



***UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA***

Dipartimento di Biologia

Scuola di Dottorato di Ricerca in: Biochimica e Biotecnologie

Indirizzo: Biotecnologie

Ciclo: XXI

***DNA Topoisomerasi IB umana: studi sul
meccanismo catalitico e sulla
farmaco-resistenza***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Supervisore : Ch.mo Prof. Piero Benedetti

Dottorando : Erica Cretaio

Riassunto

La DNA topoisomerasi I (Top1p) catalizza cambiamenti nella topologia del DNA mediante la formazione di un intermedio covalente enzima-DNA, che è reversibilmente stabilizzato dall'agente antitumorale camptotecina (CPT). Studi cristallografici di una Top1p, mancante della porzione N-terminale, legata covalentemente ad un filamento di DNA, mostrano una proteina monomericamente che lega il substrato come una tenaglia. In questa struttura sono individuabili un dominio core, che costituisce insieme al dominio C-terminale la parte globulare della proteina e un dominio linker. La CPT lega l'intermedio covalente limitando la flessibilità del dominio linker e consentendone la cristallizzazione. Precedentemente abbiamo dimostrato che la mutazione del residuo Ala653 in Pro determina un incremento nella tasso di riligazione rendendo il mutante Top1A653Pp resistente alla CPT (Fiorani, et al., 2003). Studi di dinamica molecolare suggeriscono che questa mutazione si associa ad un incremento nella flessibilità del dominio linker capace di alterare l'equilibrio della reazione catalizzata dalla Top1p. Tuttavia i dati derivanti da studi strutturali, biochimici e di dinamica molecolare, condotti su questa proteina, forniscono scarse evidenze sul fatto che la flessibilità del dominio linker possa influenzare la geometria del sito attivo. Per verificare se l'incremento nel tasso di riligazione causato dalla mutazione A653P, potesse sopprimere il difetto nella riligazione indotto dalla mutazione T718A, localizzata nel sito attivo, abbiamo realizzato un doppio mutante Top1 A652P-T718Ap (DM). Il doppio mutante è vitale, cataliticamente attivo sia in vivo che in vitro e resistente alla CPT. Questi risultati suggeriscono l'esistenza di interazioni a lungo raggio tra il dominio linker ed il sito attivo. L'attività specifica del doppio mutante, sia in vivo che in vitro, dimostra la presenza di una riduzione dell'affinità per il DNA, supportando l'ipotesi secondo cui alterazioni nella flessibilità o nell'orientamento di questo dominio influenzino profondamente la geometria del sito catalitico, modificando la cinetica del taglio e della riligazione catalizzata dalla Top1p. La struttura cristallografica del complesso ternario, realizzata in presenza dell'analogo della CPT topotecano (TPT), suggerisce la presenza di due classi di mutazioni capaci di indurre resistenza all'azione dell'inibitore.

La prima classe include i cambiamenti nei residui che interagiscono direttamente con il farmaco, mentre la seconda comprende i residui che, se mutati, determinano un'alterazione nelle interazioni stabilite con il DNA e la tasca di legame della CPT.

La mutazione Thr729Ala si trova entro un *cluster idrofobico* situato nel dominio C-terminale e come tale, appartiene ad una terza classe di mutazioni capaci di conferire resistenza alla CPT senza interagire direttamente con il farmaco o il DNA. La mutazione Thr729Ala è stata identificata per la prima volta in linee cellulari tumorali PC-7/CPT resistenti al CPT-11 (irunotecano un analogo della CPT) (Kubota et al., 1992). Tuttavia, i nostri dati rivelano che gli stessi effetti non sono evidenziabili se l'enzima viene espresso nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Se si osserva la struttura proteica il residuo Thr729 è distante dal sito di legame del farmaco per cui non è chiaro come una sua mutazione possa modificare la dinamica dell'interazione tra CPT e complesso binario. La Thr729 si trova nel dominio C-terminale a 12.4 Å dalla tirosina catalitica e 13,1 Å dal residuo Asn722 che stabilisce un legame mediato dall'acqua con la CPT. La mutazione Asn722Ser, che determina un accorciamento della catena laterale, induce una condizione di resistenza (Fertala et al., 2000). Redinbo e coautori hanno ipotizzato che le basi della resistenza alla CPT, causata da mutazioni del residuo 729, siano dovute ad uno spostamento del residuo Asn722 con conseguente soppressione del legame con le CPTs (Chrencik, et al., 2004).

Per confermare questa ipotesi abbiamo analizzato il comportamento di altre tre sostituzioni: Lys, Pro e Glu. Queste sostituzioni sono state scelte per la loro carica positiva o negativa, nel caso della Lys e del Glu, e per la capacità di distorcere l' α -elica nel caso della Pro. I risultati dimostrano che il residuo Thr729 svolge un ruolo chiave nel mantenimento della corretta geometria della tasca idrofobica collocata nella regione C-terminale.

Infatti, la mutazione Thr729Ala produce un'enzima che presenta un'attività in *vivo*, in *vitro* e una sensibilità alla CPT del tutto paragonabili all'enzima WT. Quando la Thr729 è mutata in Lys o Glu si evidenzia una condizione di resistenza alla CPT, che si traduce in una sensibilità alterata nel caso della mutazione Thr729Pro. Inoltre, il mutante Thr729Glu evidenzia forti difetti nell'interazione con il substrato suggerendo che il mantenimento della corretta geometria della regione C-terminale è necessario per preservare le interazioni tra l'enzima ed il DNA durante la progressione del ciclo catalitico.

Gli esperimenti di dinamica molecolare forniscono un'interpretazione strutturale e dinamica del ruolo svolto dalla Thr729 nelle interazioni a lungo raggio presenti tra proteina e DNA (Chillemi et al. 2008).

La catena laterale della Thr729 forma un legame idrogeno con il gruppo idrossilico della Tyr619, stabilizzando i contatti tra dominio C-terminale e la regione del subdominio III.

La struttura più completa della Top1 contiene una porzione dell' N-terminale che va dal residuo Ile 215 alla Gly201. Questi quindici aminoacidi sono impaccati vicino al subdominio I, al dominio C-terminale e alla regione *hinge* ove costituiscono un *cluster idrofobico* conservato in tutte le topo isomerasi IB eucaristiche (Redinbo et al., 2000).

Questa porzione del dominio N-terminale interagisce con l' α -elica del perno ed, in particolare, il Trp 205 è vicino all' Arg434, situata all' inizio dell' elica *hinge*.

All'apice dell'*hinge* è presente un *loop* piegato contenente la Pro431. Per verificare se tale caratteristica strutturale è causata dalla presenza della prolina abbiamo mutato questo residuo in glicina, un aminoacido privo di catena laterale. In questo modo è possibile valutare se il ripiegamento del *loop* è causato dalla prolina e se tale conformazione possiede un significato funzionale. Per chiarire il ruolo delle interazioni presenti tra questa regione e la porzione N-terminale della proteina tutti i mutanti sono stati realizzati nella forma *full lenght* e Topo70. Inoltre il residuo Arg434 è stato mutato in Ala e Cys. La prima sostituzione è stata scelta per la sua capacità di alterare l' intorno chimico sia strutturalmente che elettrostaticamente , la seconda per la capacità di formare un ponte disolfuro nel doppio mutante W205C-R434C, in cui la regione perno è ancorata covalentemente al domini N-terminale. Tutti i mutanti risultano letali quando espressi in lievito, la loro letalità non è dipendente dalla presenza del dominio N-terminale, poiché anche i mutanti Topo70 sono incapaci di formare colonie in condizioni di espressione. Tutte le proteine presentano una riduzione nell' attività specifica, che tuttavia, non è associata ad un calo nell' affinità per il substrato. Nelle cinetiche di rilassamento in eccesso di DNA, i mutanti presentano un comportamento distributivo. Nel caso dei mutanti del residuo 434 questa perdita di attività è associata ad uno spostamento dell' equilibrio di reazione verso il taglio, come confermato dai saggi di taglio. I mutanti Top1P431Gp e Top1P431G70-p presentano difetti nel rilassamento del DNA probabilmente imputabili ad alterazioni nel controllo della rotazione del filamento a valle del sito di

taglio. Nei saggi di taglio per entrambi è presente un basso ma riproducibile accumulo di complessi in assenza dell' inibitore. Per il mutante Top1P431Gp i prodotti della reazione sono localizzati nella parte superiore del gel e corrispondenti a frammenti di DNA più lunghi di 100 coppie di basi. Nel caso del mutante Top1P431G70-p i prodotti di reazioni sono posizionati nella metà inferiore del gel e quindi equivalenti a frammenti di DNA corti. Questi risultati confermano la presenza di interazioni tra dominio N-terminale e regione *hinge*; inoltre suggeriscono che la regione N-terminale controlli la specificità del riconoscimento modulando la qualità e il tipo d'interazione tra enzima e DNA.

Abstract

Eukaryotic DNA topoisomerase I (Top1p) catalyzes changes in DNA topology via the formation of a covalent enzyme-DNA intermediate, which is reversibly stabilized by the anticancer agent camptothecin (CPT). Crystallographic studies of the 70-kDa C terminus of human Top1p bound to duplex DNA describe a monomeric protein clamp circumscribing the DNA helix. The structures, which lack the N-terminal domain, comprise the conserved clamp, an extended linker domain, and the conserved C-terminal active site Tyr domain. CPT bound to the covalent Top1p-DNA complex limits linker flexibility, allowing structural determination of this domain. We previously reported that mutation of Ala653 to Pro in the linker increases the rate of enzyme-catalyzed DNA religation, thereby rendering Top1A653Pp resistant to CPT (Fiorani, et al., 2003;). Molecular dynamics studies suggested mutation-induced increases in linker flexibility alter Top1p catalyzed DNA religation.

However, despite a wealth of biochemical, structural and modeling data on Top1p structure and activity, there is little direct evidence of linker domain flexibility influencing the geometry of the active site. To address this question we asked if the enhanced rate of DNA religation, imparted by the A653P linker mutation, would suppress the DNA religation defect induced by the T718A active site mutation. Indeed, here we describe that the combination of the two mutations (in Top1A653P/T718A), abolished the lethal phenotype of yeast cells expressing the single T718A mutant. The double mutant enzyme was catalytically active *in vitro* and *in vivo*, yet was resistant to CPT. Taken together these data indicate long range communications between the flexible linker domain and the active site of the enzyme. The specific activity of the double mutant was decreased *in vivo* and *in vitro*, consistent with a decrease in DNA binding. These findings support a model where changes in the flexibility or orientation of the linker alter the geometry of the active site and thereby the kinetics of DNA cleavage/religation catalyzed by Top1p.

The X-ray crystal structure of the enzyme covalently joined to DNA and bound to the CPT analog Topotecan suggests that there are two classes of mutations that can produce a CPT-resistant enzyme. The first class includes changes in residues that directly interact with the drug, whereas a second class alters interactions with the

DNA and thereby destabilizes the drug binding site. The Thr729Ala, that is part of a hydrophobic pocket in the enzyme C-terminal domain, belongs to a third group of mutations that confer CPT resistance, but do not interact directly with the drug or the DNA. The Thr729Ala mutation has been firstly identified to impart drug resistance on human topoisomerase I in the CPT-11 (Irinotecan, a CPT analog) resistant human lung cancer cell line, PC-7/CPT (Kubota et al., 1992) but our data reveal that the equivalent effect with CPT can not be observed if the enzyme, harboring the same mutation, is expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Interestingly, looking at the protein structure, Thr729 seems to be too distant to contact the drug directly and it is not clear how the structure or stability of the intercalation drug-binding pocket is affected by the mutation. The Thr729 resides in the hydrophobic core of the C-terminal domain 12.4 Å from the catalytic tyrosine and 13.1 Å from Asn722 that establishes a water-mediated contact directly to the drug. Changing the Asn722 to Ser, shortening the side chain, is sufficient to impart CPT resistance to the protein (Fertala et al., 2000). According to these data, Redinbo and co-authors assumed that the basis of the Thr729 mutants CPT resistance come from the destabilization of the C-terminal region that could lead to the specific shift in position of Asn722, consequentially inducing the breakage of the water-mediated contact with the drug (Chrencik, et al., 2004). In order to confirm these hypotheses, we analyzed the effect of Thr729 substitutions to Lys, Pro and Glu on the in vivo and in vitro catalytic activity and drug sensitivity of the human DNA topoisomerase I. These three substitutions were chosen for their positive or negative charge, Lys and Glu, respectively, and for their capability in distorting the α -helix as in the case of Pro. Our results show that the 729 position is a key point in maintaining the correct geometry of the hydrophobic pocket of the C-terminal domain. In fact, even if the enzyme keeps on its catalytic properties and its sensitivity to CPT in the presence of a Thr729Ala mutation, a dramatic CPT resistance effect could be observed when the Thr729 was mutated to Lys or Glu, and a minor consequence could be seen in the presence of a Pro. Furthermore, the Thr729Glu mutant shows a remarkable defect in the DNA binding indicating that the integrity of the C-terminal geometry is essential for the preservation of the correct interactions between the enzyme and its substrate during the progression of the catalytic cycle. Dynamic simulation experiments propose a structural and dynamical interpretation for the role played by residue 729 in these

long-range protein–DNA communications (Chillemi et al. 2008). The Thr729 is located in the C-terminal domain and its side chain forms a 2.6-Å hydrogen bond with the hydroxyl group of Tyr619. This interaction stabilizes the contacts between the C-terminal and core subdomain III regions of the CAT, that extends from the top half of the molecule downward by a couple of long helices (8 and 9) functioning as an hinge that opens and closes the enzyme around DNA. The most complete structured N-terminal domain of the topoisomerase I protein runs from residue Ile215 to Gly201. These fifteen amino acids pack against part of core subdomain I, the C-terminal domain, and the putative hinge region of the core subdomain to form a hydrophobic cluster. Notably, the cluster is well conserved among eukaryotic type IB topoisomerases (Redinbo et al., 2000). This stretch of N-terminal domain interacts with the α -helix that connects the two lobes of the protein; specifically, the Trp205 is closer to Arg434, located at the top of “connecting” helix. Rising from these observations, the N-terminal domain positioning is thought to play an important role in the upper portion of this helix that is considered as an hinge involved in the opening and clamping crucial movement in the topoisomerase catalytic process; this portion is also protease sensitive only in the absence of the DNA (Stewart et al., 1996). The residue Pro431 is located in the upper portion of hinge region; where is situated a bent loop . The presence of this structure could be caused by this residue. In order to verify the function of proline 431 we realized a Pro431Gly mutant, introducing a residue lacking of side chain. In this way is possible remove the structural constrictions imposed by proline residue. To clarify the role of interactions between N-terminal domain and hinge region we have been realized all mutants in full length and Topo70 versions. To investigate the cluster of interactions between Arg 434 and Trp 205 the residue Arg 434 is mutated in Ala and Cys. These two substitutions were chosen for their capability in modifying the charge and structure of region in the Ala case and for capability in making a covalent bound in the double mutant (W205C-R434C)in the case of Cys. The hinge mutant are lethal when express in yeast system. The lethality is not influenced by presence of N-terminal domain , in fact the topo70-mutants is enable to grow in GAL presence. All mutants present a reduction in specific activity but this defect in catalysis is not associated with reduction in substrate affinity. In time course experiments, performed in presence of DNA excess, the mutants present a more distributive mode of action. In the case of 434 mutants

this loss of activity is associated with shift of cleavage/relegation equilibrium toward cleavage as confirmed also by cleavage assay. The mutants P431G present defect in relaxation caused by alteration in the control of strand rotation. Both with the Top1P431Gp and Top1P431G-70p mutant, a low, but reproducible level of DNA cleavage was observed in the absence of CPT . For the first the products of reaction are located in upper part of gel and corresponding to DNA substrates greater than 100 nucleotides in length. In the case of Top1P431G-70p mutant the products are placed in the lower part of gel and related to short DNA fragments. These results support a presence of interaction between N-terminal domain and hinge region. These results support a presence of interaction between N-terminal domain and hinge region. The N-terminal domain controls the substrate specificity, modulating the type and quality of protein-DNA interaction.

Indice

1 Introduzione.....	13
1.1 La Topologia del DNA	13
1.2 Le Topoisomerasi.....	19
1.2.1 Caratteristiche generali	19
1.2.2 Topoisomerasi II	21
1.2.3 Topoisomerasi IA	21
1.3 Struttura della DNA Topoisomerasi IB umana	23
1.3.1 Studio biochimico e biofisico della proteina	25
1.3.2 Struttura cristallografica.....	27
1.3.3 L'organizzazione del sito attivo e il meccanismo di catalisi	30
1.3.4 Eventi e cinetica di rilassamento:	33
1.4 Topoisomerasi I B e Tirosina Ricombinasi.....	39
1.5 Gli inibitori della Topoisomerasi I umana.....	43
1.5.1 Le Captotecine	43
1.5.2 La struttura risolta dai dati di diffrazione del co-cristallo HtopI-DNA e topotecano	46
1.5.3 Meccanismi di resistenza alla CPT.....	49
1.6 Ruoli cellulari della DNA Topoisomerasi IB umana	53
1.6.1 Riparo dei complessi suicida.....	59
1.6.2 Processamento dei complessi Top1-DNA 3'.....	59
1.6.3 Topoisomerase I-induced recombination repair (TIRR).....	61
1.6.4 Processamento delle estremità 5'.....	64
1.6.5 Regolazione della Topoisomerasi I umana.....	66
1.7 Il lievito come organismo modello per lo studio della DNA Topoisomerasi IB umana	69
2 Materiali e Metodi	71
2.1 Materiali.....	71
2.1.1 Ceppi di <i>S. Cerevisiae</i> usati.....	71
2.1.2 Terreni.....	71
2.1.3 Tamponi.....	72
2.1.4 Farmaci utilizzati	74
2.2 Mutagenesi sito specifica del gene.	75
2.2.1 Trasformazione delle XL10-Gold con prodotto di PCR.....	75
2.2.2 Estrazione e controllo del plasmide.	76
2.3 Trasformazioni di ceppi di lievito con il plasmide YCp.....	77

2.3.1	<i>Plasmidi utilizzati</i>	78
2.3.2	<i>Spot Test</i>	78
2.4	<i>Purificazione della proteina</i>	81
2.4.1	<i>Preparazione della colonna di fosfocellulosa e caricamento del campione</i>	82
2.4.2	<i>SDS PAGE</i>	84
2.4.3	<i>Colorazione con Comassie Brilliant Blue</i>	85
2.4.4	<i>Western Blot</i>	85
2.5	<i>Definizione dell'attività specifica del mutante</i>	87
2.5.1	<i>Saggio di rilassamento</i>	87
2.5.2	<i>Saggi in eccesso di DNA</i>	87
2.5.3	<i>Saggi in eccesso di proteina</i>	88
2.5.4	<i>Saggi in eccesso di proteina digestione con PK</i>	88
2.6	<i>Saggio di taglio</i>	89
2.6.1	<i>Preparazione del substrato lineare</i>	89
2.6.2	<i>Reazione di taglio</i>	91
2.7	<i>Saggio di Riligazione</i>	93
2.7.1	<i>Preparazione substrato</i>	93
2.7.2	<i>Cinetica di Riligazione</i>	94
2.7.3	<i>Suicide Cleavage Assay</i>	95
2.7.4	<i>Religation Assays</i>	96
2.8	<i>Saggio di attività in vivo</i>	97
2.8.1	<i>Trasformazione dei lieviti , estrazione e corsa del DNA</i>	97
2.8.2	<i>Southern blot</i>	98
2.9	<i>Saggio di Binding (filter binding)</i>	101
3	<i>Scopo della tesi</i>	103
4	<i>Risultati</i>	109
4.1	<i>Risultati del doppio mutante htopA653P-T718A</i>	109
4.1.1	<i>Clonaggio del gene htopA653P-T718A</i>	109
4.1.2	<i>Spot test</i>	109
4.1.3	<i>Saggio di attività in vivo –gel 2D</i>	110
4.1.4	<i>Attività specifica</i>	113
4.1.5	<i>Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche</i>	114
4.1.6	<i>Cinetiche di rilassamento</i>	115
4.1.7	<i>Saggio di taglio</i>	116
4.1.8	<i>Saggio di riligazione</i>	118
4.2	<i>Risultati di mutanti T729A,T729E,T729K eT729P</i>	121
4.2.1	<i>Clonaggio dei geni htopT729A, htopT729E, htopT729K, htopT729P</i>	121

4.2.2 Spot test.....	121
4.2.3 Attività specifica.....	122
4.2.4 Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche.....	123
4.2.5 Saggio di taglio	125
4.2.6 Saggio di riligazione	126
4.2.7 Cinetiche di rilassamento	128
4.2.8 Saggio di binding	129
4.3 Risultati di mutanti P431G, P431G -70,R434A, R434-70,R434C e R434C-70.	131
4.3.1 Clonaggio dei geni htopP431G, htopP431G-70,htopR434A, htopR434A-70, htopR434C, htopR434C-70,	131
4.3.2 Spot test.....	131
4.3.3 Attività specifica.....	132
4.3.4 Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche.....	134
4.3.5 Cinetiche di rilassamento in eccesso di DNA.....	137
4.3.6 Cinetiche di rilassamento in eccesso di Proteina	139
4.3.7 Saggio di taglio	143
5 Discussioni	147
6 Bibliografia	157

1 Introduzione

1.1 La Topologia del DNA

Tutti i processi biologici che richiedono lo svolgimento della doppia elica generano una notevole tensione sulla molecola di DNA, stress che deve essere mantenuto entro un certo limite, pena la rottura della stessa. D'altronde un certo grado di tensione topologica è necessario per regolare ed esprimere correttamente alcuni geni.

