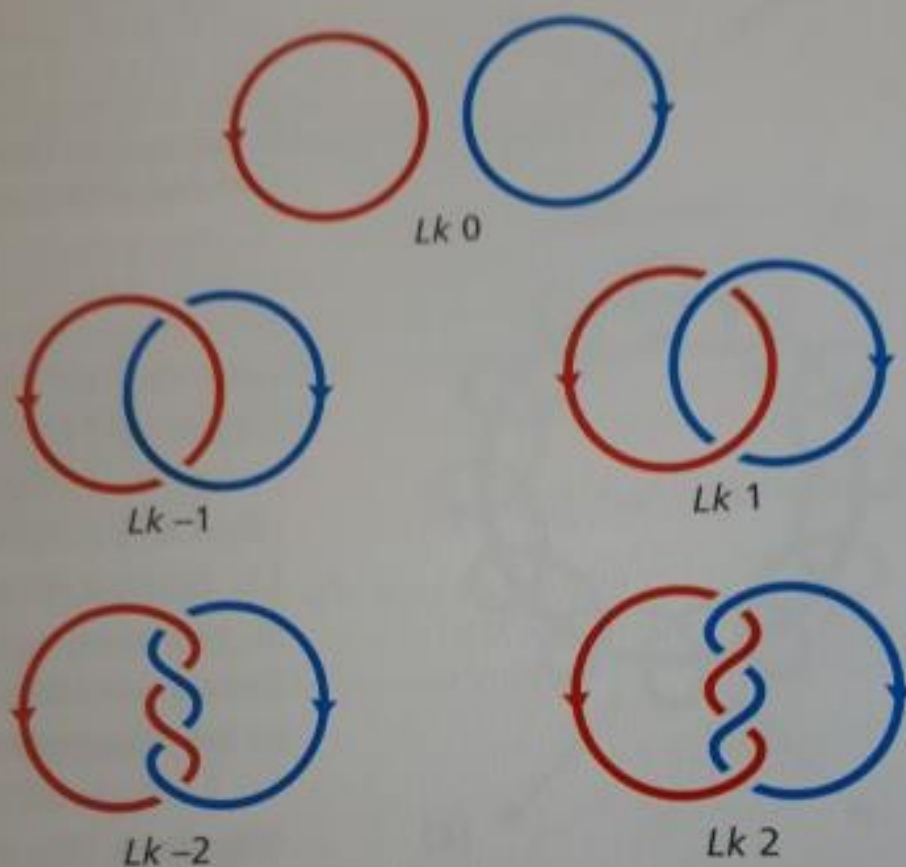
Specifica rigorosamente il numero dei giri dell'elica in un DNA circolare chiuso in assenza di superavvolgimento

Il modo con cui due curve si intersecano determina il numero di legame e il suo segno

LK è sempre un numero intero

L_k negativo per eliche avvolte in senso levogiro (sinistra)

L_k positivo per eliche avvolte in senso destrogiro (destra)



Numero di legame. Due curve qualsiasi chiuse nello spazio possono essere spostate, tagliate e risaldate in un numero variabile di modi. Nella figura sono mostrati alcuni semplici esempi. Il modo in cui le due curve si intersecano determina il numero di legame e il suo segno. Lk è di segno positivo per gli incroci a destra e negativo per gli incroci a sinistra.

Il numero di legame **LK** può essere scomposto in due componenti strutturali:

NUMERO DI TWISTING (**Tw**) (AVVOLGIMENTO)

Il numero di **twisting**, **T**, rappresenta il numero di volte che un filamento gira intorno all'altro; cioè definisce il n. di giri d'elica di Watson e Crick

Per una molecola di DNA circolare chiusa e rilassata

$$T = Lk$$

NUMERO DI WRITHING (**Wr**) (SUPERAVVOLGIMENTO,)

Il numero di **writhing**, **W**, rappresenta il numero di incroci dell'asse del duplex nello spazio e su se stesso.

Corrisponde al concetto intuitivo di superavvolgimento

Per una molecola di DNA circolare chiusa e rilassata

$$W = 0$$

Quando si verifica un cambiamento del numero di legame, parte della tensione risultante è solitamente compensata dall'avvolgimento (W_r , *superavvolgimento*) e parte da modificazioni della torsione (T_w) secondo l'equazione:

$$L_k = T_w + W_r$$

In un DNA rilassato

LK = 10 Tw = 10 Wr = 0 passo 10,5 pb/giro

Se il n. di giri viene ridotto di una unità, il nuovo filamento circolare compirà solo 9 giri per cui la molecola avrà un passo modificato da 10,5 a 11,67 pb/giro, per cui

LK = 9 Tw = 9 Wr = 0 passo = 11,67 pb/giro

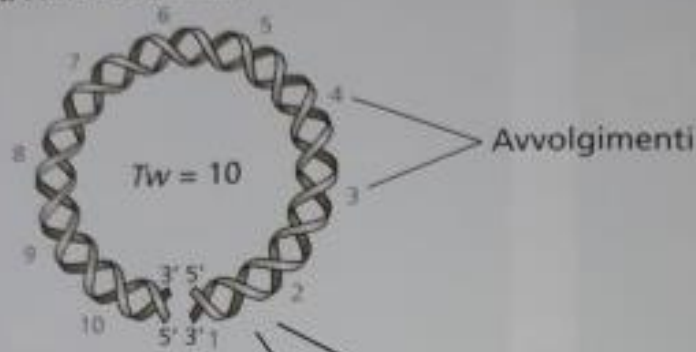
In questo caso la molecola è sottoavvolta, rispetto al normale, poiché il n. di giri è minore ed è necessario un maggior numero di coppie di basi per formare ciascun giro dell'elica

Anziché cambiare il Tw, la molecola si può attorcigliare o superavvolgersi, in questo caso:

LK = 9 Tw = 10 Wr = -1 passo 10,5 pb/giro

(A)

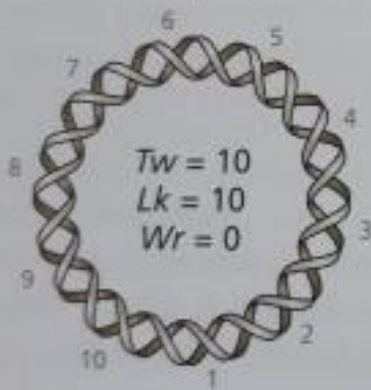
DNA lineare a doppio filamento



UNIONE DELLE
ESTREMITÀ

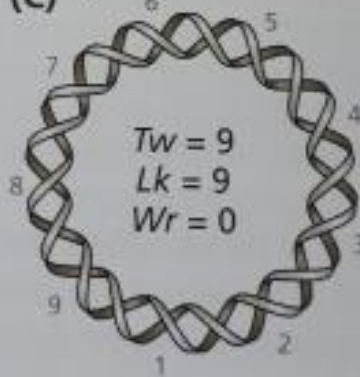
AVVOLGIMENTO A SINISTRA DI UN GIRO
E RIUNIONE DELLE ESTREMITÀ

(B)



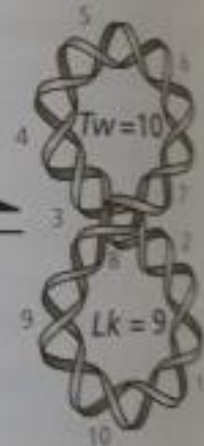
Struttura circolare
rilassata

(C)