Ogni molecola di DNA può esistere in un numero diverso di configurazioni topologiche, descrivibili mediante tre parametri: *linking number*, *twist* e *writhe*.

Il numero di legame (Lk) è definito come il numero di volte che un filamento incrocia l'altro quando una molecola circolare di DNA giace su un piano (*fig.1.1.1*). Come tale Lk è un numero intero, il cui valore non può essere modificato sin quando lo scheletro fosfodiesterico non viene aperto per via chimica o enzimatica.

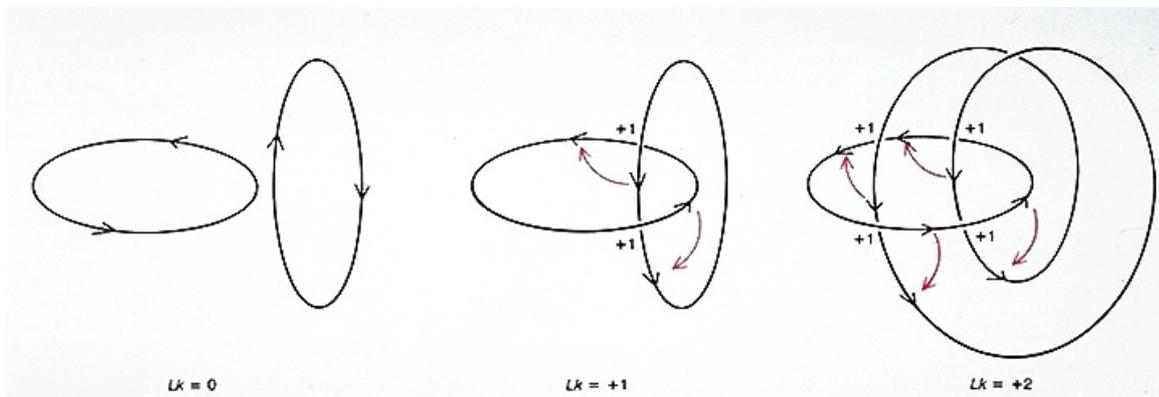


Figura 1.1.1: Definizione del Linking number (Lk)

Una molecola di DNA libera in soluzione presenta un numero di basi per giro pari a 10.5; la stessa ripetizione di elica viene osservata in molecole lineari, le cui estremità siano libere di ruotare, poiché, tale configurazione rappresenta lo stato di energia minimo e quindi il più stabile.

Una molecola di DNA rilassata presenta un numero di legame L_0 definito come:

$$L_0 = \frac{N}{10.5}$$

dove N è il numero di paia di basi presenti nella molecola di DNA e 10.5 il numero di paia di basi per giro. Quindi, una molecola di DNA rilassata, lunga 105 paia di basi, avrà un Lk uguale a 10.

Tuttavia, nella maggior parte dei casi, il DNA non si trova in uno stato rilassato: quindi la descrizione della sua conformazione topologica esige l'introduzione di altri due parametri.

Il primo è il *twist* (T), definito come il numero di giri di elica nella molecola di DNA (fig. 1.1.3), il secondo è il *writhe* (W), che descrive il superavvolgimento dell'elica nello spazio (fig.1.1.2).

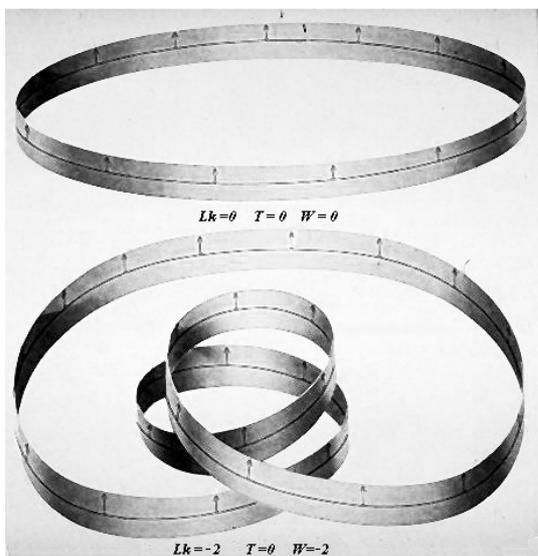


Figura 1.1.2: Definizione di Writhe (W)

Mentre Lk e T dipendono dalla natura del DNA, cioè dalla sua organizzazione come doppia elica, il *writhe* è funzione esclusivamente dell'orientazione che l'asse dell'elica ha nello spazio. Questi tre parametri topologici sono legati tra di loro dall'equazione di *Fuller* (White, 1969):

$$Lk = T + W$$

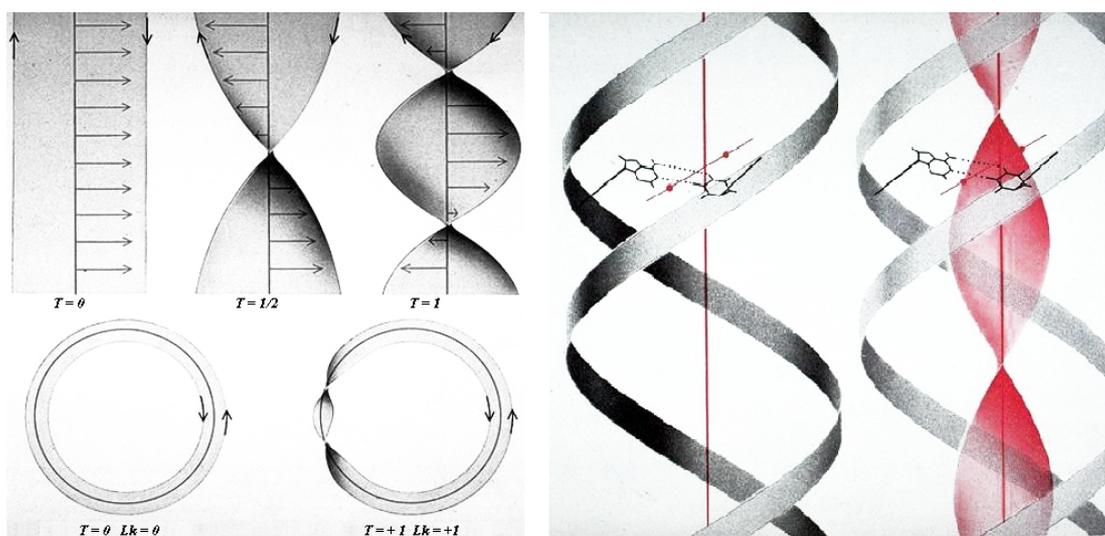


Figura 1.1.3: Definizione di Twist (T)

Il DNA è una molecola estremamente flessibile che può assumere nello spazio un numero di stati pari al numero di combinazioni di T e W. In base al valore di Lk è possibile dividere gli stati topologici di una molecola di DNA in tre categorie:

- $Lk = L_0$ per cui $W = 0$ e $Lk = T$. Questa è la condizione che contraddistingue le molecole di DNA rilassate;
- $Lk > L_0$. In questo caso il DNA è sopravvolto, cioè presenta un numero di paia di basi per giro minore di 10.5, con un conseguente incremento nel numero di giri. Tutto questo genera una tensione torsionale, che, affinché Lk rimanga costante, viene rimossa eliminando parte dei giri di elica;
- $Lk < L_0$. Si tratta di molecole di DNA caratterizzate dalla presenza di un numero di giri di elica minore rispetto a quelli contenuti in plasmidi rilassati. Questo si traduce nella presenza sia di un numero di bp per giro maggiore di 10.5, sia in una diminuzione dell'angolo di twist (rotazione per residuo).

Le molecole di DNA sottoavvolte generano superavvolgimenti negativi, cioè destrorsi, mentre quelle sopravvolte formano superavvolgimenti sinistrorsi. In natura vi sono due forme di superavvolgimento: plectonemica e toroidale (*fig. 1.1.4A*), (Bauer & Vinograd, 1968). Il primo è legato a Lk e definisce il grado di superavvolgimento o sottoavvolgimento di una molecola in soluzione. Tale forma è propria dell'asse di una doppia elica che è avvolto intorno a se stesso. Questo tipo di conformazione si associa al concetto di nodo (incrocio di due eliche).

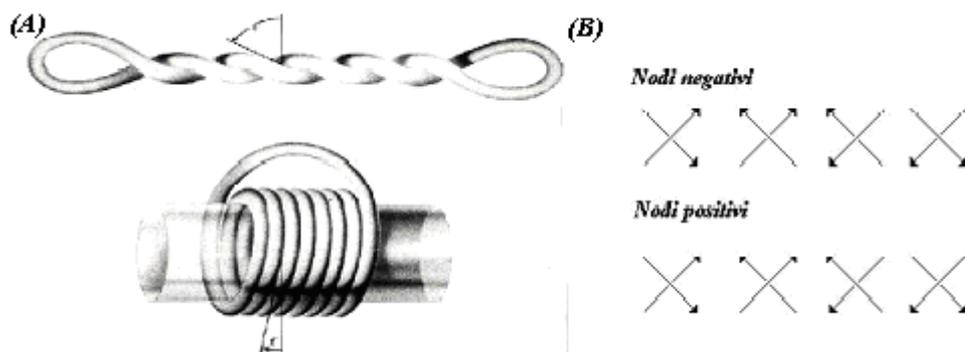


Figura 1.1.4 (A) Avvolgimento plectonemico e toroidale. (B) Schema sul segno dei nodi: nodi negativi i segmenti si sovrappongono mediante rotazione oraria con angolo inferiore a 180° ; nodi positivi i due segmenti si sovrappongono mediante rotazione antioraria con angolo inferiore a 180° .

Un nodo è definito negativo se il segmento superiore si sovrappone esattamente a quello inferiore, ruotando di un angolo minore di 180° in senso orario (*fig. 1.1.4B*) ed è definito positivo se la rotazione che porta alla sovrapposizione è minore di 180° e condotta in senso antiorario (*fig. 1.1.4B*).

Il superavvolgimento toroidale, invece, è caratteristico di una doppia elica che si avvolge intorno ad una struttura proteica come accade al DNA intorno all'ottamero istonico. (Richmond et al., 1984),

Lo stato topologico di una molecola di DNA può essere descritto mediante alcuni indici. Uno di questi è la *densità di superelica*, definita come:

$$\sigma = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Questo indice permette una migliore analisi delle molecole di diversa lunghezza, in quanto dipende solo dallo stato topologico in cui esse si trovano.

Dal punto di vista termodinamico l'energia libera associata al superavvolgimento è proporzionale al quadrato della differenza del linking number:

$$\Delta G = \frac{\left(1100RT/N\right)}{(L - L_0)^2}$$

R = costante dei gas

T = temperatura espressa in gradi Kelvin

N = numero di paia di basi nella molecola di DNA

Il DNA superavvolto, quindi, è associato a un grande valore di energia libera, che può essere usata per guidare molte reazioni biologiche. Infatti, ogni reazione con un'energia libera minore, rispetto a quella del DNA superavvolto, sarà favorita dal punto di vista termodinamico.

Processi biologici, quali la trascrizione e la replicazione, che richiedono un input energetico per aprire e svolgere la doppia elica, ricavano parte dell'energia dal ΔG del superavvolgimento.

Il grado di superavvolgimento di una molecola di DNA è influenzato dalla temperatura e dalla concentrazione salina. La diminuzione della temperatura si associa ad un calo

nell'angolo di twist pari a 0.012° per $^\circ\text{C}$, che risulta in un incremento del sottoavvolgimento. Soluzioni che presentino un' elevata concentrazione di cationi monovalenti (Na^+) o bivalenti (Mg^{2+}), sono caratterizzate da un aumento dei superavvolgimenti negativi. Infatti, gli ioni positivi interagiscono elettrostaticamente con il DNA rendendolo meno compatto e portando ad un aumento nell' angolo di twist (che si associa ad un aumento di L_0).

I Plasmidi e i cromosomi batterici (circolari) sono molecole topologicamente chiuse e quindi hanno un Lk definito, per cui, se si altera il *twist*, si avrà un cambiamento nel *writhe* tale per cui $\Delta T = \Delta W$ (fig.1.1.5).

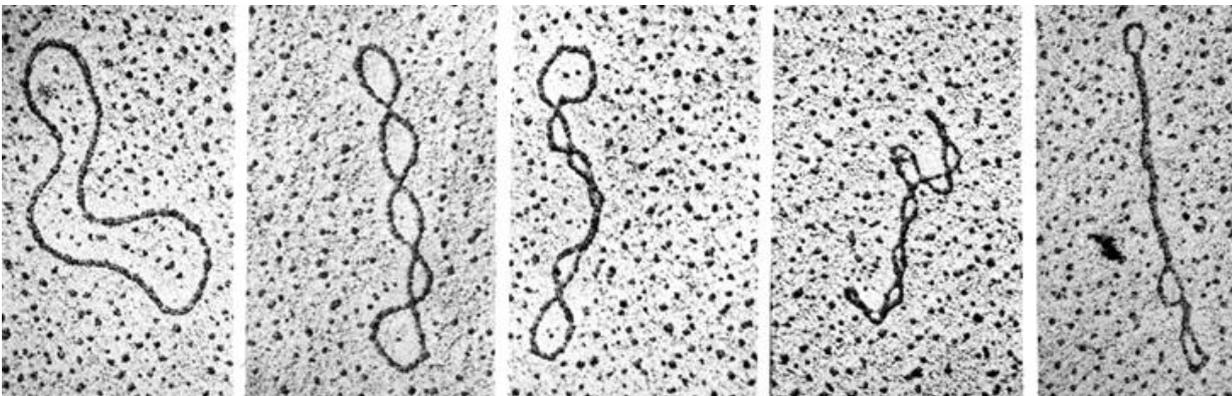


Figura 1.1.5 Immagine al microscopio elettronico di una stessa molecola di DNA con diverso grado di superavvolgimento.

Se introduciamo lo stesso cambiamento in una molecola di DNA lineare le estremità ruoteranno eliminando l' alterazione introdotta. Tuttavia anche il DNA delle cellule eucariotiche, non solo quello batterico, è negativamente superavvolto. Questa apparente contraddizione è risolvibile introducendo il concetto di *dominio topologico*: una regione di DNA in cui la doppia elica non può ruotare. Nel caso dei cromosomi umani tali intervalli sono definiti dall' ancoraggio allo "*scaffold*", entro questi confini, il DNA è superavvolto mediante organizzazione nella struttura nota come cromatina. Nelle cellule eucariotiche, infatti, il DNA è avvolto in modo sinistrorso intorno all'ottamero istonico, formando l'unità strutturale di base della cromatina: il nucleosoma. (Richmond et al., 1984), Sia la topoisomerasi I che II sono in grado di rilassare i sopravvolgimenti.

1.2 Le Topoisomerasi

1.2.1 Caratteristiche generali

Le DNA topoisomerasi sono enzimi ubiquitari in grado di modificare lo stato topologico del DNA grazie alla capacità di aprire e richiudere la doppia elica, generando un cambiamento nel numero di legame (Lk).

La natura stessa del DNA, cioè la sua organizzazione come doppia elica, determina l'esistenza di questi enzimi. Infatti, in molti processi cellulari l'accesso all'informazione genetica è subordinato all'apertura temporanea o permanente dei filamenti, che si riflette nella creazione di stress topologici, la cui rimozione può passare solo per una continua alterazione topologica del DNA.

La capacità di regolare il livello di superavvolgimento localmente e globalmente rappresenta, quindi, un prerequisito per l'inizio e il proseguimento di processi quali trascrizione, replicazione e ricombinazione (Postow et al., 2001).

Nei primi due casi, infatti, sia la fase di inizio che quella di elongazione, richiedono uno svolgimento continuo della doppia elica, che è necessario per consentire l'accesso dell'apparato di trascrizione e replicazione al template.

Indipendentemente dal meccanismo di azione è possibile individuare alcune caratteristiche comuni a tutte le DNA topoisomerasi:

- Capacità di interagire e legare una molecola di DNA.
- Capacità di controllare il taglio e la riligazione dello scheletro fosfodiesterico del DNA ,mediante due reazioni di transesterificazione successive.
- Formazione di un intermedio di reazione covalente durante la fase di taglio.
- Capacità di cambiare il linking number del substrato durante l'esistenza dell'intermedio covalente.

Il coinvolgimento di questi enzimi in molti processi cellulari, unita alla capacità degli stessi di formare almeno un intermedio covalente con il DNA, li ha resi un'interessante target anti-tumorale, infatti, se si blocca l'intermedio di reazione in modo più o meno irreversibile, lo si rende un ostacolo insormontabile per tutti i complessi enzimatici che scorrono sul DNA.

In realtà, la presenza di complessi di taglio "intrappolati" sul genoma, non è esclusivamente legata all'azione di farmaci quali le camptotecine, ma questi sembrerebbero costituire una vera e propria classe di sensori del danno genomico.

Secondo un meccanismo soglia dipendente, la cellula sarebbe in grado di quantificarli attuando diverse risposte, che vanno dal tentativo di riparo (tyrosyl DNA phosphodiesterase/polynucleotide Kinase phosphatase (Tdp1) e TopoisomeraseI induced recombination repair (TIRR)) all' induzione dell' apoptosi (Davies D.R. et al., 2003; Kaufmann S.H. et al.,1998; S e K. et al., 2001).

Sulla base di differenze fondamentali nel meccanismo di reazione,   possibile dividere le topoisomerasi in due subfamiglie. La prima racchiude gli enzimi di tipo I, caratterizzati dalla capacit  di promuovere cambiamenti topologici tagliando un solo filamento della doppia elica (*fig.1.2.1*). Inoltre, all'interno di questa subfamiglia   possibile operare una seconda classificazione, che porta all' identificazione di topoisomerasi di tipo IA (Wang, 1971) e IB (Champoux & Dulbecco, 1972).

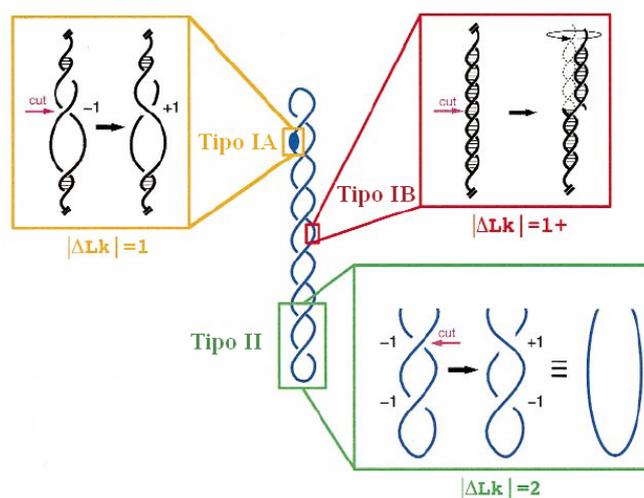


Figura 1.2.1: Diagramma schematico dei diversi meccanismi mediante i quali le topoisomerasi catalizzano cambiamenti nella topologia del DNA. (i) rotazione controllata del filamento a valle del sito di taglio (rosso); (ii) passaggio di un filamento attraverso un'apertura generata nel filamento opposto (arancione); (iii) passaggio di una doppia elica di DNA attraverso un'apertura a doppio filamento (verde).Le linee nere indicano singoli filamenti, mentre le linee blu indicano doppie eliche. Modificato da Keck & Berger, 1999

Le prime formano un intermedio di reazione in cui la proteina   legata al 5' fosfato, mentre, le seconde sono caratterizzate da un complesso di taglio proteina-3' fosfato (Champoux J.J. et al., 2001).

La subfamiglia di tipo II racchiude enzimi che tagliano entrambi i filamenti del DNA in maniera concertata; inoltre, in base a differenze strutturali e meccanicistiche,   possibile distinguere topoisomerasi IIA e IIB (Gellert et al., 1976; Bergerat et al., 1994).

1.2.2 Topoisomerasi II

Le topoisomerasi II sono enzimi dimerici o tetramericici caratterizzati dalla capacità di tagliare entrambi i filamenti del DNA.

A questa classe appartengono le girasi batteriche, la topoisomerasi del fago T4, la topoisomerasi II di lievito, della *Drosophila* e le topoisomerasi II α e II β di mammifero. Questi enzimi, quindi, sono capaci di promuovere la catenazione e decatenazione di anelli a doppia elica, oltre che rilassare superavvolgimenti positivi e negativi.

Durante la fase di taglio si formano due legami 5'-fosfotirosinici tra i monomeri e il DNA, che distano quattro paia di basi e mappano su filamenti opposti. La completa apertura della doppia elica è necessaria per consentire il passaggio ATP-dipendente dell'elica integra attraverso il gap generato dall'enzima.

Il meccanismo catalitico (Wang J.C. et al, 2002; Wang J.C. et al., 1996), quindi, prevede il passaggio di una doppia elica intatta (definita segmento T) attraverso due cancelli G e K, il primo dei quali è costituito da una molecola di DNA legata covalentemente all'enzima (fig. 1.2.2).

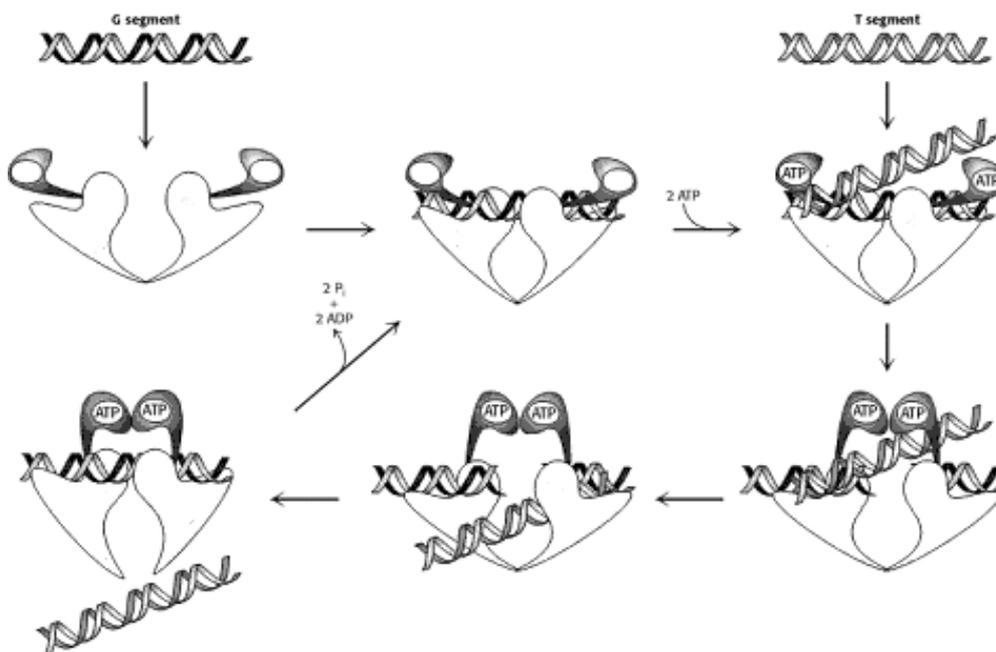


Figura 1.2.2: Meccanismo di topoisomerizzazione promossa dalle topoisomerasi II.

1.2.3 Topoisomerasi IA

Le DNA topoisomerasi IA sono enzimi prevalentemente monomerici ad esclusione della girasi inversa del *Methanopyrus kandleri*, caratterizzati dalla capacità di

tagliare uno solo dei due filamenti, determinando la formazione di un intermedio covalente proteina-DNA, mediante un legame fosfodiesterico tra il 5' e la Tyr del sito attivo. Inoltre, per portare a compimento il rilassamento è richiesta la presenza di Mg^{2+} come cofattore (Wang J.C. et al, 2002C; Champoux J.J.2001).

Questi enzimi sono in grado di rilassare solo superavvolgimenti negativi e decatenare molecole di DNA a singolo e a doppio filamento, ma quest'ultime solo nel caso in cui presentino *nick* o *gap*.

Come è facilmente intuibile, in base al meccanismo di reazione, tali enzimi sono in grado di cambiare il *linking number* del substrato di +/-1 ($\Delta Lk = 1$) (fig.1.2.3).

Tra i membri di questa classe ricordiamo la TopoIA di *E.coli*, (Wang, 1971) la topoIII di *E.coli*, attiva soprattutto nella decatenazione di molecole di DNA a singolo filamento, la girasi inversa di *Methanopyrus kandleri*, che è in grado di introdurre superavvolgimenti positivi, mediante un meccanismo ATP-dipendente (Gellert et al., 1976). A questa classe appartengono, anche, le topoisomerasi III eucariotiche (isoforme umane α e β), che sembrano coinvolte nel mantenimento della stabilità genomica grazie alla loro interazione con membri della famiglia delle elicasi RecQ (WRN e BLM).

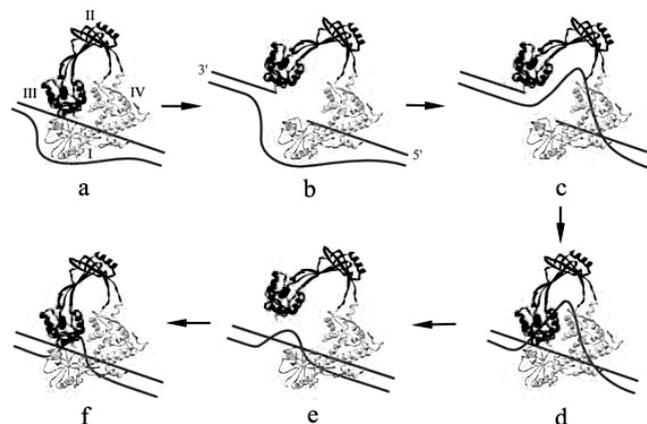


Figura 1.2.3.:Meccanismo di topoisomerizzazione delle topoisomerasi IA. Uno solo dei filamenti della doppia elica è legato e tagliato dal dominio III .Dopo il passaggio di un secondo frammento di DNA attraverso l' apertura il dominio III si riassocia con il dominio I e IV e catalizza la ricucitura del filamento di DNA tagliato. (Keck & Berger 1999)

1.3 Struttura della DNA Topoisomerasi IB umana

La DNA Topoisomerasi IB umana è un enzima monomero in grado di alterare lo stato topologico del DNA grazie alla capacità di rilassare sia superavvolgimenti negativi che positivi (Wang, 1996).

Studi biochimici e biofisici hanno consentito di dividere questa proteina in quattro domini principali: (Champoux et al., 2001; Lyn et al., 1989) un dominio N-terminale (M1-K197 di 24 KDa) poco conservato e scarsamente strutturato, un dominio core (E198-I651 di 54 KDa) estremamente conservato, un breve dominio linker (D652-E696 di 5KDa) poco conservato ed, infine, un dominio C-terminale (Q697-F765 di 8 KDa) molto conservato e contenente la Tyr catalitica (fig. 1.3.1).

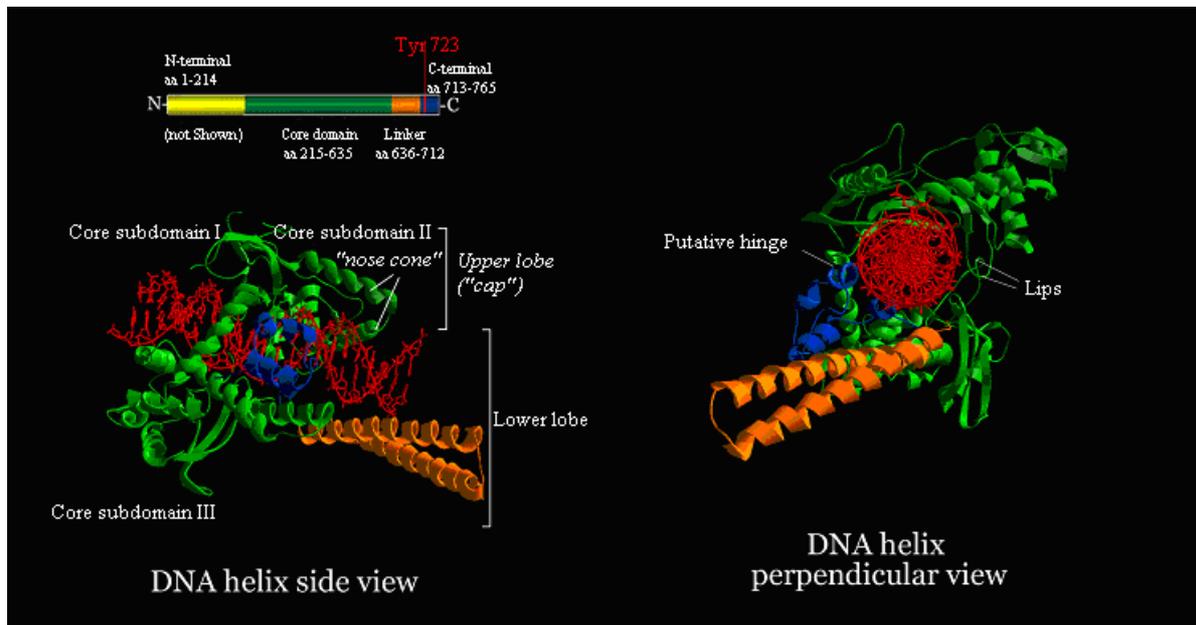


Figura 1.3.1: Struttura della DNA Topoisomerasi I umana e sua divisione nei quattro domini strutturali. In giallo il dominio N-terminale, in verde il dominio core, in arancio il dominio linker e in blu il dominio C-terminale.

La stessa organizzazione strutturale è stata determinata mediante allineamento tra le sequenze di diverse topoisomerasi appartenenti alla stessa famiglia quali *Homo sapiens* (Borovitskaya & D'Arpa, 1998), *Mus musculus* (Koiwai et al., 1993), *Daucus carota* (Balestrazzi et al., 1996), *Xenopus laevis* (Pandit et al., 1996), *Drosophila melanogaster* (Hsieh et al., 1992; Lee & Hsieh, 1992), *Plasmodium falciparum* (Tosh & Kilbey, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (Thrash et al., 1985) e *Vaccinia virus* (Shuman & Moss, 1987).

La regione N-terminale delle topoisomerasi IB, appartenenti al virus SV 40, *S. cerevisiae* e *S. pombe*, contiene un *cluster* di 50 amminoacidi estremamente conservato (141-190 nella proteina umana), caratterizzato dalla ripetizione KKXKED (X equivale ad un residuo non conservato), (Kalderon et al., 1984). Questa sequenza indica la presenza di un segnale di localizzazione nucleare (NLS), definibile come una sequenza presente in proteine a destinazione nucleare e, come tale, in grado di promuoverne il trasporto selettivo dal citosol al nucleo (Mo et al., 2000; Ireton et al., 2000; Alsner et al. 1992).

Molto più controversa è l'attività chinastica della Top1, infatti, studi condotti su estratti cellulari hanno evidenziato la presenza di fosforilazione su membri della famiglia SR (Durban et al., 1985; Samuels & Shimizu, 1992). Queste proteine, per la maggior parte fattori di splicing, sono caratterizzate dalla presenza di un dominio RRM (ricognizione dell'RNA) e uno RS (arginina-serina) fondamentali per la loro attività (Gobert et al., 1996).

La Top1 lega SF2/ASF attraverso il proprio dominio N-terminale (entro i primi 174 aa). Forme troncate dell'enzima (Topo70), perdono la capacità di interagire con il fattore di splicing, ma mantengono quella di legare ATP.

La Top1 manca di un sito canonico per il legame dell'ATP, tuttavia, la presenza di una costante di dissociazione per questa reazione, pari a 50 nM, è indicativa dell'esistenza di un sito di legame per questo nucleotide trifosfato, che è situato nella regione C-terminale (Labourier et al., 1998; Rossi et al., 1996).

Il sito di fosforilazione è costituito da una serina localizzata entro uno dei motivi RS. Un dato particolarmente interessante è rappresentato dalla richiesta di motivi arginina-serina multipli, che, probabilmente, contribuirebbero alla formazione di una struttura estremamente versatile necessaria per il processo di fosforilazione ad opera della Top1.

Il meccanismo di regolazione dell'attività di splicing svolta dalla Top1 è ancora poco conosciuto. Sia PARP che i fattori di splicing ASF/SF2 sono in grado di legare la Top1 inibendone l'attività di rilassamento (Ferro & Olivera, 1984; Kasid et al., 1989). Il modello proposto ipotizza un ruolo centrale della proteina PARP, che grazie alla capacità di legare sia ASF/SF2 che Top1, sarebbe in grado di modulare l'interazione della Top1 con ASF/SF2 o il DNA (Malanga et al., 2008).

1.3.1 Studio biochimico e biofisico della proteina

Il dominio N-terminale della Top1 è poco strutturato e come tale, notevolmente sensibile alla digestione con tripsina e subtilisina (Stewart et al., 1996; Stewart et al., 1998). La scarsa strutturazione di questa regione è confermata anche da esperimenti di gel filtrazione e sedimentazione in gradiente di glicerolo. La Top1 ha in SDS-PAGE un peso apparente di 100 KDa , cioè di circa 9 KDa maggiore rispetto a quello reale (91 KDa); la stessa analisi condotta su Topo70 dimostra, invece, la presenza di un peso apparente equivalente a quello reale (70 KDa), (Alsner et al., 1992).

Il dominio N-terminale della Top1 è ricco di amminoacidi carichi positivamente ($H+K+R = 68\%$), solo il 27% di questa regione è costituita da residui anionici. Tuttavia, mentre i primi saranno schermati dal legame dell'SDS, questi ultimi sbilanceranno il rapporto carica/massa, determinando un ritardo nella migrazione elettroforetica e, di conseguenza, la presenza di un peso molecolare apparente maggiore di quello reale.

Ulteriore riprova della disorganizzazione di questa regione, è fornita dalla sensibilità della stessa alla digestione proteolitica e dal fatto che non è stato ancora possibile ottenere un cristallo dell' enzima intero.

Tuttavia la regione N-terminale sembra interagire con numerose proteine nucleari tra cui p53 (Gobert et al., 1996; Stewart et al., 1996; Stewart et al., 1996), proteine leganti le regioni TATA e fattori leganti il TATA-box associati a TFIID (Kretzschmar et al., 1993; Merino et al., 1993; Shykind et al., 1997), large T-antigen di SV40 (Haluska et al., 1998; Pommier et al., 1998; Simmons et al., 1996) e nucleolina (Bharti et al., 1996). Inoltre è ipotizzabile un suo ruolo anche nel reclutamento di proteine specifiche presso i complessi di replicazione e trascrizione entro il nucleo.

Gli studi di proteolisi limitata con tripsina e subtilisina hanno fornito anche informazioni su un' altra regione dell' enzima poco conservata e scarsamente strutturata : il dominio linker.

Questa regione, al contrario dell'N-terminale, ha un pattern di proteolisi che cambia drasticamente in dipendenza della presenza o meno di un DNA a doppio filamento (sia plasmidico che lineare).

Il taglio proteolitico del frammento di 73 KDa in uno di 60 KDa (privato del dominio C-terminale) diminuisce di un fattore pari a 10 se è presente un ds DNA in soluzione.

Questi risultati sono interpretabili secondo due modelli: nel primo caso il legame del DNA ad una regione proteica blocca l'accesso della proteasi spiegando la resistenza al taglio.

Il secondo modello prevede che il legame del DNA ad una regione causi uno *shift conformazionale* rendendo un'altra parte della proteina più o meno sensibile alle proteasi. Il dominio linker nell'enzima libero o nel complesso di taglio si trova in uno stato *aperto*, in cui è sensibile all'azione della tripsina e subtilisina. Quando l'enzima è legato non covalentemente a un DNA a doppio filamento la regione linker è in una conformazione *chiusa*, cioè resistente alle proteasi.

Studi di mutagenesi hanno fornito indicazioni sul ruolo di questa regione. Il mutante A653P presenta uno spostamento nell'equilibrio di reazione verso la ricucitura causato da un incremento nella motilità del dominio linker.

L'introduzione della prolina determina l'interruzione di una struttura α -elicoidale, che è contenuta in una sovrastruttura a spirale ritorta, imponendo una riorganizzazione dell'intera regione. La Top1 perde così un dominio che funge da freno nella reazione di topoisomerizzazione, determinando una minimizzazione nel tempo di esistenza dell'intermedio covalente proteina-DNA. Diminuiscono così le possibilità di formazione di un complesso ternario da parte della camptotecina (CPT), che interviene dopo la reazione di taglio. Per questo motivo il mutante A653P dimostra di essere resistente alla CPT (*fig.1.3.1.1*), (Fiorani et al., 2003).

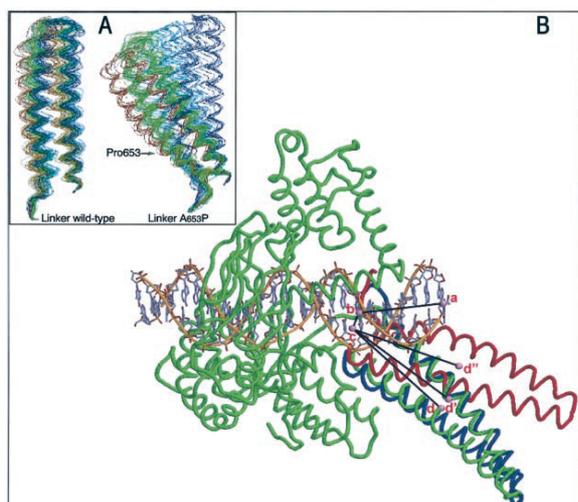


Figure 1.3.1.1 Conformazioni di Dinamica Molecolare (MD) visitate durante la simulazione.

Panello A, Superposizione di 100 strutture di MD raccolte ad intervalli di 10-ps durante la dinamica del dominio linker dell'enzima WT e del mutante A653P.

Panello B, Strutture iniziali e finali superimposte alla struttura cristallografica del complesso Top1-DNA (PDB entry 1A36). La struttura iniziale del Wt e del mutante A653P è rappresentata in verde. La struttura finale del WT in blu e quella del mutante A653P in rosso. Sono evidenziati anche gli angoli diedri di partenza per WT e A653P $abcd(52$ gradi), gli angoli diedri finali del WT $abcd(45$ gradi) e quelli finali del mutante A653P $abcd(26$ gradi)

(Fiorani et al., 2003).

Risultati analoghi sono stati ottenuti da studi di catalisi enzimatica su un'enzima ricostruito (due diversi frammenti proteici mancanti del linker), (Stewart et al.,1997), e uno deleteo della sequenza D660-K688 (il dominio linker nella sua quasi interezza), (Ireton et al., 2000). In entrambi i casi la catalisi enzimatica è sensibilmente spostata verso la reazione di riligazione, e nel caso della delezione del linker è stata riscontrata resistenza alla CPT.

1.3.2 Struttura cristallografica

Esistono quattro strutture cristallografiche della DNA Topoisomerasi IB umana: tre di queste sono co-cristalli con un frammento di 22 bp di DNA, in due l'interazione è non covalente (1A36 e 1EJ9), mentre nella terza (1A31) l'interazione è covalente (Redinbo et al.,2000; Redinbo et al., 1998; Staker et al., 2005; Staker et al., 2002; Stewart et al., 1998). La quarta struttura depositata (1K4T) rappresenta il complesso ternario costituita da proteina, DNA ad essa covalentemente legato, e l' analogo della CPT topotecano(Stacker et al., 2005). In tutte le strutture depositate l' enzima è primo del dominio N-terminale (a partire dal residuo 215, 203 e 174). Il frammento di DNA scelto per la co-cristallizzazione è noto come sequenza di *Westergaard*.