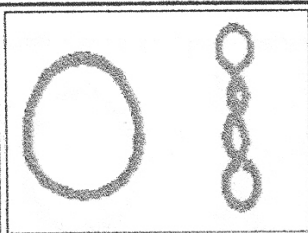


Struttura circolare
sottoavvolta

(D)

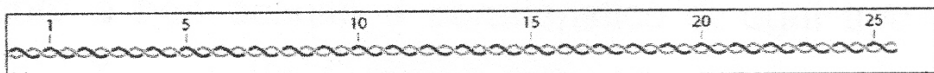
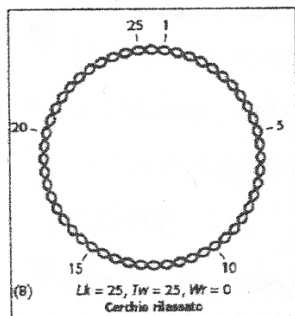


Superavvolgimento

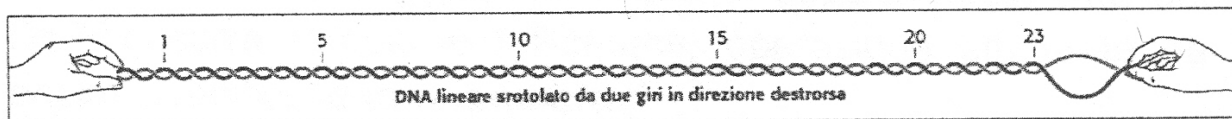


Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAVVOLGIMENTI NEGATIVI

Si supponga di considerare una molecola di DNA (lineare o circolare) che in condizioni rilassate contiene 10,5 coppie di basi per ogni giro della doppia elica

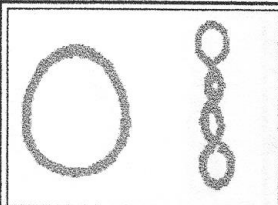


Si supponga di tagliare il DNA, di prenderne in mano le estremità e di "srotolarlo" di due giri, facendo diventare il numero di coppie di basi per giro **11,4**. Si richiudano le estremità



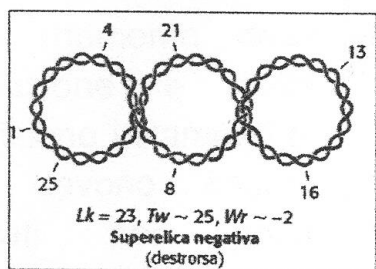
Tratti da: J. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer - "Biochimica", VI ed., Zanichelli

Fiorentini

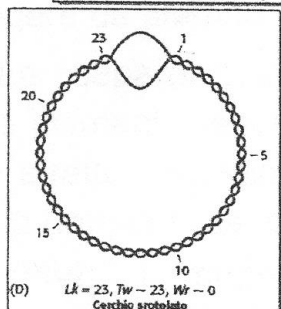


Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAVVOLGIMENTI NEGATIVI

La perturbazione che è stata introdotta nella molecola di DNA determina due possibili reazioni:



SUPERAVVOLGIMENTO: Il numero di giri è minore di quello IDEALE per la struttura rilassata, quindi il superavvolgimento è negativo



PARZIALE SEPARAZIONE DEI DUE FILAMENTI DI DNA: Per riequilibrare la tensione torsionale si può mantenere il numero di giri ideale nella maggior parte della molecola, limitando ad una piccola regione la separazione dei due filamenti

Tratti da: J. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer - "Biochimica", VI ed., Zanichelli

Fiorentini

Variazioni del n. di legame

Il n. di legame può essere variato tagliando 1 o 2 filamenti, introducendo delle rotazioni, e richiudendo covalentemente le due eliche

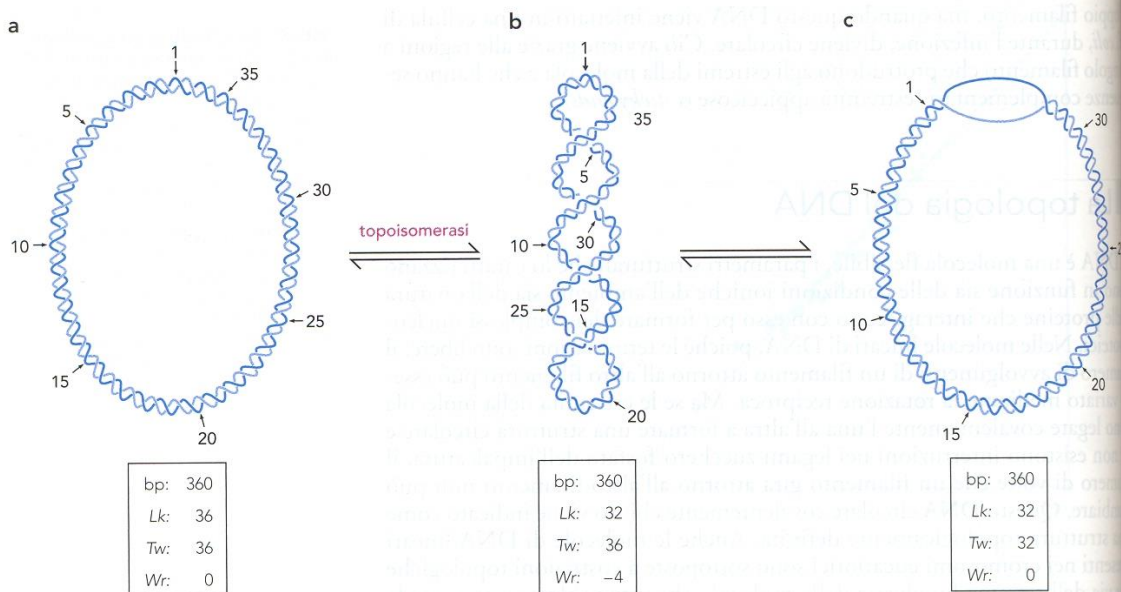
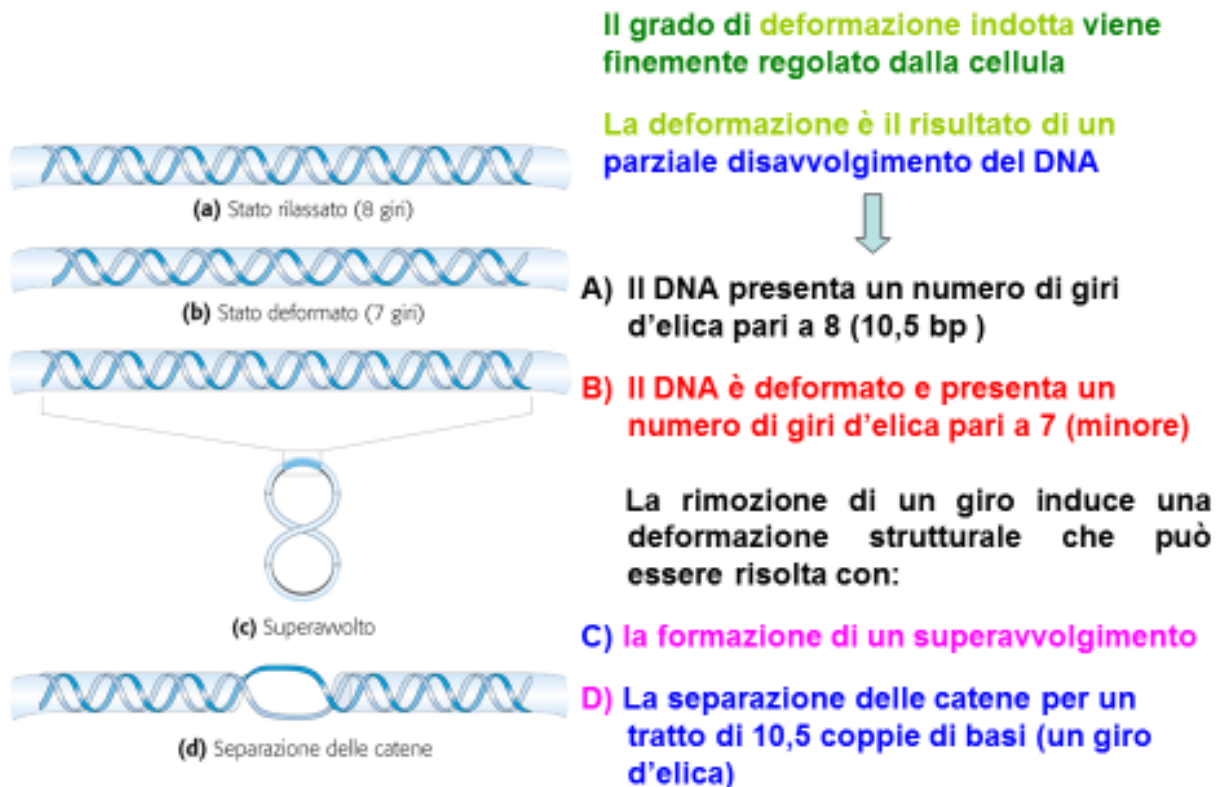