Le strutture della Top1 in complesso non covalente con il DNA sono state ottenute mediante ricostituzione dell'enzima, assemblando attorno al frammento di acido desossiribonucleico i domini core (299-635) e C-terminale (713-765). Il dominio linker (636-712), in questo caso, è stato eliminato perché troppo mobile per essere cristallizzato e non indispensabile per il mantenimento dell'attività catalitica.

Nel caso dell'enzima covalentemente legato al suo substrato è stato invece possibile cristallizzare la proteina comprensiva del dominio linker. Il frammento di doppia elica è stato modificato chimicamente sostituendo un legame fosfoestereo con uno fosfotioestereo (fosforotiolato) in posizione -1, assicurando la formazione di un legame covalente. Questo espediente consente di congelare l'intermedio covalente enzima-DNA dal momento che il gruppo sulfidrilico uscente è di per sé un nucleofilo troppo debole per restaurare l'integrità del frammento di DNA.

La risoluzione della struttura cristallografica della Top1 ha permesso di confermare i dati già ottenuti sulle caratteristiche strutturali del dominio linker e di indagare con

maggior dettaglio le caratteristiche del dominio core e le sue interazioni con quello C-terminale, contenente i residui cruciali del sito attivo.

La struttura più completa della Top1 presenta una piccola porzione del dominio N-terminale che va dalla Gly201 all' Ile 214 (Stewart et al., 1998).

Questi 15 residui si trovano in prossimità del sottodominio I, dell' α -elica *hinge* e della regione C-terminale.

I residui Trp 441, Trp754, Trp 706 e Trp 705 formano un *cluster idrofobico* conservato in tutte le topoisomerasi IB eucariotiche (Redinbo et al., 2000; Frohlich et al., 2007) (fig.1.3.2.1). Questa porzione del dominio N-terminale interagisce con l' α -elica dell'*hinge* ed in particolare il Trp 205 si trova vicino all'Arg 434, collocata al centro della regione perno. Il dominio N-terminale se deletato (Topo70) determina un calo nell'affinità per il substrato e nell'attività di rilassamento. La proteina priva dei primi 206 aminoacidi risulta resistente all'azione della CPT. (Frohlich et al.,2007; Frohlich et al., 2001; Lisby et al., 2001). Questi dati suggeriscono un ruolo del dominio N-terminale nel controllo della rotazione del filamento a valle del sito di taglio.

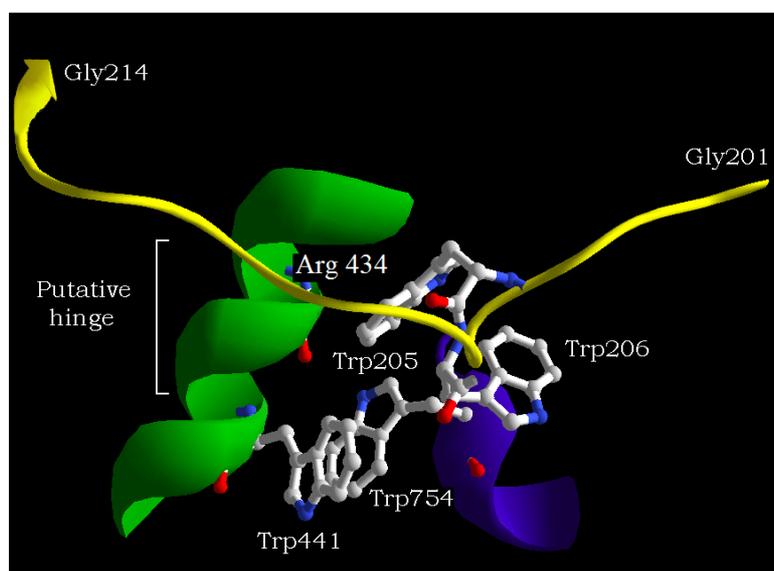


Figure 1.3.2.1. Interazioni tra domini nella Top1 I residui Trp conservati potrebbero essere coinvolti in movimenti coordinate che riguardano il dominio N-terminale (giallo), il dominio core (verde) ed il dominio C-terminale (blu).L' Arg 434 può essere coinvolta nell'apertura e chiusura dell'enzima come risultato delle interazioni con il cluster di triptofani

Il dominio core può essere ulteriormente suddiviso in 3 sottodomini. Il sottodominio I (215-232 e 320-433) si ritrova strettamente ripiegato sul sottodominio II (233-319) ed assieme formano il lobo superiore della proteina definito CAP (Madden et al., 1995). Questi sottodomini sono uniti da due eliche: $\alpha 5$ e $\alpha 6$, rispettivamente appartenenti al sottodominio I e II, che protrudono dal CAP organizzandosi a forma di V, in una struttura denominata "nose cone". Il sottodominio III, insieme al dominio C-terminale,

forma il lobo inferiore della proteina, e contiene quattro residui del sito attivo della proteina: R 488, R 590, H 632 e K532.

I due lobi della proteina sono uniti da una lunga α -elica, definita *hinge*, contenente all'estremità superiore il perno ipotetico della proteina (Pro 431). Sul lato opposto di questa elica sono situati due loops che interagiscono mediante sei amminoacidi e un ponte salino (K369--E497) unendo i due bracci proteici (Champoux, 2001; Redinbo et al., 1998).

L'apertura e la chiusura della *clamp* proteica, durante il legame e il rilascio del DNA, passa per l'allontanamento del lobo superiore da quello inferiore e determina la rottura e la riformazione delle interazioni tra le *lips*. Il cardine di questo movimento sembra essere collocato all'apice del *hinge* in corrispondenza del residuo P431 (dove i sottodomini I e III del core vengono a contatto) e in prossimità del residuo K452, che collega le eliche 8 e 9. Un simile modello è supportato dai dati di proteolisi limitata, che evidenziano una spiccata sensibilità per il taglio proteolitico all'altezza dello snodo tra elica 8 e 9 in assenza di DNA (Alsner J. et al., 1992).

Il dominio C terminale contiene la Tyr723, il "coltello" tirosinico, che permette la reazione di taglio su un singolo filamento del DNA. Eng et al., 1989; Lynn et al., 1989; Lynn & Wang, 1989). Questo dominio coopera strettamente con il sottodominio III mediante interazioni che coinvolgono le eliche 8, 16 e 17 (per lo più mediante interazioni idrofobiche). Inoltre il dominio C-terminale contribuisce alla costituzione del poro centrale, caratterizzato da un alto potenziale elettrostatico positivo (15 K e 8 R).

La struttura cristallografica dimostra che la proteina interagisce con 10 paia di basi del substrato co-cristallizzato (dalla posizione -4 alla +6). (Stevnsner et al., 1989) Si possono contare 30 contatti nel modello con interazione non covalente, e 27 nel complesso covalente. Per lo più si tratta di interazioni che coinvolgono i gruppi fosfato, mentre alcuni residui del sito attivo interagiscono con il solco minore del substrato. L'unico contatto specifico tra proteina e DNA riguarda l'ammina ϵ della K 532 e l'O carbonilico in 2 della timidina -1. È stato dimostrato (Interthal H. et al., 2003) che la mutazione di questa lisina, sorprendentemente, non varia la specificità di sequenza.

Il dominio linker è caratterizzato da un alto grado di non-isomorfismo, probabilmente dovuto al fatto che è permesso un movimento di scivolamento tra le superfici idrofobiche dell'elica 17 del core (P613-L617 e la porzione alifatica di R624) e quella 19

del linker (residui V703, I714 e L 716). L'asse attorno a cui si avvolge la struttura *coiled coil* del linker diverge da quello del DNA di 30°, per cui la porzione distale del linker è posta a 35 Å dal più vicino gruppo fosfato.

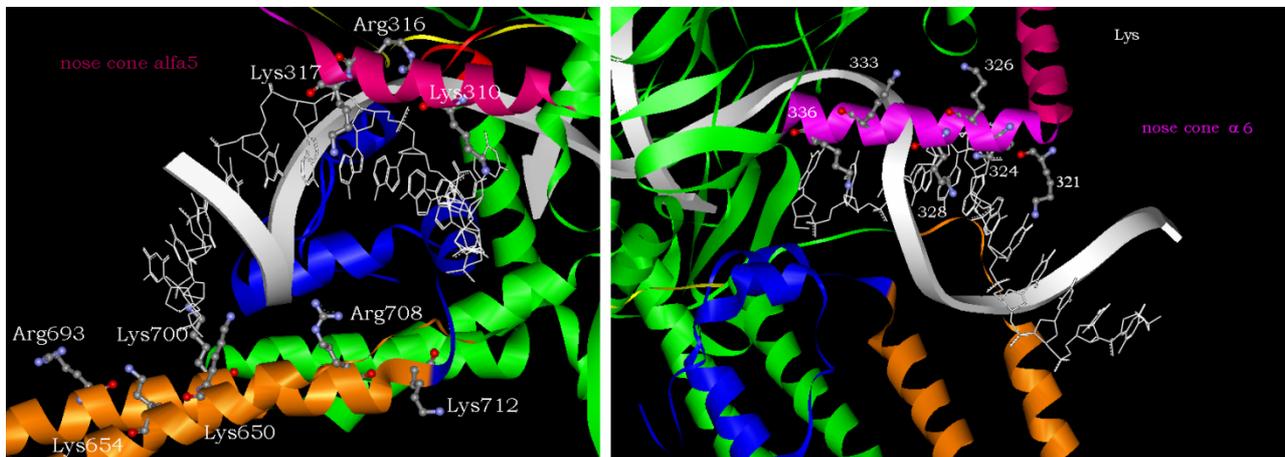


Fig 1.3.2.2. Interazione tra “nose cone”, dominio linker e DNA. Le immagini mostrano i residui carichi positivamente rivolti verso il DNA a valle del sito di taglio. Sono evidenziate due superfici cariche positivamente, rivolte verso il substrato. Le α -eliche del “nose cone” (in viola e fucsia) e quelle del dominio linker (arancione) potrebbero essere coinvolte nel controllo della rotazione del filamento.

Soltanto due delle nove cariche positive, che caratterizzano i gruppi laterali del dominio linker, sono impegnate in ponti salini con fosfati del DNA (K650 e R708).

La struttura *nose cone*, individuata dalle eliche 5 e 6 (303-338), è caratterizzata dalla presenza di sei residui amminoacidici carichi positivamente, tra questi solo R316 è impegnata in un contatto con un gruppo fosfato.

In definitiva, la Top1 contiene due superfici, spiccatamente positive nel bilancio di carica, che sono rivolte al DNA, anche se non impegnate in legami con i fosfati. E' possibile che queste vadano a ricoprire un ruolo importante nel meccanismo catalitico della topoisomerizzazione.

1.3.3 L'organizzazione del sito attivo e il meccanismo di catalisi

La reazione di topoisomerizzazione si compone di due transesterificazioni consecutive: la prima (taglio) produce un intermedio di reazione caratterizzato da un legame covalente tra DNA e proteina, mentre la seconda (riligazione) ripristina l'integrità della doppia elica ed è consecutiva alla sua riorganizzazione topologica. A differenza di altre topoisomerasi, la IB non ha bisogno di ATP per funzionare. In seguito al taglio,

l'enzima infatti è in grado di sfruttare l'energia immagazzinata nel substrato, sotto forma di superavvolgimento, per far avvenire la reazione di ricucitura.

Un attacco nucleofilo dell'ossigeno fenolico in 4 della Tyr723 sul fosfato scissile taglia uno dei due filamenti del duplex, generando un legame fosfodiesterico tra la Tyr e il 3' fosfato e liberando un ossidrile in 5' (Eng et al., 1989; Lynn et al., 1989; Shuman, 1989). Tre fra le strutture cristallografiche disponibili per Top1 fotografano la proteina co-cristallizzata con una molecola di DNA in stadi distinti della reazione di taglio. La prima (PDB entry: 1A36) contiene una timina nella posizione -1 sul DNA (nucleotide a monte del fosfato scissile). (Been & Champoux, 1984; Bonven et al., 1985; Tanizawa et al., 1993; Tanizawa et al., 1993) La seconda (PDB entry: 1EJ9) contiene invece una citosina nella stessa posizione. A differenziare maggiormente le due strutture è l'orientazione del fosfato scissile, ruotato di 75° e impegnato in diverse interazioni deboli con i residui del sito attivo. La terza struttura di riferimento (1A31) fotografa l'enzima covalentemente legato ad uno dei due filamenti del DNA. (Champoux J.J. et al., 2001)

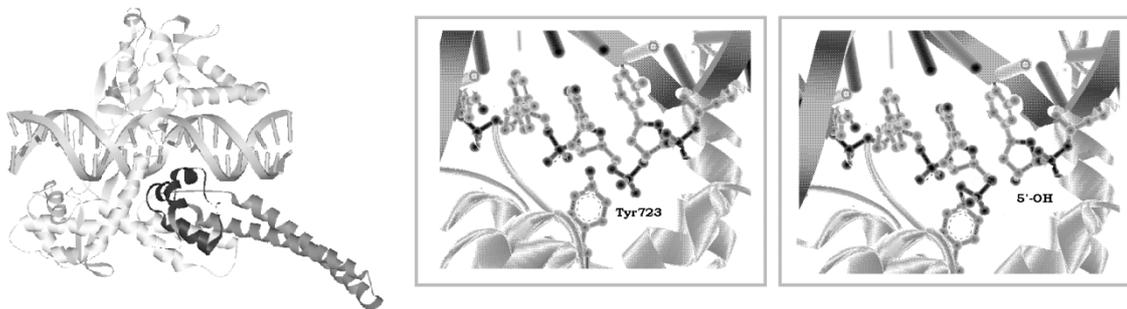


Fig 1.3.3.1 Ciclo catalitico della DNA Topoisomerasi IB umana Il taglio del filamento scissile ha luogo mediante attacco nucleofilo condotto dall' O4 della Tyr 723 nei confronti del fosfato dello scheletro fosfodiesterico.

Nel cristallo 1A36, Arg488 e Arg590 sono coinvolte in legami a idrogeno con uno degli ossigeni non impegnati nel legame fosfodiesterico del fosfato scissile, mentre l'altro ossigeno libero del gruppo fosfato si trova impegnato in un legame ad idrogeno con H632 (Stewart L. et al., 1998).

In 1EJ9 il donatore di legame ad idrogeno Arg590 viene sostituito da Lys532 (Redinbo M.R. et al.,1998), (fig.1.3.3.2 e fig.1.3.3.3). Solo in quest'ultimo caso Tyr723 è allineata perfettamente per l'attacco nucleofilo, mentre la triade di amminoacidi basici è posizionata in modo da stabilizzare lo stato di transizione pentavalente attraverso interazione con ossigeni non fosfodiesterici del fosfato scissile. E' stato ipotizzato che la

Tyr723 possa essere attivata dalla prossimità di una base (Champoux J.J. et al., 2001). Questo ruolo potrebbe essere giocato da una molecola d'acqua, (Chillemi et al., 2001) impegnata a collegare, attraverso ponte a idrogeno, Arg590 con l'ossigeno in 4 del gruppo fenolico della Tyr723 (*fig.1.3.3.2 e fig.1.3.3.3*).

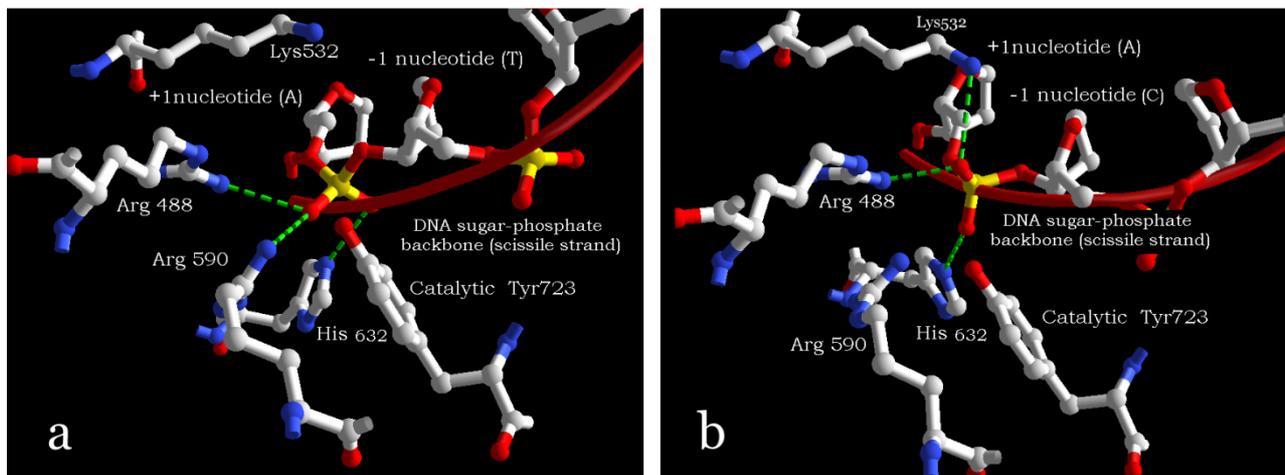


Fig 1.3.3.2 Geometria del sito catalitico della DNA Topoisomerasi IB umana (PDB entry 1A36) a: complesso non covalente(PDB entry 1A36) con una timida in posizione -1 (struttura -1T) **b:** complesso non covalente (PDB entry 1EJ9) con una citosina in posizione -1 (struttura -1C) .Si può notare la rotazione del fosfato scissile di circa 75° relativamente alla posizione cella citosina in -1 .Sia in **a** che in **b** è visualizzato solo lo scheletro fosfato del filamento scissile di DNA. I legami idrogeno sono rappresentati come linee grigie discontinue . Modificazioni effettuate con Deepview/Swiss- PdbViewer v. 3.7. e Adobe Photoshop v. 5.5.

Lys532 è anche impegnata in un legame con l'ossigeno in 2 della citosina in posizione -1, il che gli conferirebbe un ruolo importante nella stabilizzazione dello stato di transizione (Champoux, 2001; Interthal et al., 2004).

Questo è provato dal fatto che diverse mutazioni imposte in posizione 532 intervengono sensibilmente nell'equilibrio tra reazione di taglio e di ricucitura del substrato: K532A presenta infatti un equilibrio della reazione sensibilmente spostato verso il taglio, mentre il contrario vale per K532R.(Interthal H. et al 2003)

La Lys532 potrebbe inoltre avere la funzione di acido, andando a protonare l'ossigeno al 5', in uscita dal fosfato scissile, durante la reazione di taglio.

Questa ipotesi è supportata dalla distanza tra i due gruppi (4 Å). La reazione di ricucitura potrebbe seguire un meccanismo opposto a quello del taglio (Krogstad & Champoux, 1990). La prossimità della maggior parte degli stessi amminoacidi al fosfato scissile ,nella struttura del complesso covalente rispetto a quella del complesso non covalente è compatibile con questa ipotesi.

Qualche differenza nel meccanismo ,che ripristina l'integrità del DNA, viene comunque suggerita dal fatto che l'immediato intorno (riferito alla sequenza primaria)

del residuo His632 è sensibilmente disorganizzato nella struttura del complesso covalente, rispetto a quello non covalente. Ad ogni modo, vi sono evidenze che anche

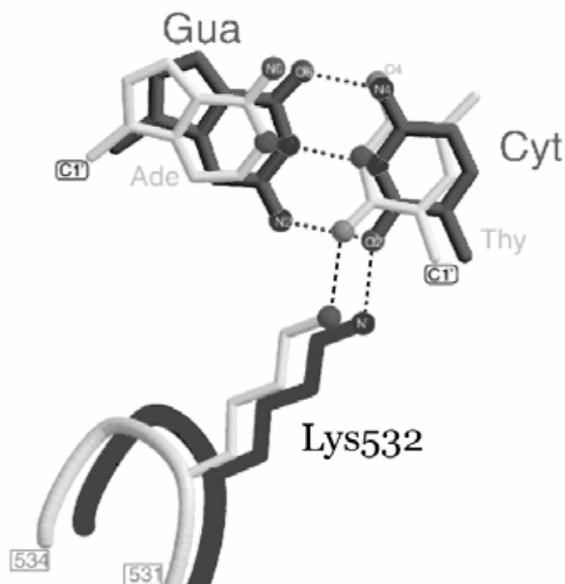


Fig 1.3.3.3. Posizione della Lys 532 nella struttura -1T e -1C. La struttura -1C (in nero) e quella -1T (in grigio) sono sovrapposte usando posizioni equivalenti per i Ca. Gli atomi in C1' legano la base all'anello desossiribosidico dello scheletro del DNA. I legami idrogeno sono indicati come linee discontinue. Adattato da 13

altri nucleofili come H_2O , H_2O_2 e alcuni alcoli possono essere in grado di partecipare alla reazione di taglio. (Lysby M. et al., 1998). Questo a riprova del fatto che l'organizzazione spaziale delle catene laterali dei residui del sito attivo, attorno al fosfato scissile, è critica nella reazione di catalisi, ma viene comunque lasciata una certa flessibilità rispetto alla natura dei nucleofili. I dati citati avvalorano l'ipotesi che un importante ruolo della Top1 sia quello di svolgere una attività di trasferimento di filamenti (*strand-transfer*), cruciale nei processi di ricombinazione.

1.3.4 Eventi e cinetica di rilassamento:

Il rilassamento del substrato presuppone :

- L' esistenza di un' interazione tra enzima e substrato ,che può aver luogo solo se esiste una conformazione aperta della topoisomerasi in grado di far entrare il DNA.
- Il legame del DNA all' enzima è garantito dalla presenza di una complementarità di carica tra DNA e sito attivo. All' entrata del substrato segue la chiusura della tenaglia mediante il ponte salino tra le lips
- Prima transesterificazione con formazione dell' intermedio covalente a cui segue la seconda transesterificazione che ripristina la continuità del DNA.
- Rilascio della molecola di DNA, il cui Lk è alterato di una o più unità.

Gli studi strutturali e funzionali hanno consentito di elaborare due modelli volti a spiegare il meccanismo di rilassamento catalizzato dalla Top1 (*fig.1.3.4.1*), (Vosberg, 1985).

Secondo la prima ipotesi, nota come “*strand passage*”, l’ enzima, dopo aver legato e tagliato il DNA, agirebbe da ponte consentendo il passaggio del filamento integro (singolo o doppio). Questo meccanismo ,che è comune alle topoisomerasi IA e II, non sembra poter essere accettabile nel caso delle IB.

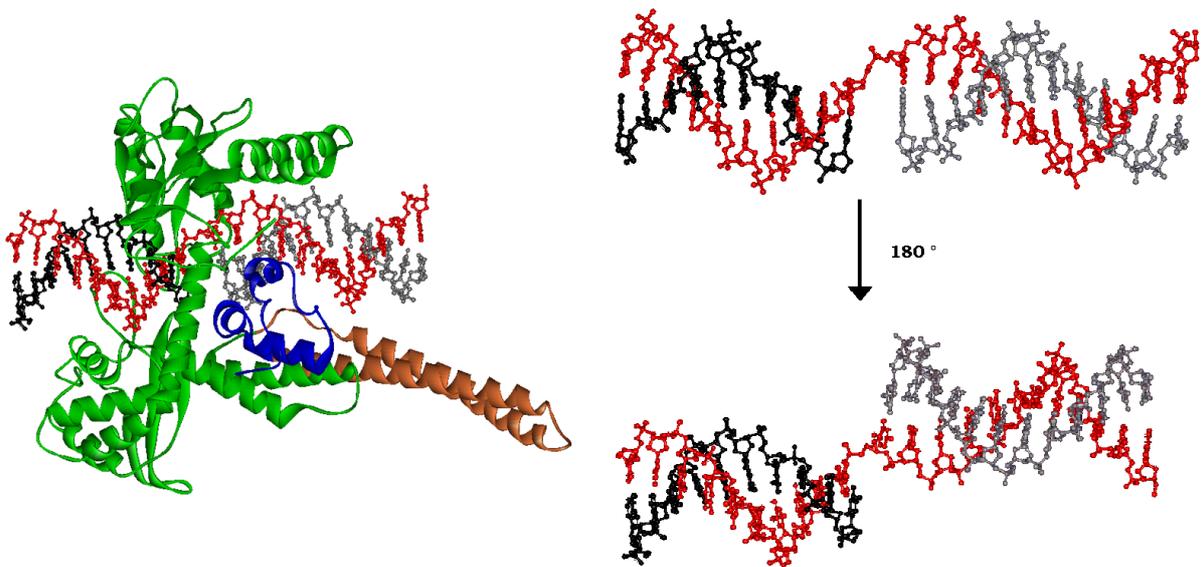


Figura 1.3.4.1: Schema sulla rotazione del DNA nella reazione di topoisomerizzazione promossa dalla DNA Topoisomerasi IB umana.

Sebbene esistano delle interazioni tra enzima e substrato ,anche a valle del sito di taglio, queste sono troppo deboli per ipotizzare un modello meccanicistico del rilassamento come quello proposto.

I dati cristallografici suggeriscono che, una volta avvenuto il taglio, il DNA a valle del fosfato scisso ruoti consentendo il rilascio dello stress torsionale immagazzinato nel substrato (Stivers J.J. et al., 1997).

L’ esistenza di una certa libertà di movimento del 5’-OH consentirebbe , inoltre , di spiegare l’ attività di trasferimento dei filamenti (*strand-transfer*) evidenziata dalla topoisomerasi IB.

Studi di modellistica sulla rotazione del DNA all’interno della cavità proteica, hanno provato che se la proteina mantenesse il proprio stretto abbraccio sul DNA, la doppia elica, ruotando, andrebbe a toccare e forse spostare sia il CAP che il linker. Da questa

osservazione è stato coniato il termine “*rotazione controllata*” (Stewart et al., 1998) (fig. 1.3.4.2) per definire il meccanismo di rilassamento. Secondo questo modello, linker e CAP fungerebbero da freno alla rotazione del DNA (D’Anours D. et al., 2002).

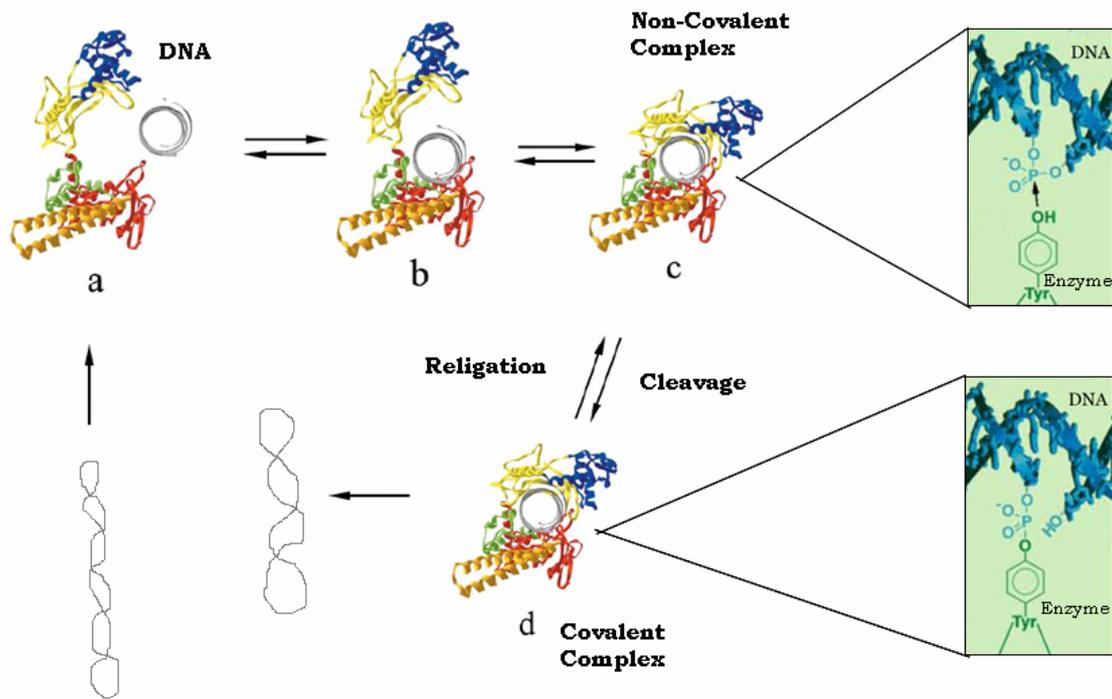


Figura 1.3.4.2: Meccanismo di catalisi della DNA Topoisomerasi IB umana

Un’ipotesi alternativa propone che una volta avvenuta la reazione di taglio, l’enzima debba aprirsi per permettere la rotazione e forse assumere una conformazione vicina a quella proposta per la Top1 libera dal suo substrato. Secondo questo modello non dovrebbe esservi alcun impedimento alla rotazione, che per questo perde l’aggettivo di “*controllata*”. Gli studi di modellistica (Stivers J.J. et al., 1997) tendono a considerare quest’ipotesi poco realistica, dal momento che si verificherebbero urti non trascurabili tra proteina e DNA, pur scegliendo come perno uno qualsiasi dei 5 legami che vanno dal nucleotide -1 al +1. Anche permettendo una completa dissociazione dei sottodomini I e II dal sottodominio III, gli impedimenti alla rotazione sembrerebbero non risolti.

Gli urti tra DNA e proteina si eviterebbero nel caso in cui fosse la doppia elica a subire una forte distorsione, che la allontanerebbe dalla sua conformazione B, a valle del sito di taglio. Secondo quest’ultima ipotesi, non sarebbero necessarie importanti

modificazioni conformazionali della struttura proteica per permettere la perdita di alcune unità di numero di legame al substrato.

Mentre non è conosciuto il numero di rotazioni permesse per ogni reazione nell'enzima umano, il dato è stato ottenuto nella caratterizzazione della topoisomerasi I di *Vaccinia virus* (un'altra topoisomerasi della famiglia IB).

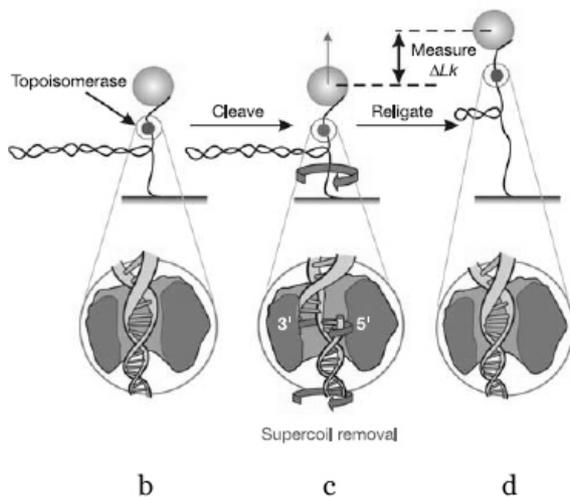
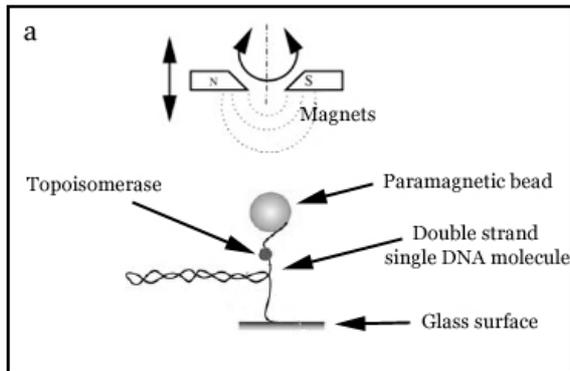


Figure 1.3.4.3. Esperimento di single molecule con la DNA topoisomerasi IB umana a: struttura schematica dell'apparato. Una molecola di DNA a doppio filamento è covalentemente ancorata ad una biglia paramagnetica da un lato ed ad una superficie di vetro dall'altro. La Top1 è legata non covalentemente al DNA. b: la Top1 lega il DNA. c: la Top1 rilassa il DNA. d: l'enzima religa il DNA, l'altezza della biglia dal piano è proporzionale al numero di superavvolgimenti rimossi (ΔLk). Adattata da Koster D. A. et al 2005

Ad ogni reazione di topoisomerizzazione corrisponde, in media, una perdita di cinque unità di numeri di legame.

La Top1 presenta una distribuzione dei topoisomeri prodotti durante la reazione di rilassamento che segue una distribuzione gaussiana.

Esperimenti di *single molecule* hanno evidenziato che la Top1 è capace di sentire l'attrito prodotto dal DNA durante la rotazione del filamento scissile a valle del sito di taglio.

Secondo questo approccio una molecola di DNA lineare a doppio filamento è ancorata tra una superficie in vetro e una biglia paramagnetica

Una coppia di magneti è utilizzata per superavvolgere il DNA in modo controllato e predeterminato. L'altezza della biglia dalla superficie è proporzionale al grado di superavvolgimento del DNA e come tale funzione della forza e della torsione applicata.

Quando è presente una topoisomerasi IB si osserva un aumento discreto nell'altezza del DNA causato dal suo rilassamento. Durante un singolo ciclo catalitico vengono rimossi un numero discreto di superavvolgimenti a dimostrazione che la Top1 non è in grado di rilassare completamente il substrato nel corso di un unico ciclo di topoisomerizzazione (fig. 1.3.4.3).

Tuttavia la misura della velocità di allungamento del DNA indica la presenza di attrito tra i domini proteici e il DNA che ruota entro la cavità enzimatica (Koster D.A. et al. 2005).

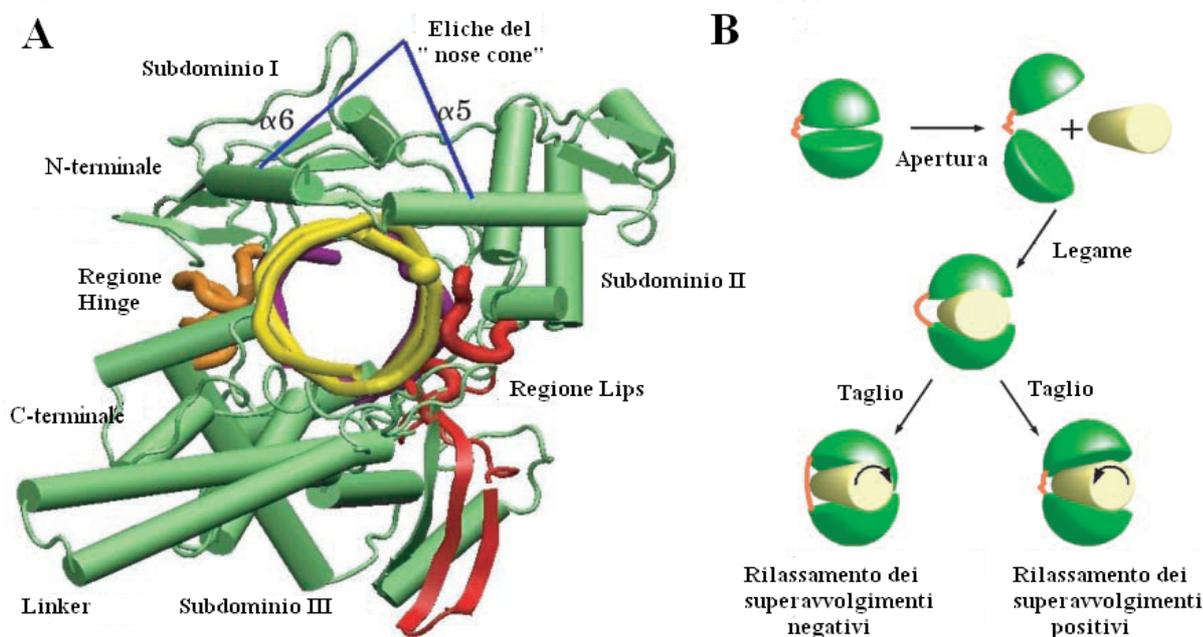


Figura 1.3.4.4. (A) Complesso covalente Top1-DNA visto dal lato del dominio linker lungo l'asse dell'elica del DNA. Il DNA a valle del sito di taglio è colorato in giallo, a monte del sito di taglio in viola, la proteina è rappresentata in verde ad esclusione delle "lips" colorate di rosso e della regione "hinge" in arancio. **(B)** Rappresentazione schematica del rilassamento dei superavvolgimenti. Il DNA è schematizzato come cilindro entro la cavità enzimatica (in giallo), la proteina (in verde) è schematizzata come due emisferi collegati tra di loro dalla regione perno (in arancio). Nello schema è visibile l'allungamento della regione perno nel rilassamento dei superavvolgimenti negativi e l'allontanamento dei due emisferi nel rilassamento di quelli positivi..Adattato da Sari L et al., 2005

Il confronto nella velocità di rilassamento della topoisomerasi vaccina e di quella umana suggerisce che per la seconda sia presente un maggior attrito tra enzima e substrato confermando la presenza di notevoli differenze strutturali tra le due proteine.

La Top1 è capace di sentire l' attrito durante la rotazione del substrato, così la sua azione è regolata dalla fine interazione tra domini proteici e DNA.

Studi di dinamica molecolare hanno consentito di ipotizzare per la DNA Topoisomerasi IB umana un diverso meccanismo di rilassamento di substrati aventi segno opposto (fig1.3.4.4.A).

In particolare il rilassamento dei superavvolgimenti positivi coinvolgerebbe la regione delle "lips", che si allontanerebbero di circa 10-14 Å passando da una conformazione chiusa ad una parzialmente aperta (fig1.3.4.4 B).

Il rilassamento dei superavvolgimenti negativi , invece, interesserebbe l' α - elica dell' *hinge* che si allungherebbe di circa 12 Å per consentire la rotazione del DNA entro una cavità enzimatica che rimane comunque chiusa (*fig1.3.4.4 B*).

La prossimità dei residui del dominio N-terminale all' α -elica del perno consente di ipotizzare un coinvolgimento di questa regione nel rilassamento dei superavvolgimenti negativi. I dati a disposizione non consentono di escludere un ruolo del dominio N-terminale anche nel rilassamento dei superavvolgimenti positivi (Sari L et al., 2005).

1.4 Topoisomerasi I B e Tirosina Ricombinasi

La Top1 presenta notevoli analogie con una classe di enzimi noti come tirosina ricombinasi, tanto da poter considerare entrambe le proteine componenti di un' unica superfamiglia (Redinbo et al., 1998; Guo et al., 1997).

Le tirosina ricombinasi sono degli enzimi capaci di promuovere processi di ricombinazione sito-specifica, grazie alla loro capacità di legare il DNA presso specifici siti di riconoscimento, noti come RBE (recombinase binding elements), lunghi 11-14bp e separati da una regione spaziatrice di 6-8 bp. Ciascun sito di legame è riconosciuto da due monomeri, che si avvolgono come una tenaglia intorno all' acido deossiribonucleico. Due RBE adiacenti, riconosciuti da quattro ricombinasi, costituiscono un complesso di ricombinazione completo, noto come complesso sinaptico (*fig. 1.4.1*).

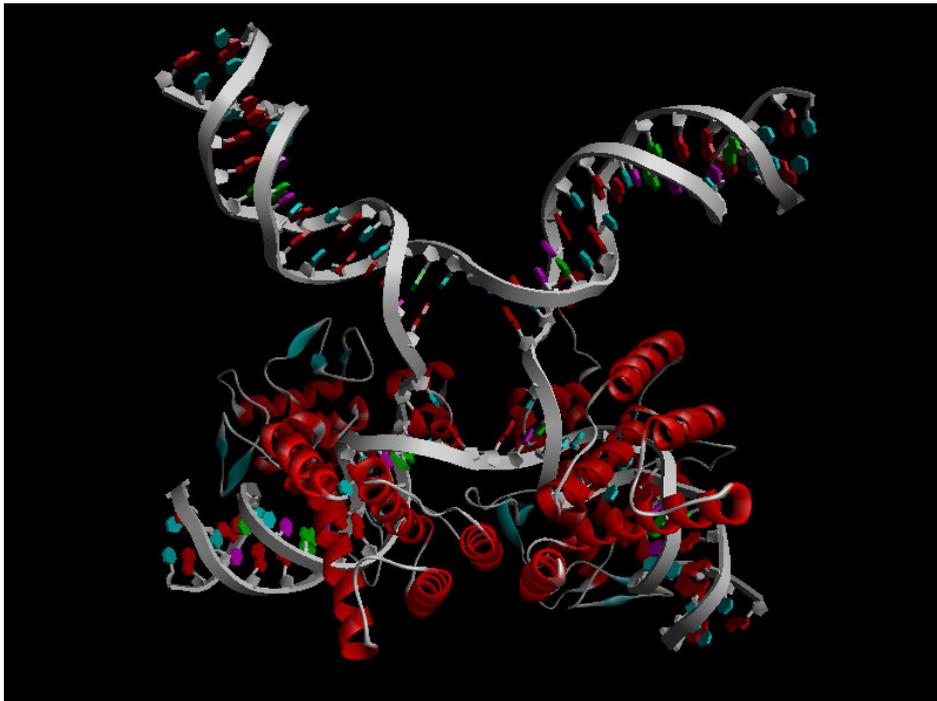


Figura 1.4.1: Struttura del complesso DNA-dimero di Cre

Tutti le tirosina ricombinasi possiedono un core comune di circa 300 aa (conservato soprattutto al C-terminale) e sono caratterizzate dalla presenza di un dominio N-terminale, C-terminale e una piccola estensione sempre a livello di quest' ultimo.