Figura 6.17
Conformazioni topologiche di un DNA circolare covalentemente chiuso (cccDNA). La figura mostra la conversione di un DNA in forma rilassata (a) in forma superavvolta negativamente (b) o con una parte della doppia elica aperta in singolo filamento (c). [Adattata da un diagramma del Dr. M. Gellert] (Fonte: modificata da Kornberg A. e Baker T.A. 1992. *DNA replication*, I 1-21, p. 32. © 1992 W. H. Freeman and Company. Usata con autorizzazione.)

è uguale al twist. In questo caso il numero di twist può essere facilmente determinato contando il numero di volte che i due filamenti incrociano su se stessi (Figura 6.17a). Il modo in cui i due filamenti si incrociano (*twist*) in una doppia elica destreggia è definito positivo: in questo caso il linking number avrà un valore positivo.

Però i cccDNA normalmente non hanno una conformazione planare, ma presentano generalmente delle tensioni torsionali che impongono all'asse longitudinale della doppia elica di incrociarsi su se stessa, a volte anche ripetutamente, determinando così una struttura tridimensionale (Figura 6.17b). Questo incrocio viene definito *writhe*. Per visualizzare le distorsioni causate dallo stress torsionale basta pensare ad un filo del telefono che si presenta naturalmente superavvolto.

Watson



Lehninger

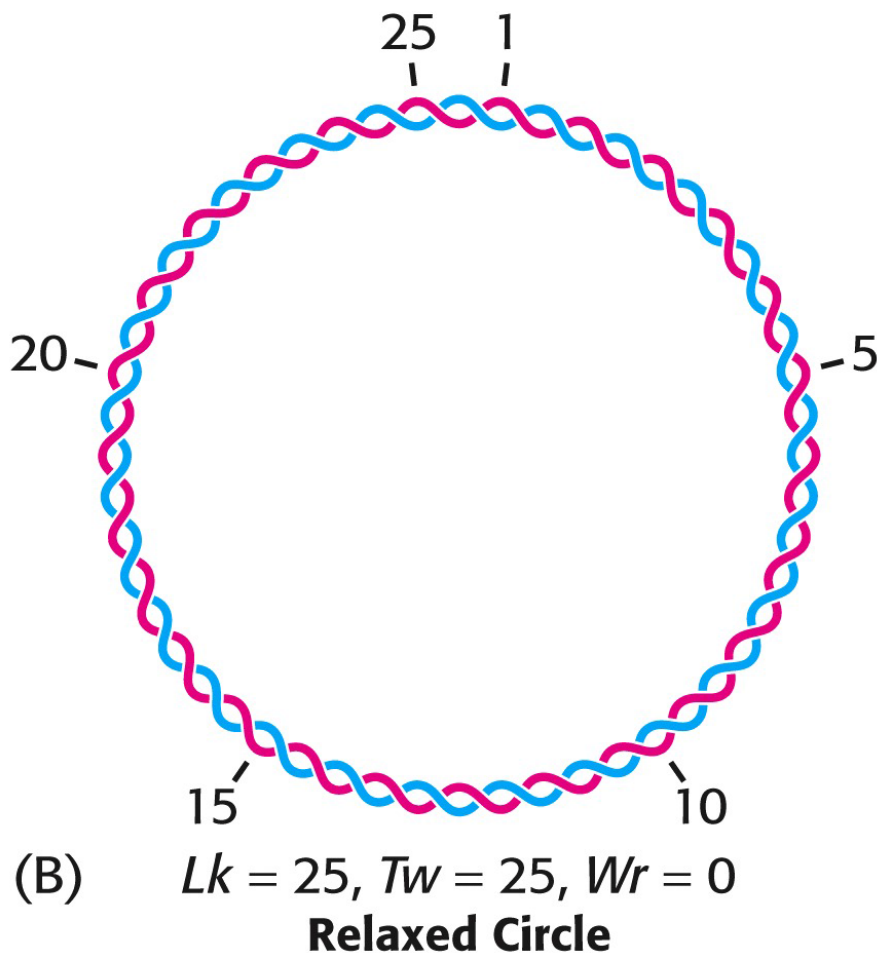
Segmento di DNA con 84 coppie di basi, nel DNA rilassato (a) contiene 8 giri di doppia elica, uno per ogni 10,5 coppie di basi. Se un giro è rimosso (b) ci saranno $84\text{pb}/7 = 12$ coppie di basi per giro, la molecola diventa termodinamicamente svantaggiata. La deformazione viene riequilibrata o con un superavvolgimento (c) o con una parziale separazione delle eliche (disavvolgimento) (d) ma che implica la rottura dei legami idrogeno, quindi richiesta di più energia



DNA a doppia elica in forma B, costituito da 260 coppie di basi.

Poiché il numero di residui nucleotidici per giro dell'elica in una molecola di DNA non sottoposta a tensione è di 10,4 questa molecola di DNA lineare presenta 25 giri.

Se si uniscono le estremità di questa molecola si ottiene una molecola circolare **rilassata.**

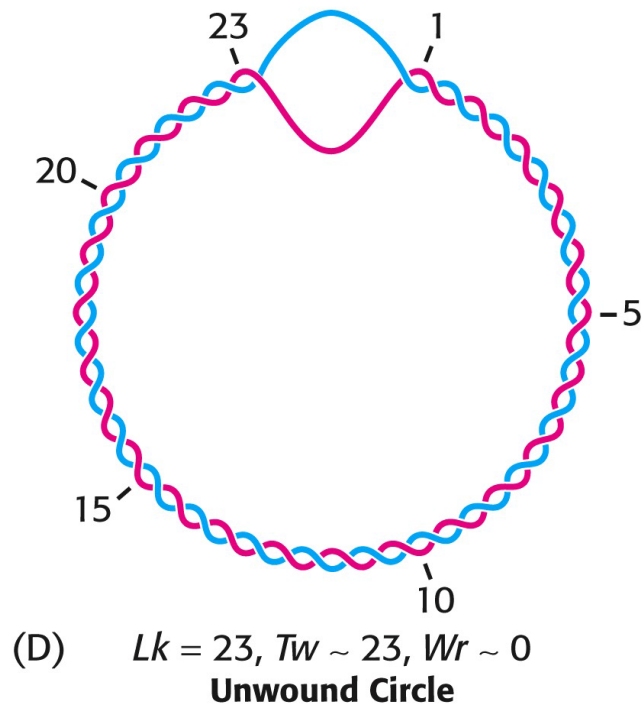


Se si srotola la doppia elica lineare di due giri prima di riunire le estremità

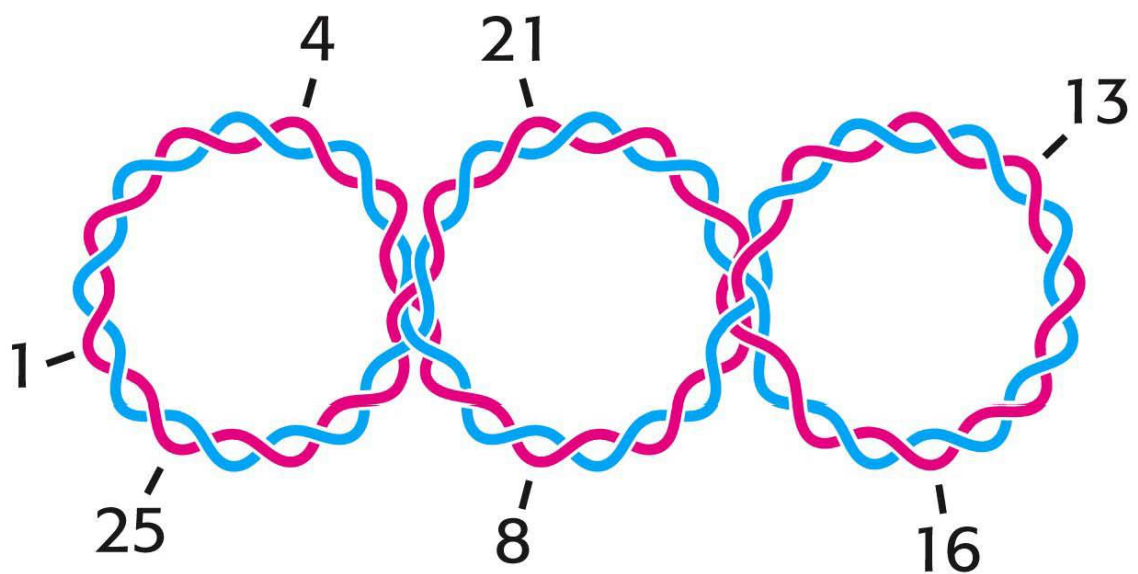


si ottiene un diverso tipo di DNA circolare con due possibili conformazioni alternative.

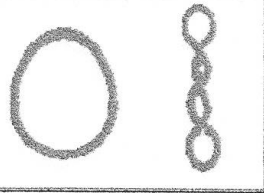
- **Il DNA può ripiegarsi in una struttura contenente 23 giri di elica B e un anello srotolato**



- Oppure può adottare una struttura superavvolta con 25 giri di elica B e due giri di superavvolgimento destrorso, detto superelica negativa.



(E) $Lk = 23, Tw \sim 25, Wr \sim -2$
Negative superhelix
 (right-handed)



Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAVVOLGIMENTI NEGATIVI

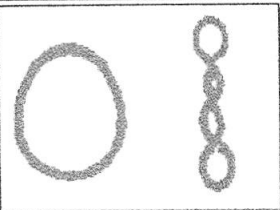
■ Tutte le molecole di DNA dei procarioti sono parzialmente disavvolte, cioè contengono **supereliche negative**, ed il grado di disavvolgimento è ben definito e caratteristico di ogni tipo cellulare

■ Oltre a rendere il DNA più compatto, i superavvolgimenti negativi facilitano la **separazione dei due filamenti**, indispensabile nei processi di replicazione e trascrizione

■ Per modificare il grado ed il tipo di superavvolgimento del DNA occorre romperne i filamenti, operazione effettuata da enzimi specifici, le **topoisomerasi**

■ I batteri contengono un tipo di topoisomerasi, detta **DNA girasi**, che introduce superavvolgimenti **negativi**

Florentini

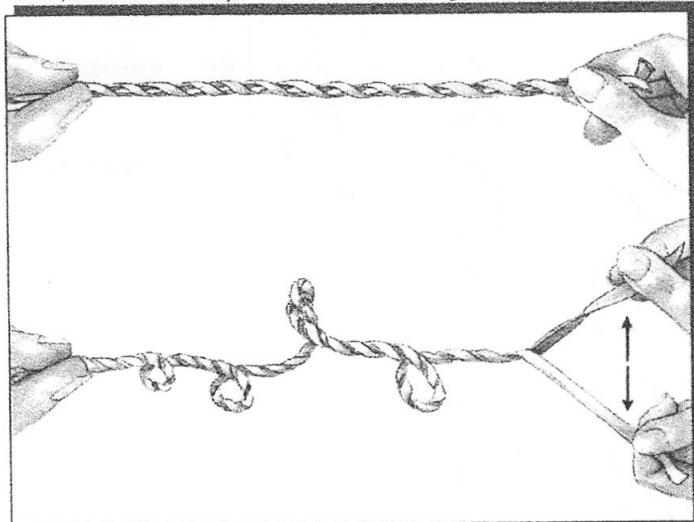


Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAVVOLGIMENTI POSITIVI

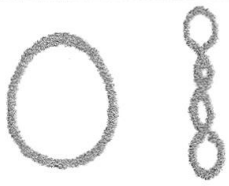
Tratto da: D.L. Nelson, M.M. Cox "I Principi di Biochimica di Lehninger", IV ed., Zanichelli

■ Nel momento della duplicazione e della trascrizione i filamenti di DNA devono essere separati per poter fungere da stampo

■ La separazione dei due filamenti genera un più stretto avvolgimento della doppia elica, che reagisce generando **superavvolgimenti positivi**. I superavvolgimenti positivi rendono più difficoltosa la separazione dei filamenti di DNA