La reazione catalizzata da queste proteine prevede l'azione concertata di due dei quattro monomeri, che tagliano e ricuciono il DNA, mediante due transesterificazioni ad opera della Tyr catalitica, generando, come prodotto, una giunzione di Holliday (Cheng et al., 1998). Questo intermedio di ricombinazione è risolto dalla seconda coppia di tirosina ricombinasi sempre mediante reazioni di taglio e richiusura .

In base al meccanismo di taglio è possibile distinguere un *trans cleavage* e un *cis cleavage*; nel primo caso la Tyr catalitica appartiene ad un monomero, ma la sua attivazione è promossa dai residui del sito catalitico del secondo monomero legato allo stesso RBE. Nel *cleavage cis*, invece, la Tyr catalitica e gli altri residui del sito attivo appartengono allo stesso monomero.

Le analogie tra topoisomerasi I e tirosina ricombinasi riguardano sia il meccanismo d'azione, che la struttura. Entrambe non richiedono cationi come cofattori e conservano l'energia del legame fosfodiesterico, di cui promuovono la rottura, generandone uno 3'-fosfotirosinico.

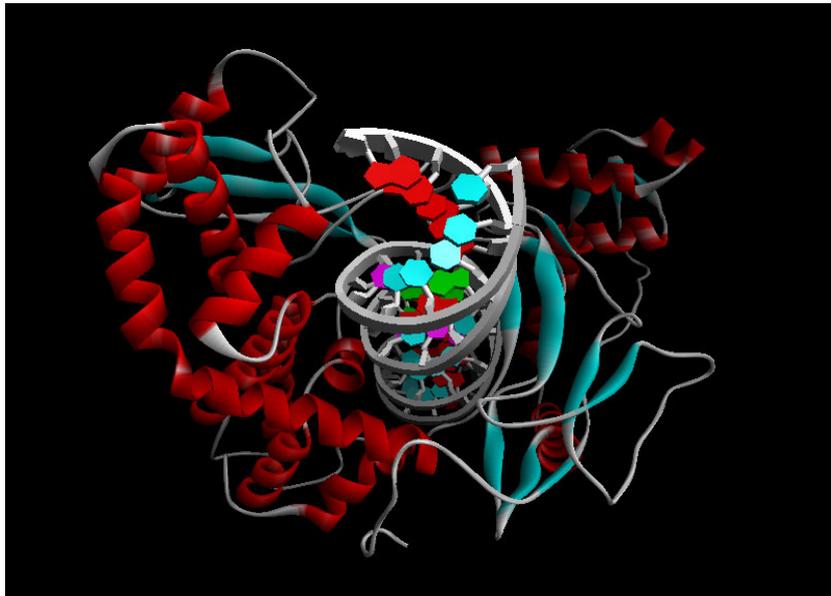


Figura 1.4.2: Legame della tirosina ricombinasi Cre intorno al DNA

Inoltre, si avvolgono intorno al DNA formando un poro centrale che racchiude il substrato (*fig. 1.4.2*). Sebbene queste due proteine non presentino alcuna analogia nella sequenza primaria, sono contraddistinte da una notevole similitudine strutturale a livello del C-terminale contenente la Tyr catalitica (*fig. 1.4.3*).

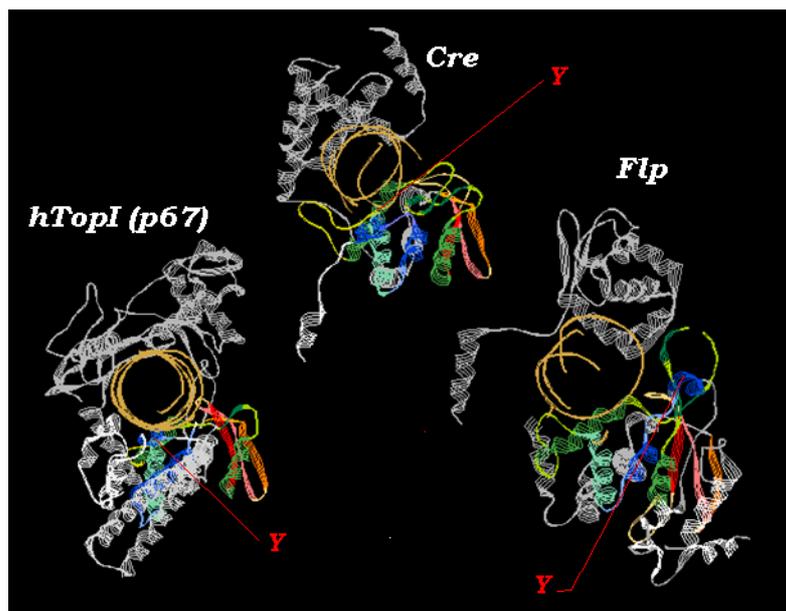


Figura 1.4.3.: Struttura della *HtopI* privata di parte del dominio N-terminale e due tirosina ricombinasi (*Cre* e *Flp*) legate al substrato.

Esistono, invece, differenze sia a livello dell’N-terminale, che del linker. Infatti, nelle tirosina ricombinasi non esiste un vero dominio linker, ma piuttosto un loop, più o meno esteso, che è in grado di determinare il tipo di taglio (*cis* o *trans*).

In caso di un loop sufficientemente lungo per creare una struttura secondaria, che si ripieghi su se stessa, come accade per la Top1, si avrà un *cis cleavage*.

Il sito attivo, in entrambi i casi, è caratterizzato da una sequenza del tipo RK(H/K)R(H/W) (oltre alla Tyr catalitica) (*Tab.1*). La funzione di questi amminoacidi è la stessa per entrambi gli enzimi salvo alcune eccezioni (Top1 His632, Flp Trp330).

Tabella n°1:comparazione dei residui catalitici della topoisomerasi I umana e di due tirosina ricombinasi

	<i>Residui del sito attivo conservati</i>					
<i>HtopI</i>	R488	K532	K587	R590	H632	Y723
<i>Flp</i>	R191	K223	H305	R308	W330	Y343
<i>Cre</i>	R173	K201	H289	R292	W315	Y324

Proprio in virtù di queste notevoli similitudini, si è ipotizzato che le tirosina ricombinasi potessero rilassare substrati superavvolti promuovendone la topoisomerizzazione. Il maggior limite a tale reazione è costituito dalla dimerizzazione, anche se le tirosina ricombinasi sembrano controllare con minor precisione il 5’-OH.

La perdita e lo scambio del filamento, a valle del sito di taglio, infatti, è fondamentale per promuovere la ricombinazione.

Entrambe le proteine possiedono un sito attivo molto flessibile come dimostrato dalla capacità della Top1 di sostituire il 5'-OH con altri nucleofili come H₂O₂ (Lysby et al.,1998).

Un ulteriore riprova dell' analogia strutturale e biochimica di queste proteine è fornita dalla sensibilità di alcune tirosina ricombinasi alla CPT. Questo farmaco, anche in tal caso, è in grado di inibire la reazione di ricucitura usando lo stesso meccanismo proposto per la Top1. La sostituzione del dominio linker della Top1 con quello della ricombinasi Cre indica che in presenza di un dominio linker lungo 6 o 8 aminoacidi viene conservata l' attività di rilassamento; mentre la sua sostituzione con uno lungo 4 aminoacidi determina la formazione di un enzima chimerico incapace di rilassare il substrato ma ancora in grado di legare il DNA. Inoltre gli enzimi chimerici sono insensibili all' azione inibitoria della CPT durante il saggio di rilassamento. Questi dati confermano l' ipotesi secondo cui perturbazioni del dominio linker siano capaci di determinare resistenza alla CPT, probabilmente causata da alterazioni nel controllo funzionale della rotazione del filamento a valle del sito di taglio (Frohlich et al., 2008).

1.5 Gli inibitori della Topoisomerasi I umana

L'attività catalitica della DNA Topoisomerasi IB umana è inibita da diversi composti, che in base al meccanismo d'azione possono essere divisi in :

- *Soppressori delle topoisomerasi I*: classe di composti che agiscono sul substrato alterandone lo stato in modo da prevenire il legame e quindi l'azione delle topoisomerasi. A questa classe appartengono alcuni agenti intercalanti (doxorubicina) e leganti il solco minore (distamicina A) . La sensibilità a questi composti , in genere, è indipendente dalla concentrazione intracellulare dell'enzima (Pizzolato et al., 2003).
- *Veleni della topoisomerasi I*: classe di composti in grado di bloccare l'intermedio di taglio inibendo la reazione di ricucitura. La sensibilità di una cellula a queste molecole è direttamente proporzionale alla concentrazione del target. A questa classe di composti appartengono la camptotecina (CPT) e tutti i suoi derivati (Pizzolato et al., 2003).

1.5.1 Le Captotecine

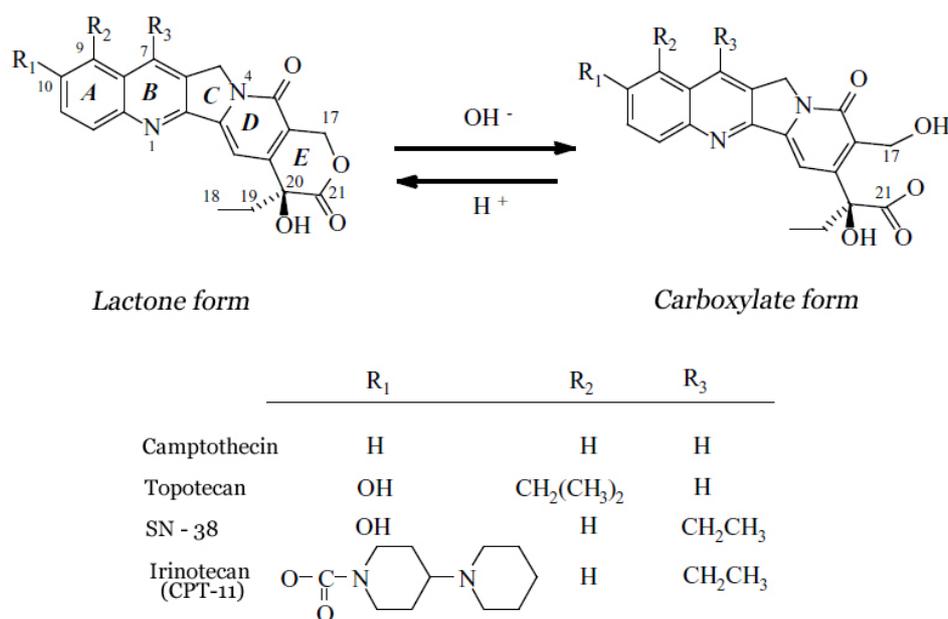


Figura 1.5.1.1: Struttura della Camptotecina (CPT), struttura del Topotecano (Tpt), struttura dell'irinotecano (CPT-11) e del suo metabolita attivo SN-38.

La classe dei veleni ha come massimo esponente la CPT : un'alcaloide naturale, scoperto negli anni '60 ed estratto dalla pianta *Camptotheca acuminata* (Pizzolato et al., 2003). Questa droga dalla struttura planare (sistema policiclico composto da cinque anelli), è in grado di intercalarsi tra due coppie di basi entro una molecola di DNA (*fig.1.5.1.1*). In natura può esistere in due forme come lattone o come acido carbossilico, normalmente in equilibrio fra di loro. In ambiente neutro o alcalino la forma aperta (acido carbossilico) predomina sulla chiusa e sebbene, la prima sia maggiormente solubile è anche meno attiva. La CPT ha un solo centro chirale in posizione 20 ,infatti ,la droga estratta si trova come enantiomero 20-S; il diastereoisomero R, ottenuto sinteticamente, è totalmente inattivo.

Data la bassa solubilità di questo composto è stata valutata la possibilità di usare il suo derivato sodio carbossilato per scopi terapeutici. Tuttavia questa modificazione determina un'apertura irreversibile dell' anello lattonico causando uno spostamento dell' equilibrio verso la forma acida carbossilica.

Poiché quest' ultima conformazione è marcatamente meno citotossica, il raggiungimento di un effetto terapeutico significativo è subordinato alla somministrazione di dosi elevate , che si associano a DTL (dose-limiting toxicity), (Hertzberg et al., 1989; Gottlieb & Luce, 1972; Muggia et al., 1972).

Si è quindi valutato l' effetto prodotto ,in termini di efficacia terapeutica , da alcune sostituzioni volte ad aumentare la solubilità di questo composto.

Quelle effettuate in posizione 7 e 9 non alterano l' attività del farmaco, consentendo di ipotizzare che gli anelli A e B non stabiliscono forti interazioni con il sito di riconoscimento. (Wang et al., 1997). L'aggiunta di un gruppo etile (CH₃CH₂-) in posizione 7 e di un gruppo ossidrilico (-OH) in posizione 10 aumenta la capacità del composto di inibire la Top1 (Tsuruo et al., 1988).

Le sostituzioni in 11, 12 e sull' anello E eliminano l'attività del farmaco, il che consente di ipotizzare un coinvolgimento nell'interazione con il complesso di cleavage.

Questi risultati hanno permesso di sintetizzare gli unici analoghi della CPT attualmente utilizzati in clinica: il topotecano e l' irinotecano (CPT-11), (Pizzolato et al., 2003).

Il topotecano è caratterizzato dalla presenza di una sostituzione dimetilamminometilica in posizione 9 e una ossidrilica in posizione 10; che gli conferiscono una maggiore idrosolubilità non alterandone l' efficacia terapeutica.

Questo analogo della CPT è utilizzato nel trattamento di tumori polmonari (a cellule piccole e non) e ovarici; tra gli effetti collaterali si annoverano diarrea e mielosoppressione (Kingsbury et al., 1991).

L'irinotecano (CPT-11) è un analogo semisintetico contenente un gruppo laterale diidroperidinico in posizione 10 (aggiunto mediante legame carbossiestereo) e uno etilico in posizione 7.

Il taglio della catena laterale ad opera delle carbossilesterasi endogene determina la formazione di un metabolita attivo (SN-38), che è circa 1000 volte più potente del CPT-11. In tal senso l'irinotecano può essere considerato un pro-farmaco.

Anche questo composto trova applicazione nel trattamento di tumori al polmone, alle ovaie e cervicali. I maggiori effetti collaterali sono rappresentati dalla mielosoppressione e dalla diarrea.

Tra le lesioni più comuni a carico del DNA compaiono i siti apurinici, apirimidinici, base mismatches e fotoprodotto indotti da UV. In genere, lesioni localizzate 4 bp prima del sito di taglio sul filamento non scissile inibiscono il taglio. Mentre quelle localizzate 6 bp *upstream* o da 1 a 3 bp dopo il sito di taglio stimolano il taglio di un fattore compreso tra 4 e 5 (*fig.1.5.1.2*), (Kingma et al., 1998).

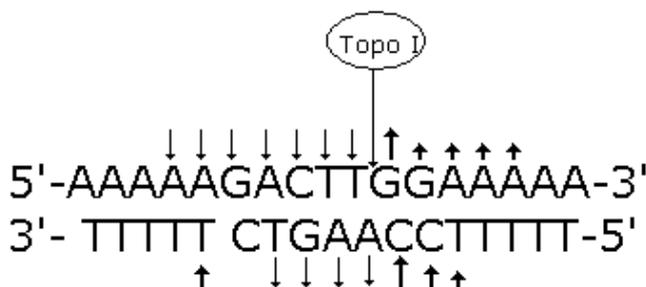


Figura 1.5.1.2: Rappresentazione schematica degli effetti esercitati dalle lesioni endogene sul taglio mediato dalla topoisomerasi I. (↑) effetto stimolatorio (↓) effetto inibitorio.

Tutte le lesioni, sebbene determinino risultati diversi, sono accomunate dalla capacità di indurre alterazioni strutturali, che si associano ad un calo nella stabilità termica della doppia elica, interferendo con l'appaiamento. La maggiore citotossicità di queste lesioni è osservata nel caso in cui tali perturbazioni siano localizzate subito dopo il sito di taglio. Infatti, in questa posizione sono in grado di alterare l'orientazione spaziale e

prevenire il *base pairing* del gruppo 5'-OH, inibendo la ricucitura (Pommier et al., 1998; Ryan et al., 1991; Wang, 2002; Kingma et al., 1998).

Per spiegare l'effetto stimolatorio, esercitato dalle lesioni endogene nei confronti della Top1 è stato proposto un modello noto come "*positional poison model*". Sia la CPT che le lesioni endogene stimolano il taglio del DNA mediato dalla Top1 perché modificano la struttura del DNA stesso. Inoltre, le interazioni tra enzima e farmaco sono necessarie per posizionare correttamente la CPT entro il sito di taglio. Questo aspetto del modello è supportato da studi cinetici condotti sul complesso ternario.

Quindi, mentre l'efficacia delle lesioni endogene è predeterminata dalla loro localizzazione lungo la doppia elica, la specificità dell'agente antitumorale è indotta dall'enzima.

Perciò si può affermare che la CPT induce alterazioni strutturali che mimano quelle prodotte dalle lesioni endogene, inoltre, il farmaco è in grado di promuovere la morte cellulare, sfruttando le vie di segnale attivate nel caso di interazioni tra Top1 e lesioni endogene.

Come già detto, la Top1 costituisce l'unico target cellulare per questa classe di composti capaci di stabilizzare l'intermedio covalente (Covey et al., 1989; Nitiss & Wang, 1988). In realtà, la CPT è in grado di intrappolare solo una parte dei complessi di taglio, evidenziando una selettività per la base presente in posizione +1. Mediante analisi di sequenza è stato possibile stabilire che la droga blocca con preferenzialità massima substrati con G in +1, intermedia con A o C e minima per quelli che presentino una T in questa posizione. L'esistenza stessa di tale "richiesta" presuppone la presenza di un'interazione tra CPT e substrato a questo livello.

1.5.2 La struttura risolta dai dati di diffrazione del co-cristallo HtopI-DNA e topotecano

Il confronto tra la struttura del complesso ternario (Top1-DNA-Tpt) e quello binario (Top1I-DNA) dimostra, che il topotecano si intercala a livello del sito di taglio, interagendo con le basi in -1 e +1.

Questo tipo di comportamento è confermato dal fatto che circa il 60% della superficie libera di questo farmaco, normalmente accessibile al solvente, si trova coinvolta in interazioni di *base-stacking* (con le basi in posizione -1 e +1).

Il sistema planare policiclico del topotecano mima un bp del DNA ed occupa, all'interno del duplex, lo stesso spazio riempito da una coppia di basi del complesso binario (fig. 1.5.2.1).

L'intercalazione di questo analogo della CPT determina un aumento della distanza tra la base in -1 e +1 da 3.6 Å (complesso binario) a 7.2 Å (complesso ternario) e si associa, anche, ad un incremento nel *twist*, che passa da 10° a 36°.(Stacker et al., 2002).

La distanza tra il 5'-SH e il fosfato, del legame 3'-fosfotirosinico, aumenta di 8 Å (da 3.5 Å a 11.5 Å) rendendo impossibile la reazione di ricucitura.