Florentini



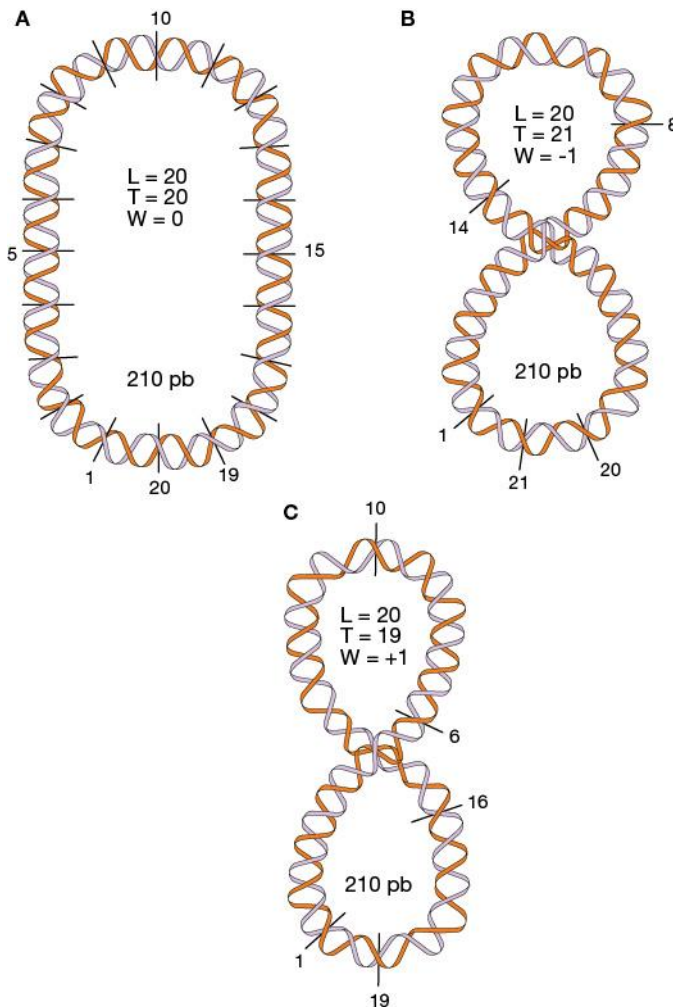
Struttura e metabolismo degli acidi nucleici: SUPERAVVOLGIMENTI POSITIVI

- La formazione di superavvolgimenti positivi impedisce l'ulteriore separazione dei due filamenti, rendendo sempre più difficili i processi di duplicazione e trascrizione
- Le supereliche positive devono quindi essere rimosse man mano che si formano
- Per rimuovere tali superavvolgimenti positivi i procarioti utilizzano la DNA girasi, che agisce rompendo entrambi i filamenti di DNA

Florentin

Due forme di DNA circolare che differiscono solo per il numero di legame sono detti **topoisomeri**

I topoisomeri del DNA possono trasformarsi l'uno nell'altro solo tagliando una o entrambe le catene del DNA e poi ricongiungendole tra loro.



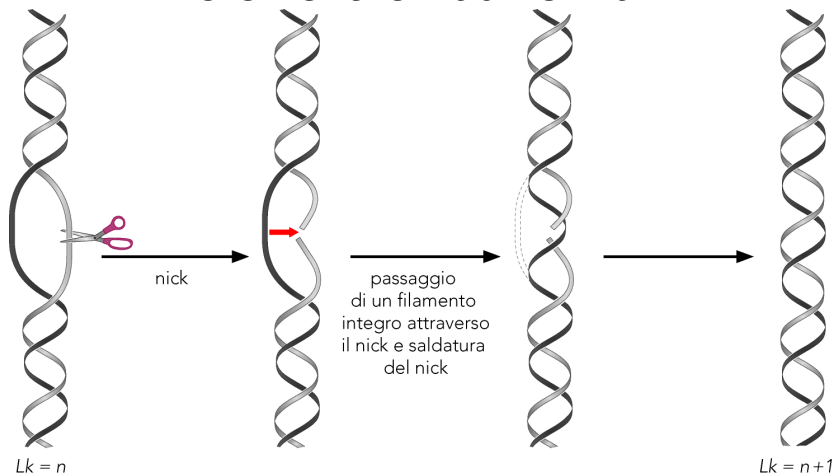
Variazioni del Twist e del Writhe in una molecola covalentemente chiusa, quindi con un **n. di legame LK costante**

TOPOISOMERASI

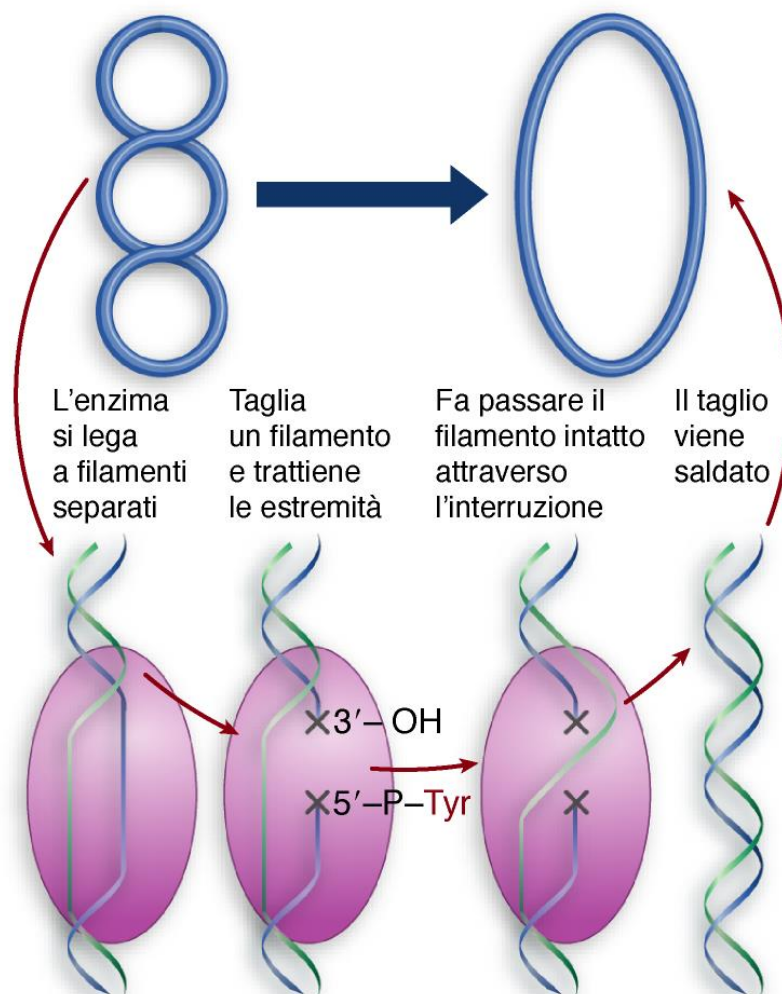
**Enzimi che determinano l'aumento o la diminuzione del grado di disavvolgimento del DNA
 Catalizzano le variazioni del numero di legame**

Sono necessarie per cambiare la struttura del DNA in modo tale che la replicazione e la trascrizione possano procedere

Topoisomerasi di tipo I: rompono transitoriamente una delle due catene del DNA, ruotano l'estremità attorno alla catena integra e riuniscono le estremità interrotte; modificano LK con incrementi o riduzioni di 1



Le topoisomerasi di tipo I agiscono su filamenti singoli



MECCANISMO TOPOISOMERASI I

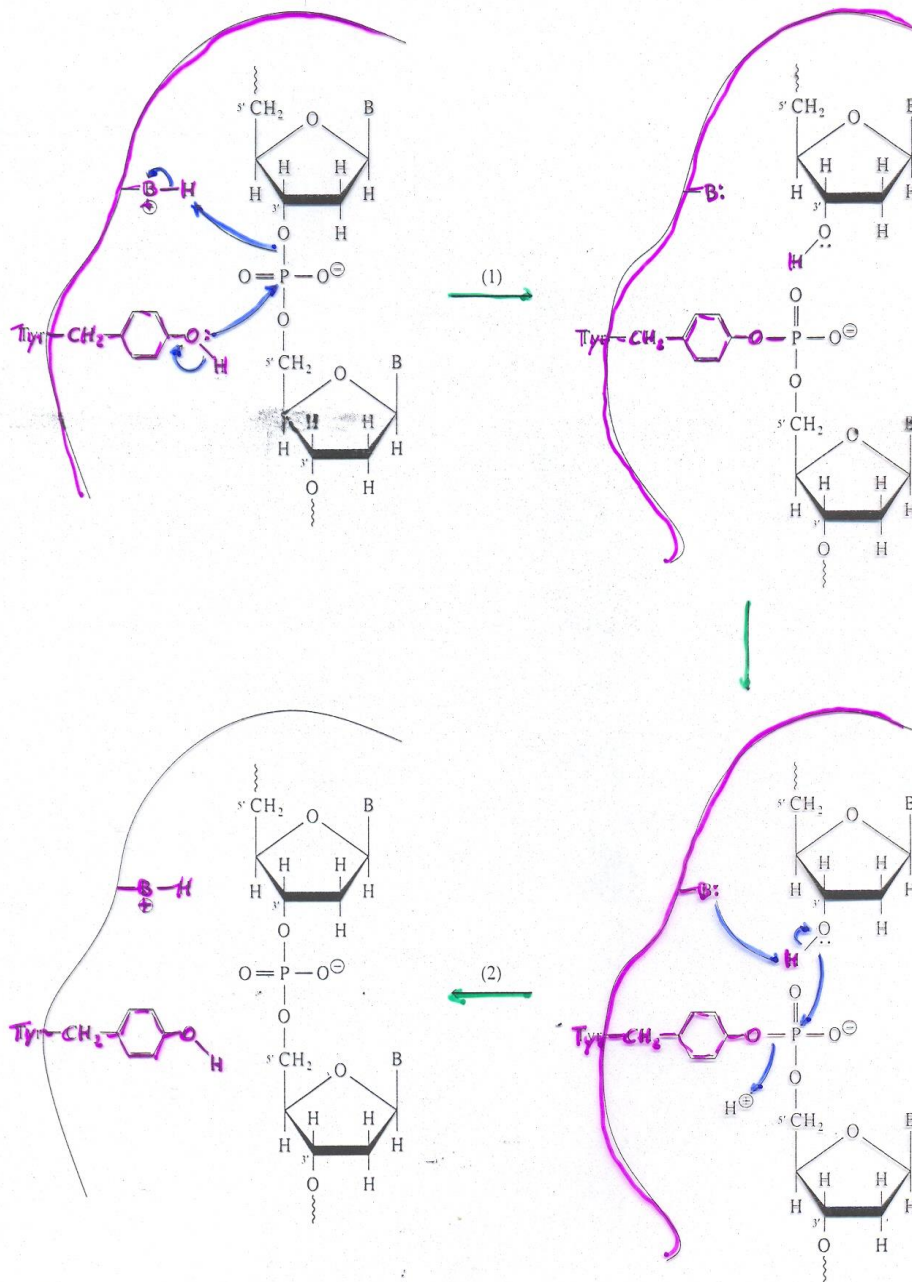
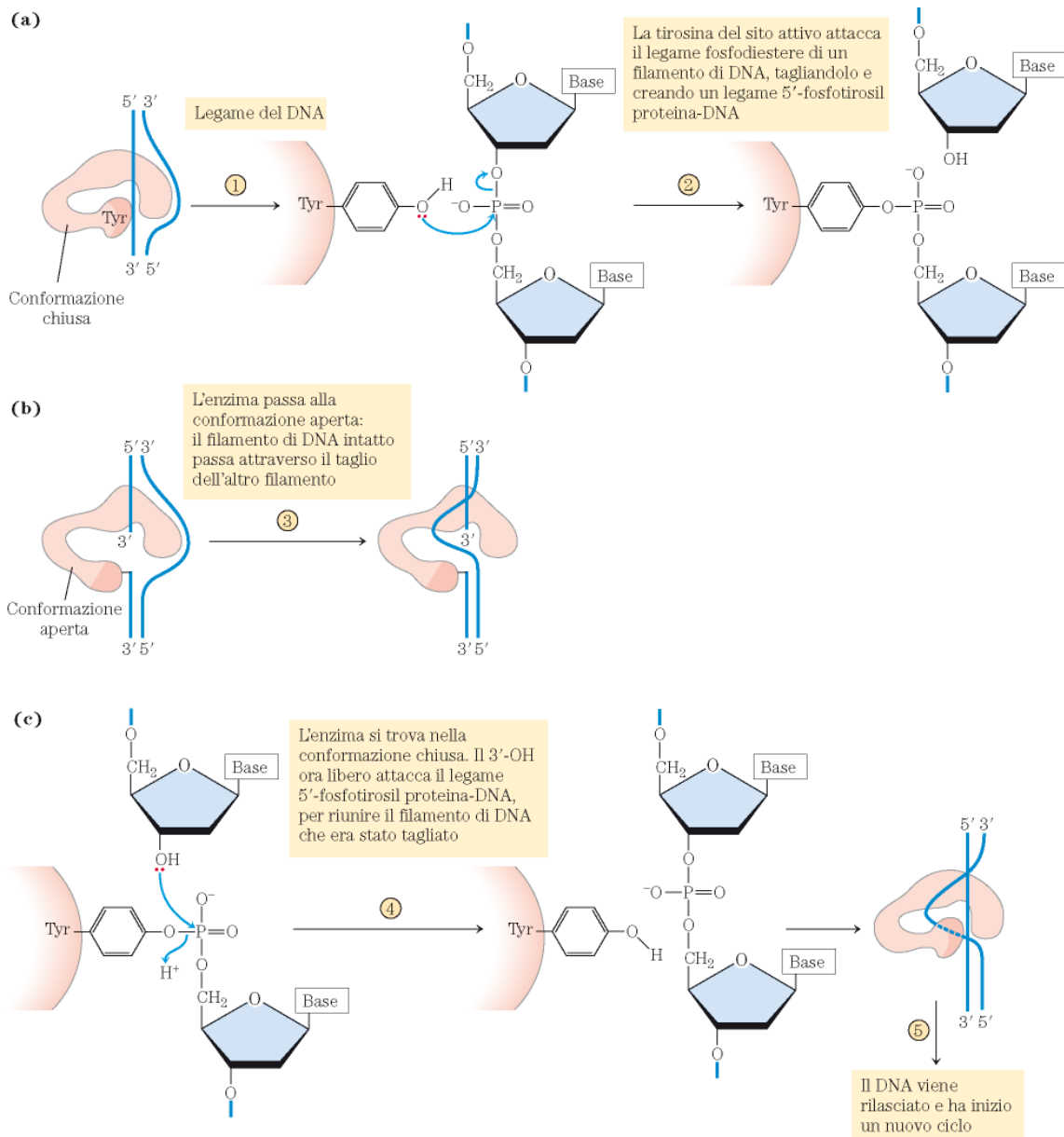


Figura 22.17

Meccanismo d'origine della topoisomerasi I.