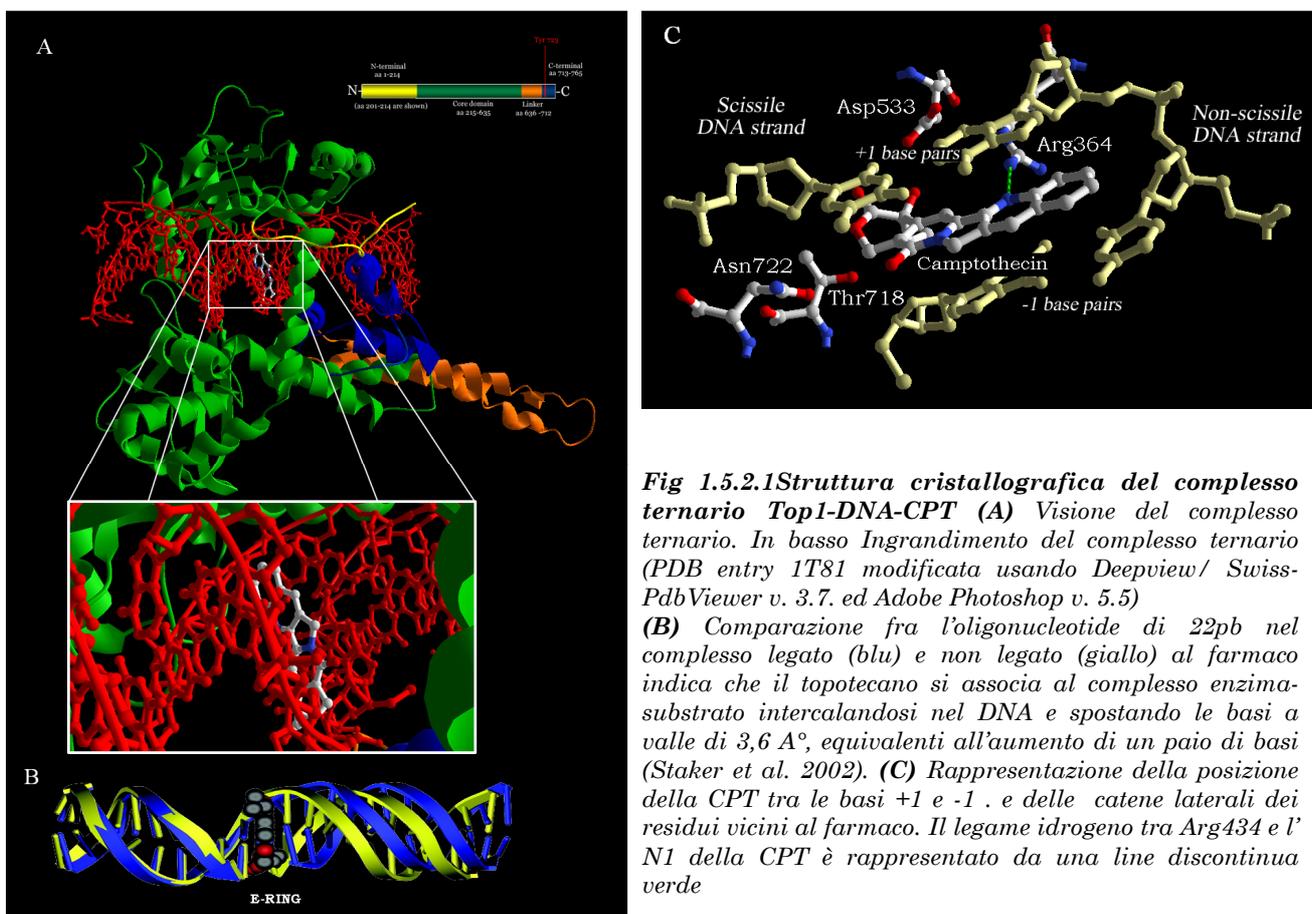


Fig 1.5.2.1 *Struttura cristallografica del complesso ternario Top1-DNA-CPT (A) Visione del complesso ternario. In basso Ingrandimento del complesso ternario (PDB entry 1T81 modificata usando Deepview/ Swiss-PdbViewer v. 3.7. ed Adobe Photoshop v. 5.5)*

(B) Comparazione fra l'oligonucleotide di 22pb nel complesso legato (blu) e non legato (giallo) al farmaco indica che il topotecano si associa al complesso enzima-substrato intercalandosi nel DNA e spostando le basi a valle di 3,6 Å°, equivalenti all'aumento di un paio di basi (Staker et al. 2002). **(C) Rappresentazione della posizione della CPT tra le basi +1 e -1 . e delle catene laterali dei residui vicini al farmaco. Il legame idrogeno tra Arg434 e l' N1 della CPT è rappresentato da una line discontinua verde**

Le modificazioni conformazionali che interessano la zona del legame fosfodiesterico scisso permettono la formazione di un sito di intercalazione per il topotecano. Nel complesso ternario la posizione del fosfato Ø è stabilizzato dai contatti con l'azoto del legame ammidico dei residui R362, G363 e K374. Inoltre il sito di intercalazione viene stabilizzato da diverse interazioni tra proteina e DNA: T718 (legame ad idrogeno con un ossigeno libero di guanosina +1 sul filamento tagliato), R364 (legame ad idrogeno

con N3 di adenosina -1 sul filamento non tagliato) e K 532 (legame a idrogeno con O2 di T -1).

Topotecano e enzima interagiscono attraverso la catena laterale del residuo D533 (legame a idrogeno con 20 (S) OH, sia nella forma lattonica che carbossilata. Il corretto posizionamento di D533 è supportato dalla formazione di un legame salino tra l'ossigeno carbossilico e la funzione ε-amminica protonata della R364 (Stacker et al.,2002).

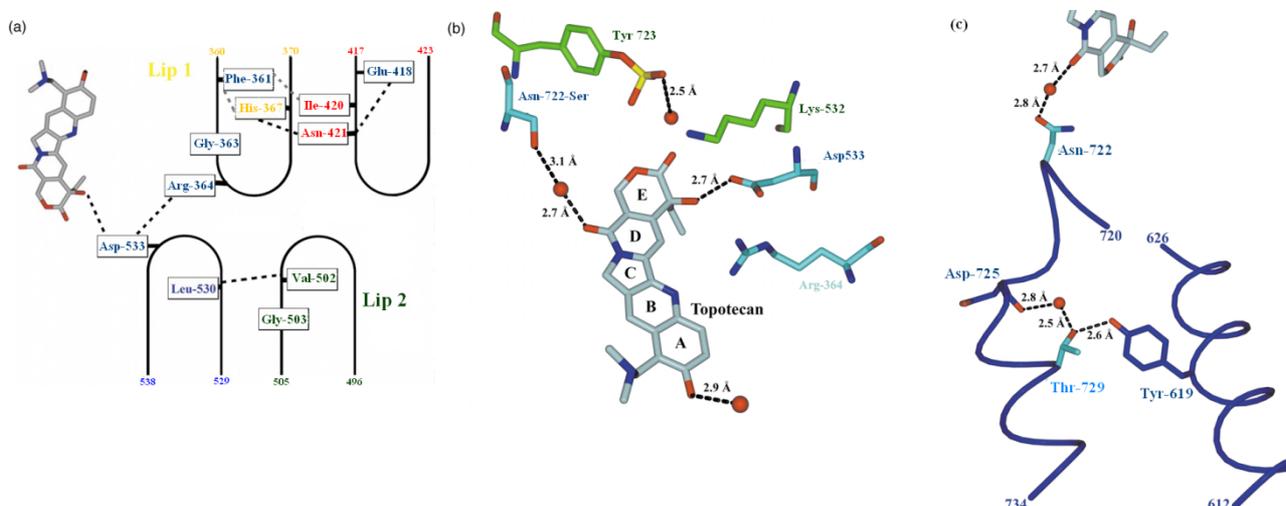


Figura 1.5.2.2(A) Rappresentazione schematica delle mutazioni che causano resistenza alla CPT (azzurro), regione Lip1(giallo),Lip2 (verde), loop 417-423(arancio) e loop 529-538 (blu). **(B)**Interazioni tra topotecano e residui Asn722 e Asp533. **(C)**Interazioni tra Thr729 e Asn722,Asp725 e Tyr619.

Di fatto la tasca di intercalazione per il derivato della CPT viene a formarsi per la semplice rotazione del legame fosfodiesterico \emptyset , che è possibile se le interazioni di stacking tra le paia di basi -1 e +1 vengono perse. Lo spostamento del fosfato \emptyset è stabilizzato dall'interazione con gli azoti impegnati nel legame peptidico tra R362 e G363 (fig1.5.2.2). A queste interazioni si aggiungono anche due legami idrogeno mediati dall'acqua :il primo tra il O18 e la catena laterale dell' Asn 722, mentre, il secondo tra l'ossigeno carbossilico in posizione 21 del Tpt e l'ossigeno del legame fosfotirosina (P-Tyr-723).

1.5.3 Meccanismi di resistenza alla CPT

In base agli studi preclinici la resistenza alla CPT e suoi analoghi può essere ricondotta a tre meccanismi:

- Accumulo inadeguato del farmaco nelle cellule tumorali(meccanismi di afflusso e efflusso).
- Alterazioni a carico della topoisomerasi I ,che comprendono sia un calo nei livelli cellulari dell' enzima, che la presenza di mutazioni in grado di conferire resistenza.
- Alterazioni nella risposta cellulare attuata nei confronti dei TCC (meccanismi di riparo e apoptosi), (Zeshaan et al., 2003).

La concentrazione intracellulare della CPT nella sua forma attiva è dipendente dall' *uptake* cellulare (afflusso), dal metabolismo del farmaco e dai meccanismi di efflusso. Il bilancio tra questi tre steps fornisce , di fatto , la concentrazione della forma attiva, cioè in grado di promuovere la morte cellulare. L'esposizione a concentrazioni submicromolari del farmaco è sufficiente per indurre apoptosi nelle cellule trattate.

Per quanto riguarda il meccanismo di entrata del farmaco, non esistono dati precisi, tuttavia, i risultati, sin qui ottenuti, consentono di affermare che a livello intestinale la CPT entra nelle cellule utilizzando trasportatori attivi e passivi, mentre ,a livello delle ovaie, esistono trasportatori attivi sia per il topotecano che SN-38.

L'attività del farmaco è dipendente dalla presenza dello stesso in forma attiva. Per quanto riguarda la CPT dipende dall'equilibrio tra la forma aperta inattiva (pH basico) e quella chiusa attiva (pH acido); nel caso dell' SN-38, la sua presenza è funzione dell'azione delle carbossilesterasi endogene, che promuovono il passaggio CPT-11→SN-38 (Larsen & Skladanowski, 1998).

Un ruolo predominante è svolto dai così detti meccanismi di efflusso: trasportatori di membrana capaci di promuovere l' uscita del farmaco e di altri composti citotossici. (Ma et al., 1998; Ma et al., 1998).Tra questi compaiono proteine ABC (ATP-binding cassette), MDR1 (multi-drug resistance) o glicoproteina P e BCRP (membro anch'esso degli ABC), (Zeshaan et al., 2003).

Le mutazioni in grado di conferire resistenza alla CPT possono essere divise in puntiformi e maggiori (Rubin et al., 1996 ; Chrencik et al., 2004).

Le prime sono state in parte individuate mediante studi condotti sulla struttura cristallografica. Tra queste compaiono in base all'analisi di Staker : Asp-533, Arg-364 e Asn-722, Phe-361, Gly-363, Ala-653, Glu-418 e Thr-729 (*fig.1.5.2.2*).

Per quanto riguarda i residui Asp-533, Arg-364 e Asn-722 la resistenza alla CPT è dovuta alla rimozione di interazioni, che contribuiscono, direttamente al legame del farmaco. Il residuo Asp533 forma l'unico contatto diretto (non mediato dall'acqua) tra proteina e farmaco a livello del 20(S)-OH delle CPTs. Questo amminoacido, inoltre, interagisce, mediante ponte salino con il residuo Arg364. La formazione di tale interazione è fondamentale per posizionare correttamente il residuo Asp533. L'amminoacido Asn722 forma un legame idrogeno mediato dall'acqua con O18 delle CPTs, contribuendo a stabilizzare il legame del farmaco (Jill et al., 2004).

Mutazioni a carico dei residui Phe-361 e Gly-363 non interferiscono direttamente con il legame della CPT ma sono importanti nella stabilizzazione della tasca di intercalazione. L'OP fosfodiesterico deve ruotare nella tasca di legame per consentire l'apertura del DNA creando il sito di legame per la CPT (Carey et al., 2003; Pond et al., 1999; Redinbo et al., 1998; Woo et al., 2003).

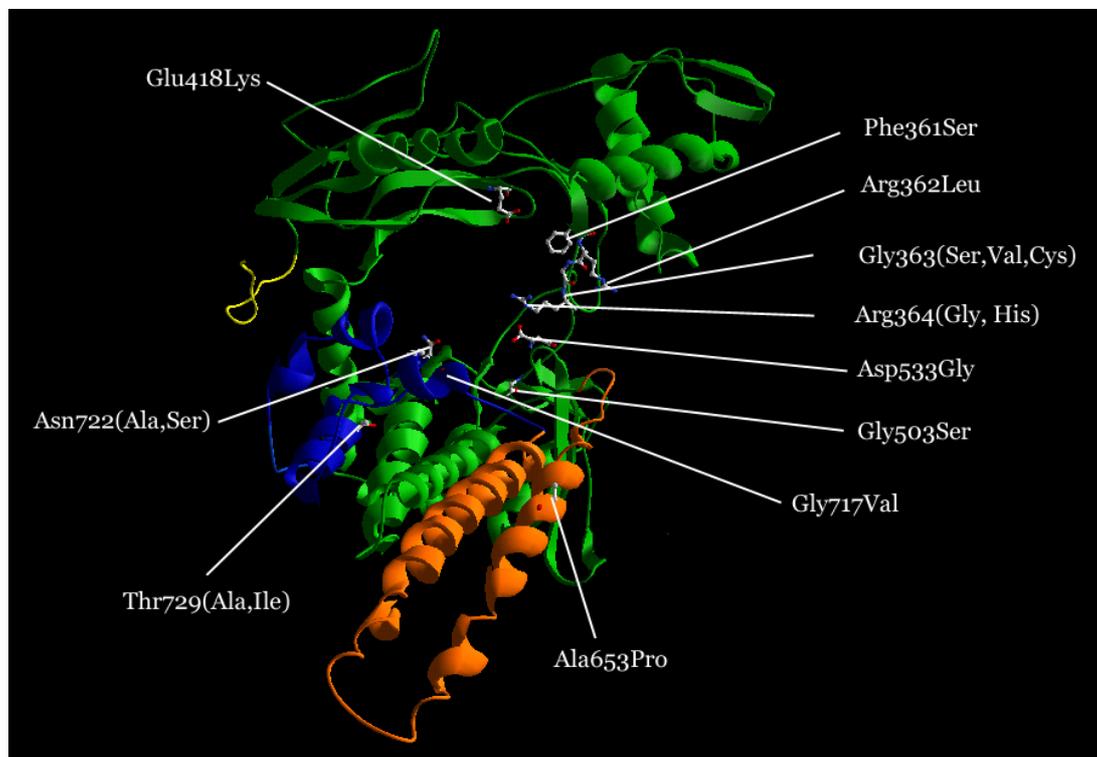


Figura 1.5.3.1 Rappresentazioni di alcune mutazioni del Top1 capaci di indurre resistenza alla CPT. Molte delle mutazioni capaci di indurre resistenza alle CPT sono localizzate nella regione delle lips, confermando l'importanza di questa regione sia nel legame del DNA che in quello del farmaco . In altri casi le mutazioni sono localizzate lontane dalla tasca di legame e dal sito attivo confermando l'esistenza di interazioni a lungo raggio tra i diversi domini proteici.

Mutazioni a carico di questi residui si associano ad una destabilizzazione dell' OP e determinano l' instaurarsi di resistenza. Tuttavia il modello non è in grado di spiegare la resistenza alla CPT indotta dalle mutazioni a carico dei residui Ala-653 e Thr-729 (*fig.1.5.3.1*).

Per quanto riguarda la Ala-653 (Fiorani et al., 2003), come già detto prima, l'interruzione della struttura elicoidale, che caratterizza il dominio linker, causa l' eliminazione del freno, determinando uno spostamento dell'equilibrio verso la reazione di ricucitura. In questo modo diminuisce la possibilità di formare il complesso ternario, il che spiega la resistenza al farmaco.

I meccanismi di eventuali resistenze alla CPT della Thr-729 è oggetto di questo studio. Oltre alle mutazioni puntiformi anche la duplicazione della regione 20-609 si associa ad una condizione di resistenza, sebbene non siano noti i motivi di tale comportamento.

Studi recenti hanno dimostrato che la rimozione di siti di interazione proteina-proteina sono importanti nel regolare la sensibilità al farmaco.

L' alterazione del segnale di localizzazione nucleare e/o del sito d'interazione con la nucleolina si traduce in una minore traslocazione nucleare della Top1. Ovviamente questo significa che nel nucleo c'è meno topoisomerasi I associata al DNA e quindi meno target per la CPT.

Inoltre la rilocalizzazione dal nucleo al citoplasma della Top1 , operata dal processo di sumolazione , influenza la sensibilità delle cellule al farmaco (Mao et al., 2002; Mao et al., 2000).

L' ultimo step da considerare riguarda eventuali mancanze nei meccanismi cellulari di risposta alla CPT. Interessa, come tale, alterazioni nei vari checkpoint di fase G1,S,G2 e M, nelle vie ATM/Chk2 e ATR/Chk1, nella cascata apoptotica e nei vari sistemi di riparo dei danni a carico del DNA (Abraham et al., 2001; Sordet et al., 2003; Leppard & Champoux, 2005; Larsen & Skladanowski, 1998).

1.6 Ruoli cellulari della DNA Topoisomerasi IB umana

La Top1 è coinvolta in processi cellulari fondamentali correlati al DNA quali replicazione, trascrizione, compattazione e organizzazione della cromatina, riparo di eventuali danni a carico del genoma.

Il movimento dell'RNA-polimerasi o della DNA-polimerasi durante la trascrizione o la replicazione di un dominio genera superavvolgimenti negativi dietro l'enzima e positivi davanti all'apparato molecolare che scorre sul DNA, in accordo con un modello definito "*twin-domain model*" (fig.1.6.1), (Wang et al., 2002; Norris, 1995). In un dominio topologico le estremità del DNA non possono ruotare, quindi, l'azione di questi enzimi divide lo stesso in due subdomini topologici, il primo con $Lk < L_0$, a valle, e il secondo con $Lk > L_0$, a monte (Liu & Wang, 1987; Wang, 2002).

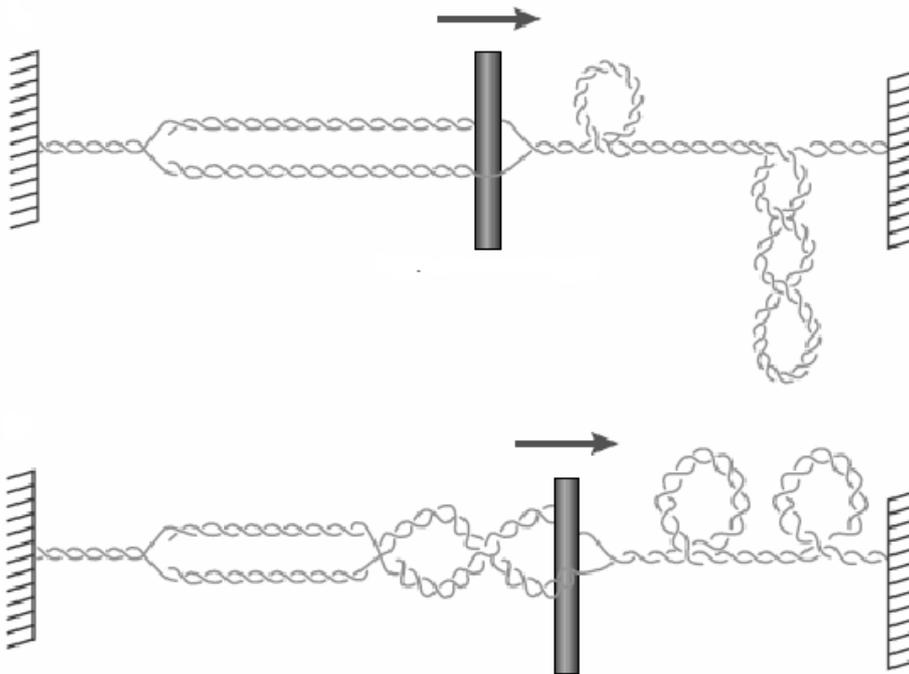


Figura 1.6.1: "*Twin domain model*" e sua implicazione nel processo di trascrizione e replicazione. Adattato da Wang 2000

Questo si verifica perché gli apparati di trascrizione e replicazione possono scorrere sul template ma non sono in grado di ruotare.

L'azione della topoisomerasi I è fondamentale durante la trascrizione ad opera della RNA polimerasi I che II nella fase di elongazione del messaggero.

Una differenza è riscontrabile nel ruolo della Top1 tra trascrizione basale e indotta. Nel secondo caso l'enzima agisce come coattivatore per l'RNA polimerasi II su promotori contenenti il TATA-box. Questa attività stimolatoria, mediata da TBP, è basata sulla capacità di stabilizzare il complesso TFIID-TFIIA. Tale attività è completamente indipendente dalla capacità di rilassamento. La topoisomerasi I può controllare la trascrizione anche mediante attivazione del processo di splicing agendo come chinasi nei confronti del fattore di splicing SF2/ASF e al contempo, legando i fattori PSF/p54 (Merino et al., 1993; Rossi et al., 1996; Labourier et al., 1998).