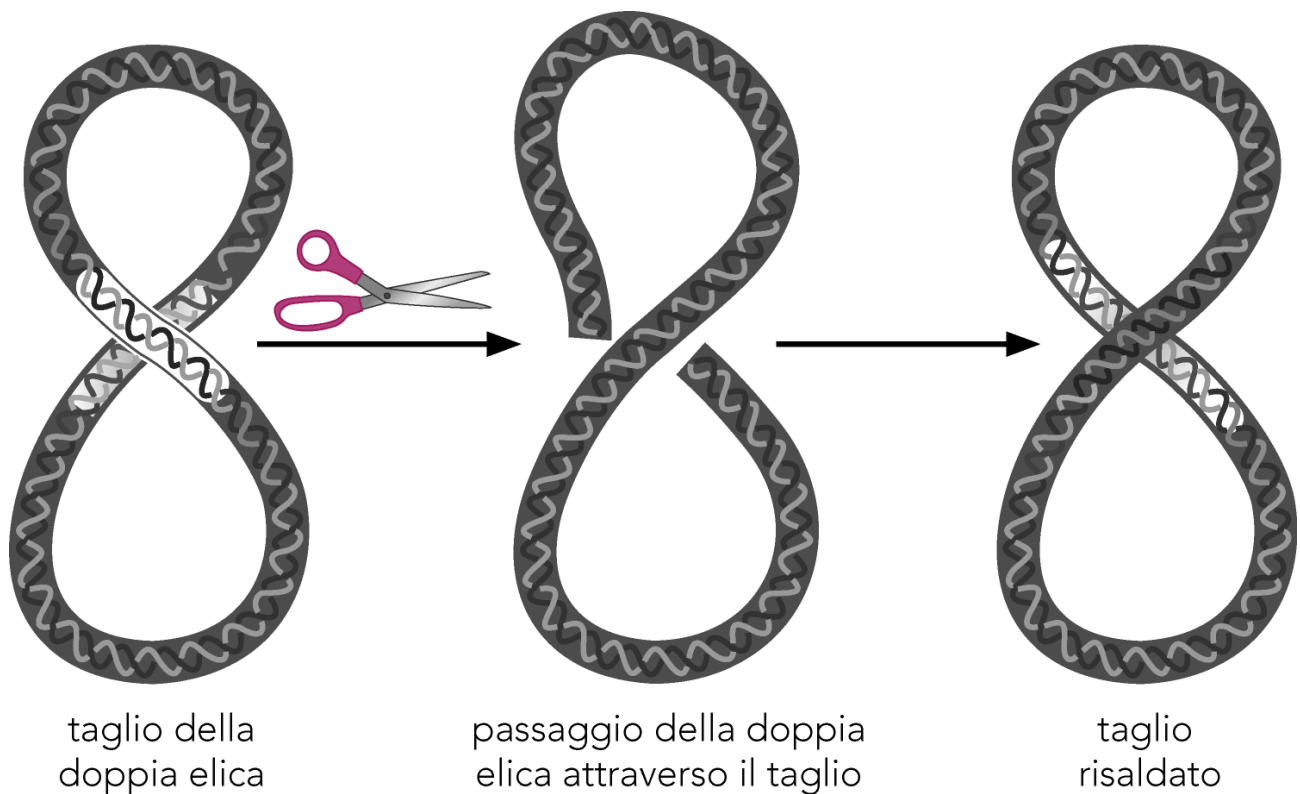
(1) Il gruppo ossidrilico di un residuo di tirosina, nel sito attivo dell'enzima, forma un legame fosfodiester con il fosfato 5' della catena di DNA, rompendola; l'estremità 3' del filamento rotto si lega poi all'enzima in modo non covalente. (2) Dopo che il secondo filamento è passato attraverso la lacuna, si ricostituisce il legame fosfodiester originale del primo filamento.



Lehninger

Topoisomerasi di tipo I – c'è conservazione di energia che permette la saldatura del filamento interrotto senza il consumo di ATP.

Topoisomerasi di tipo II: inducono rotture transitorie su entrambi i filamenti; modificano Lk con incrementi o riduzioni di 2.



Watson

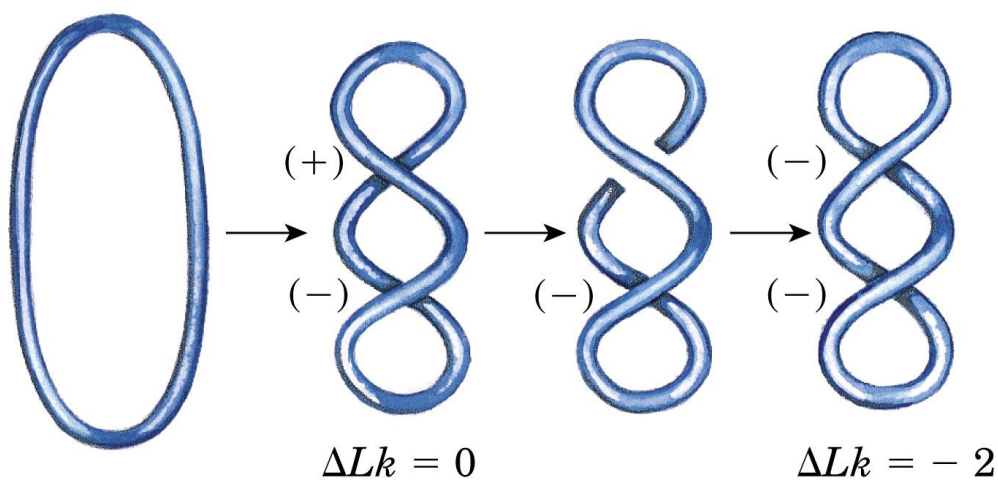
Poiché i legami **non sono** conservati, è **necessario** apporto di energia

La reazione richiede quindi l'idrolisi di una molecola di **ATP** per ogni evento catalitico

In *E. coli* ci sono almeno quattro diverse topoisomerasi, identificate da numeri romani da I a IV.

Le **topoisomerasi di tipo I** (topoisomerasi I e III) generalmente rilassano il DNA rimuovendo i superavvolgimenti negativi.

La **topoisomerasi II**, un enzima batterico di tipo II, detta anche **DNA girasi**, è in grado di indurre superavvolgimenti negativi (diminuisce Lk). Tale enzima utilizza l'energia dell'ATP



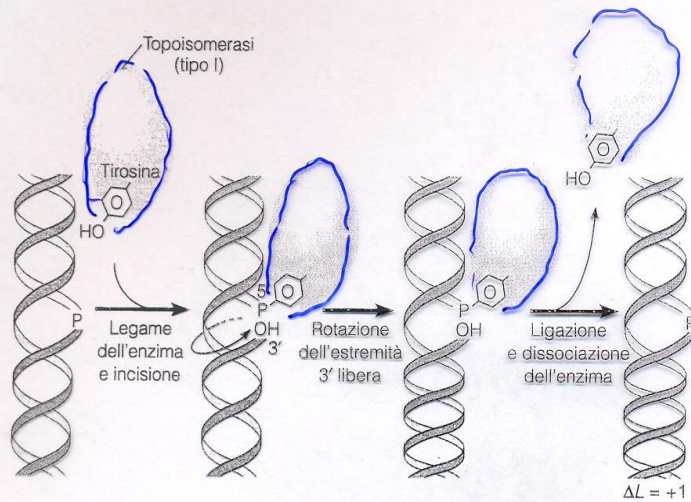


FIGURA 24.26

Meccanismo di azione della topoisomerasi di tipo I. L'enzima scinde un filamento e ne immobilizza l'estremità 5' stabilendo un legame covalente tra il fosfato del DNA e un residuo di tirosina (nella topoisomerasi di *E. coli*). La rotazione dell'estremità 3' è seguita dalla risaldata. Nell'esempio mostrato il numero di legame è incrementato di 1 (DNA sottoavvolto).

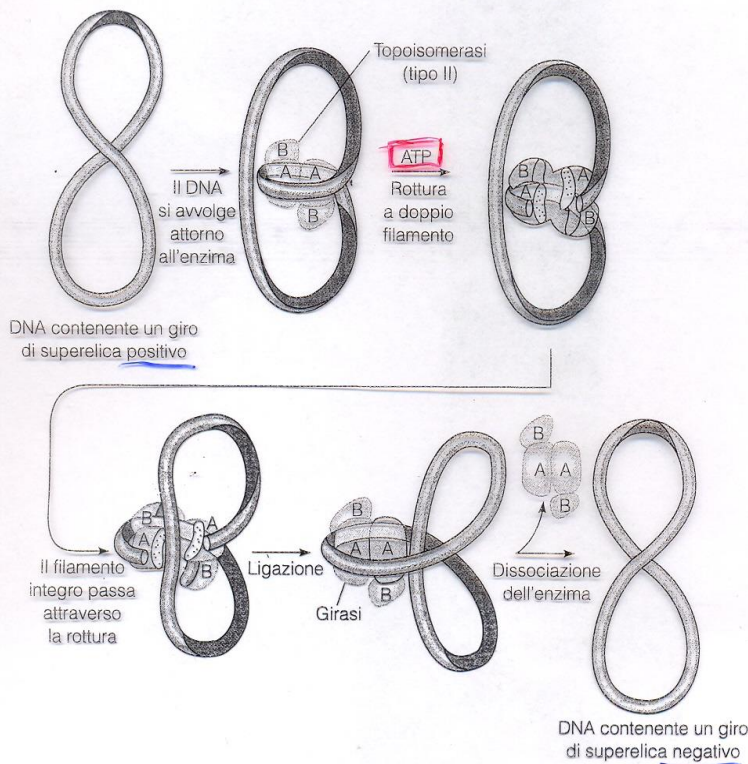
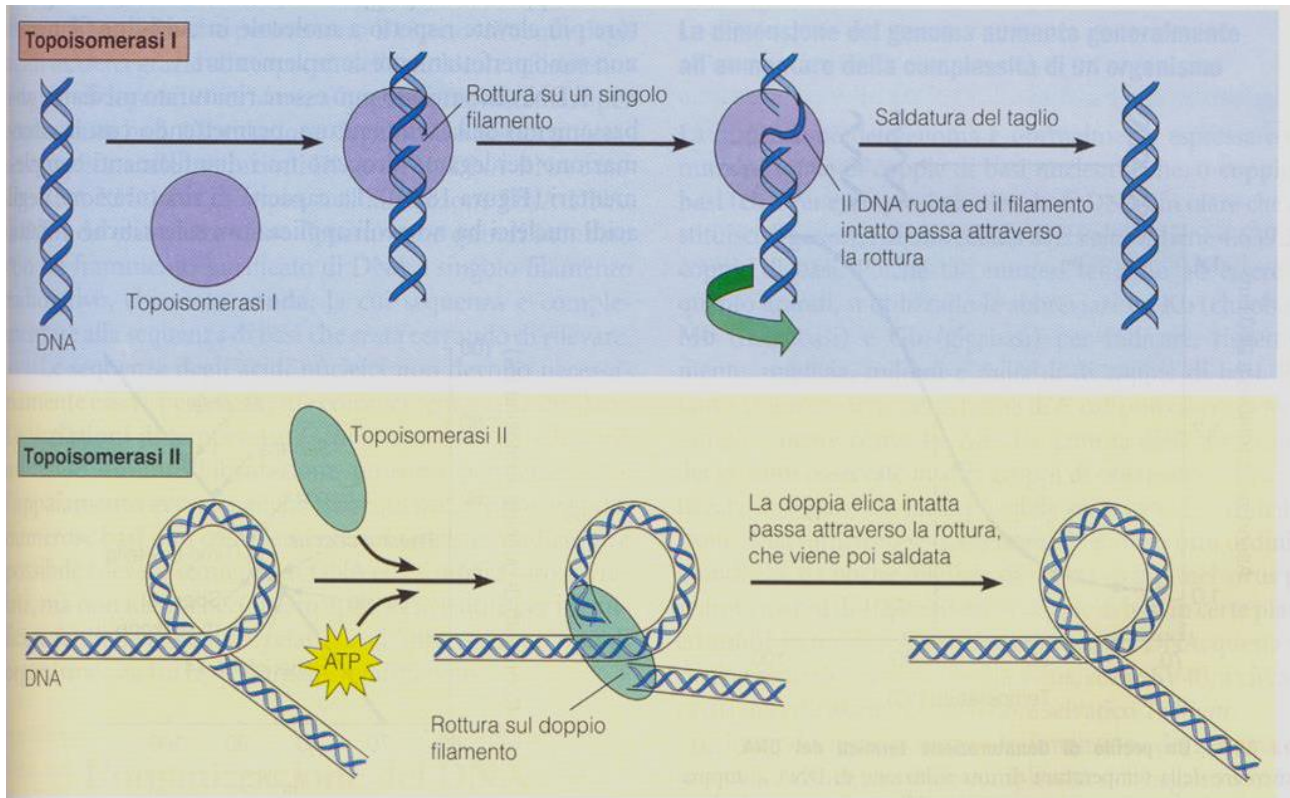


FIGURA 24.27

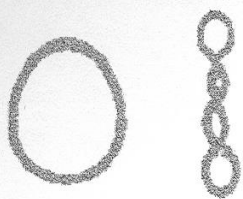
Meccanismo di azione della topoisomerasi di tipo II. Agendo nell'esempio riportato come una DNA girasi, l'enzima introduce due giri negativi di superelica e modifica il numero di legame da +1 a -1. L'enzima catalizza una rottura a doppio filamento immobilizzando le estremità mentre il duplex integro passa attraverso l'interruzione. La risaldata converte la supertorsione da positiva a negativa, conferendo alla molecola un ΔL di -2. Le topoisomerasi di tipo II possono rilassare duplex con giri di superelica negativi mediante il meccanismo inverso rispetto a quello descritto.

Adattato da A. Kornberg and T.A. Baker, *DNA Replication*, 2nd ed. (New York: W.H. Freeman and Co., 1992), p. 390.
© 1992 W.H. Freeman and Co. Utilizzato su autorizzazione.

Meccanismo della **topoisomerasi**



Gli inibitori delle topoisomerasi sono diventati importanti agenti farmacologici i cui bersagli sono organismi patogeni e cellule maligne



GLI INIBITORI DELLE TOPOISOMERASI

- Esistono composti che hanno come bersaglio specifico la DNA girasi ma non le topoisomerasi degli eucarioti e sono pertanto utilizzati come antibiotici
- La **ciprofloxacina** (utilizzata nelle infezioni urinarie e nel trattamento dell'antrace) interferisce con la rottura e la successiva sigillatura dei filamenti di DNA catalizzate dalla DNA girasi
- La **doxorubicina** e l'**etoposide** inibiscono invece maggiormente le topoisomerasi degli eucarioti, e sono quindi usati nella chemioterapia antitumorale