La conformazione del DNA può influenzare la capacità di accedere o utilizzare l'informazione contenuta in una data porzione del genoma. Le configurazioni alternative (DNA-Z, filamenti tripli ecc) potrebbero agire come interruttori molecolari in grado di attivare o meno alcuni geni; grazie alla capacità di alcune proteine, che regolano la trascrizione, di legare il DNA solo se presenta determinate conformazioni topologiche.

L'organizzazione del DNA cromosomale in domini topologici consente di regolare in modo differenziale lo stato topologico dei singoli comparti e quindi sia l'espressione genica che la replicazione.

Lo stato topologico del DNA è considerato un fattore critico nel determinare l'inizio del processo di replicazione, infatti, sia la sua conformazione che la flessibilità torsionale possono promuovere o meno la duplicazione del materiale genetico.

L'uso di farmaci quali le camptotecine induce la formazione di strutture aberranti che probabilmente originano dall'arresto delle forche replicative (sul filamento guida) a cui consegue la rottura degli intermedi replicativi. I "*double strands breaks*" si formano in risposta ad un meccanismo dose-dipendente e costituiscono i prodotti finali dell'azione citotossica, mediata dalla CPT (*fig.1.6.2*), (Pommier et al., 1998; Ryan et al., 1991; Wang, 2002).

L'unico bersaglio cellulare di questa classe di farmaci è rappresentato dalla Top1 e, in tal senso, è possibile mappare i siti di taglio indotti dalla CPT collocabili immediatamente prima della forca sul filamento parentale del replicone. La posizione di questi siti è indice del ruolo svolto dalla Top1, cioè la rimozione di stress torsionali durante la fase di elongazione.

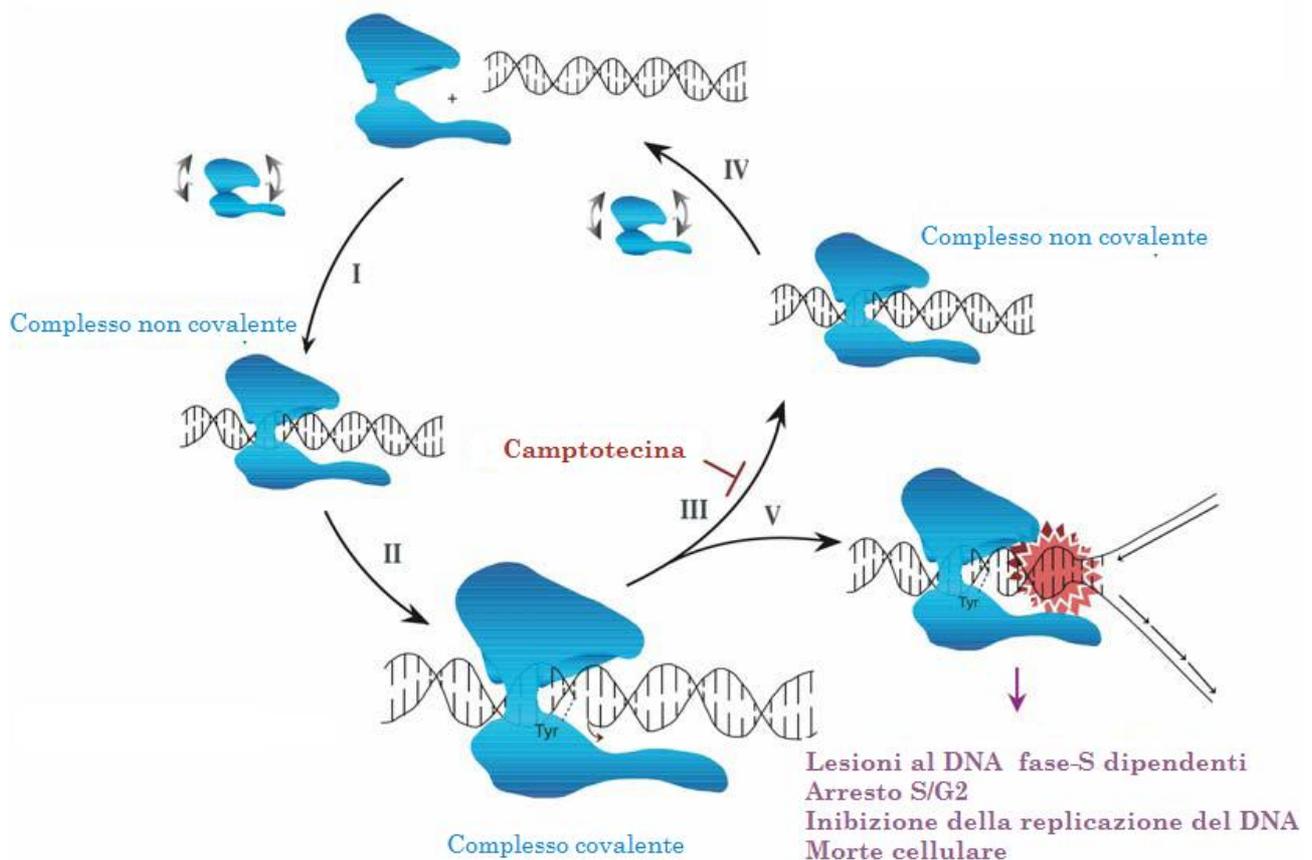


Figura 1.6.2. Ciclo catalitico della DNA topoisomerasi I (Top1). La Top1 è un enzima monometrico capace di legare il DNA prima formando un complesso non covalente e poi un complesso covalente con uno dei due filamenti. Il farmaco antitumorale CPT è in grado di inibire il ciclo catalitico dell'enzima interferendo con la reazione di ricucitura del DNA. Durante la fase S del ciclo cellulare ha luogo la conversione di questi complessi in lesioni irreversibili causato dalla collisione delle forche re replicative in avanzamento con gli intermedi di taglio bloccati sul DNA.

Alcuni esperimenti in vitro hanno dimostrato che la Top1 può mediare la ligazione di molecole di DNA eterologo sia nel caso in cui si tratti di filamenti doppi che singoli. La Top1 è capace di promuovere l'integrazione e l'escissione di DNA virale entro il genoma della cellula ospite. (Anderson & Berger, 1994; Rosenstein et al., 1997). Questi risultati fanno supporre che la DNA topoisomerasi I sia coinvolta in processi di ricombinazione illegittima, tale ipotesi è supportata da dati ottenuti in vivo su cellule trattate con CPT (Bullock et al., 1985; Zhu & Schiestl, 2004; Knab et al., 1993). Infatti, queste mostrano un incremento del fenomeno probabilmente legato alla capacità del farmaco di intrappolare la Top1 in una condizione potenzialmente ricombinazione genica (Pourquier et al., 1997).

D'Arpa e colleghi dimostrarono che i complessi di cleavage, stabilizzati dalla CPT, sono relativamente poco citotossici sin quando le cellule non entrano in fase S (Horwitz et

al.,1971; Bendixen et al., 1990; Muscarella et al., 1998). La loro citotossicità, durante questa fase, è circa 1000 volte maggiore rispetto a quella riscontrata nel resto del ciclo cellulare (*fig1.6.2*), (D'Arpa et al., 1990).

L'intrappolamento dell' intermedio covalente costituisce un evento necessario ma non sufficiente a indurre la morte cellulare. Perché si realizzi un evento apoptotico nelle cellule trattate con CPT (o suoi analoghi) devono verificarsi una serie di eventi ordinati e sequenziali:

- Processamento dei complessi di taglio stabilizzati in lesioni franche a carico del DNA.
- Rilevamento del danno a cui consegue l' attivazione di vie di segnale associate allo stress e al blocco del ciclo cellulare.
- Attivazione di un gruppo di enzimi (caspasi) in grado di promuovere il processo di morte cellulare programmata, noto come apoptosi.

Il fatto che gli intermedi covalenti intrappolati in fase G1 e G2 siano meno nocivi rispetto a quelli bloccati in fase S, consente di affermare che la loro citotossicità sia legata all' interazione degli stessi con le forche replicative e, in particolar modo con l'elicasi del replisoma. Questa ipotesi è ampiamente supportata da alcune osservazioni: i composti che inibiscono la sintesi del DNA (idrossiurea) aboliscono la citotossicità della CPT, mentre cellule $\Delta rad52$ risultano ipersensibili (Resnick & Martin, 1976; Knab et al., 1993).

Recentemente esperimenti di *single molecule* ,condotti in presenza della CPT, hanno rilevato un accumulo di superavvolgimenti positivi davanti alla forca replicativa causato dall' azione dell' inibitore. Questi dati hanno permesso di ipotizzare l' esistenza di un secondo meccanismo d' azione per la CPT e suoi analoghi in cui i danni al DNA, in grado di produrre citotossicità, non sarebbero generati unicamente dalla collisione delle forche replicative con i complessi di taglio bloccati sul DNA. In particolare la mancata rimozione dei superavvolgimenti positivi durante la replicazione indurrebbe uno notevole stress torsionale a carico del DNA. La presenza di questo alterato stato topologico influenzerebbe indirettamente sia l' integrità che la progressione delle forche re plicative (Koster et al., 2007).

Le lesioni generate dai TCCs (Top1 cleavage complexes) determinano risposte cellulari del tutto paragonabili a quelle attuate in presenza di rotture a doppio filamento generate da altri insulti.

Poiché è fondamentale trasmettere alla progenie una copia accurata del genoma, l'evoluzione ha selezionato una serie di vie note come *cell-cycle checkpoints* la cui funzione è quella di rilevare danni o anomalie a carico del DNA .

Questi pathways, inoltre, coordinano la progressione del ciclo cellulare con il riparo del genoma (fig. 1.6.3).

Come tali contengono elementi di segnale, cioè proteine sensore, che analizzano la cromatina rilevando condizioni di replicazione parziale, rotture o anomalie a carico del DNA (Borovitskaya & D'Arpa, 1998). Infine traslano questi stimoli in segnali biochimici, che regolano la funzione di specifiche proteine target. Il ciclo cellulare può essere diviso in quattro fasi :G1,S,G2 e M ; il passaggio da una all' altra è possibile solo se ha luogo il superamento dei checkpoints (Abraham et al., 2001; Sordet et al., 2003).

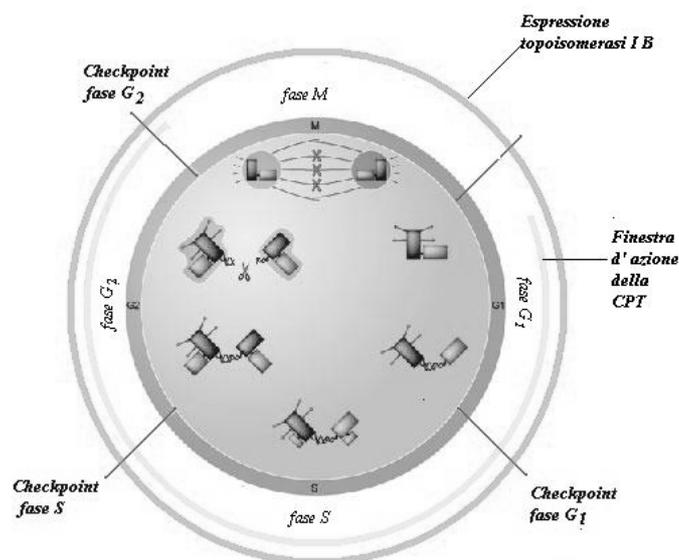


Figura 1.6.3. Ciclo cellulare e checkpoints, espressione della Top1 durante il ciclo cellulare.

Il denominatore comune, nel caso in cui siano rilevati danni a carico del DNA, è l'attivazione di due vie di segnale :ATM/Chk2 e ATR/Chk1 (sono entrambi membri della famiglia PIKK =fosfoinositina 3-chinasi related chinasi), (Kaufmann, 1998). Nel primo caso la presenza di danni a carico del DNA determina l' autofosforillazione di ATM attivandola; in tale condizione, questa agisce su Chk2 mediante fosforilazione della Thr 68 .

Nel caso di ATR/Chk1 le regioni a singolo filamento, rilevate dalla proteina A, stimolano il legame di ATR e di altre proteine, coinvolte nel riconoscimento di lesioni genomiche. L'effetto finale di questo reclutamento è l'attivazione via fosforillazione di Chk1.

Nel caso in cui le lesioni a carico del DNA non possano essere riparate si verifica un incremento nella permeabilità mitocondriale a cui consegue il rilascio del *citocromo c*. (Yang et al., 1997) Questo, insieme ad Apaf-1, determina l'attivazione della procaspasi-9, segnando l'inizio della cascata apoptotica (*fig. 1.6.4*), (Kaufmann et al., 1998; Rubin et al., 1991; Friesen et al., 1996; Ibrado et al., 1996; Walker et al., 1991; Kaufmann, 1989).

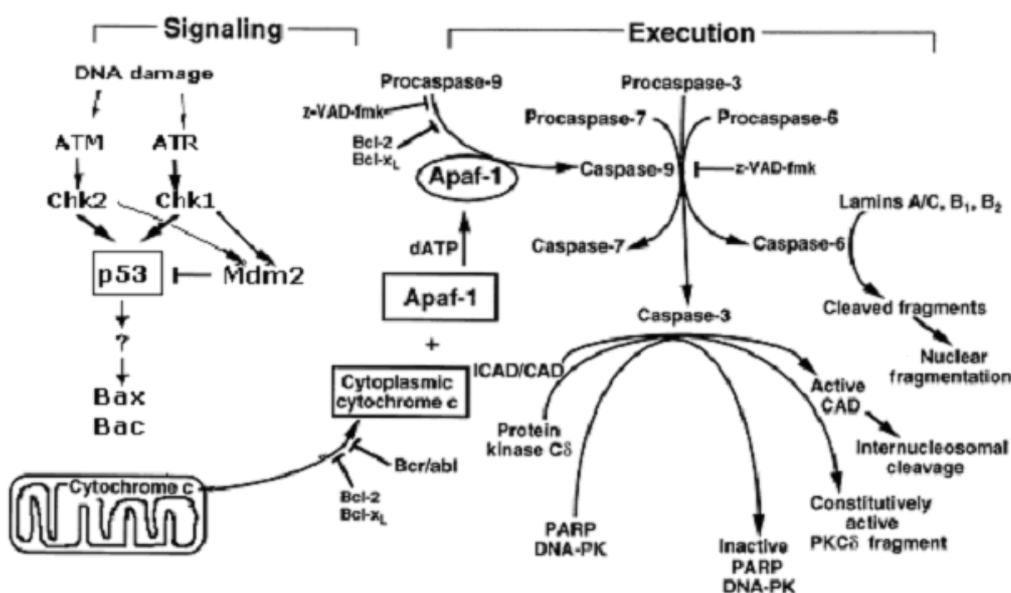


Figura 1.6.4. Cascata apoptotica in cellule trattate con CPT o suoi analoghi

E' stato notato che alcune cellule trattate, sia con CPT che Topotecano, sopravvivono al trattamento (Lupi et al., 2004). Queste popolazioni presentano un aumento nella frequenza di mutazioni e aberrazioni cromosomiche. La presenza di tali alterazioni sembra determinata dalla capacità di alcuni complessi di taglio di religare molecole di DNA accettore; in dipendenza della natura di tali accettori si avranno eventi di riparo preciso, piccole delezioni, inserzioni o ricombinazione non omologa.

1.6.1 Riparo dei complessi suicida

I complessi suicida determinano, nel caso della trascrizione, la presenza di un terminazione a doppio filamento del tipo DNA-RNA, mentre, per quanto riguarda la replicazione si avrà una doppia elica (DNA-DNA) costituita dal filamento stampo e quello neosintetizzato.

Quindi, il riparo dei TCC richiede la rimozione dei complessi di taglio, quella dei ds breaks e la progressione delle forche replicative (*fig.1.6.1.1*).

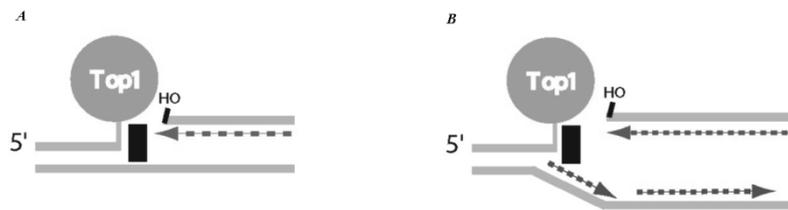


Figura 1.6.1.1: Conversione del complesso di cleavage in lesioni a seguito della collisione con il complesso di trascrizione (A) e replicazione (B). Adattato da (Sordet et al., 2003)

1.6.2 Processamento dei complessi Top1-DNA 3'

La risoluzione di questi intermedi può aver luogo secondo tre meccanismi: via Tdp1/PNKP (tyrosyl DNA phosphodiesterase/polynucleotide Kinase phosphatase), 3'-flap endonucleasi e TIRR (Topoisomerase I induced recombination repair).

Tdp1 è una proteina ubiquitaria, altamente conservata, appartenente alla famiglia delle fosfolipasi D (Yang et al., 1996). Dal punto di vista strutturale è un monomero costituito da due domini estremamente simili tra di loro, caratterizzati dalla presenza del motivo HKD, (Struckey et al., 1999; Davies et al., 2003) che è critico per l'attività della proteina.

Il legame del DNA e della Top1 a Tdp1 è possibile solo se questi subiscono alterazioni strutturali, come dimostrato dalla struttura cristallografica. Infatti, la massima attività di Tdp1 (*fig.1.6.2.1*) si ha nel caso di substrati che presentino le seguenti caratteristiche (Davies et al., 2002):

- ∞ Segmenti di DNA lunghi pochi nucleotidi capaci di interagire e legare il solco di Tdp1 (carico positivamente), (Debethune et al 2002).

- ∞ Presenza di un legame fosfotirosil alla giunzione DNA-Top1 (indica che la terminazione 5' è stata digerita o allontanata per consentire l'accesso di Tdp1 al legame 3'-fosfotirosil)(Pouliot et al., 2001).
- ∞ Presenza di un segmento polipeptidico della Top1 (indica che l'azione di Tdp1 è successiva alla degradazione proteosomica della topoisomerasi I), (Liu et al., 2002).

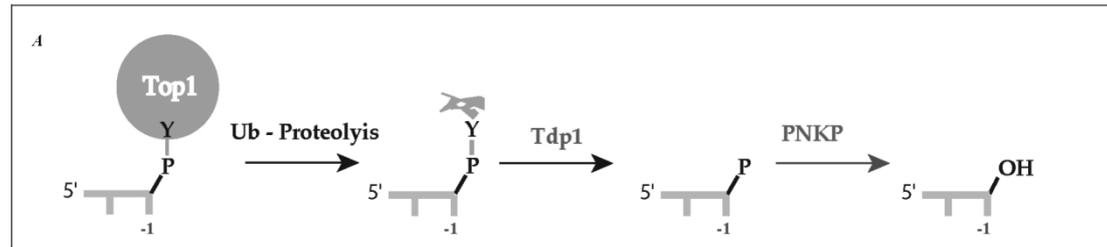


Figura 1.6.2.1: Diagramma delle azioni successive svolte da Tdp1 e PNKP. Tdp1 richiede la degradazione ubiquitina-dipendente della HtopI per rimuovere i complessi di cleavage. Adattato da (Sordet et al., 2003)

Le estremità 3' fosfato generate da Tdp1 devono essere idrolizzate per poter essere utilizzate dalla DNA-polimerasi o dalla ligasi. Questa reazione è promossa sia da PNKP (3'-fosfatasi) (fig. 1.6.2.2) che da un'endonucleasi (Ape1). Nel caso specifico, Ape1 è in grado di rimuovere anche il legame peptidico tagliando il DNA a monte della Top1. Questa ridondanza sembra giustificata dall'azione dell'endonucleasi su substrati non riconosciuti da Tdp1 (cioè privi dei requisiti necessari), (Pouliot et al., 1999; Liu et al. 2002).

In alternativa a questa via esistono altri sistemi di riparo capaci di risolvere tali intermedi, alcuni dei quali presentano una preferenzialità per il substrato simile a quella evidenziata da Tdp1, come nel caso della 3'-endonucleasi del nucleotide excision repair (XPF/ERCC1), (Liu et al. 2002).

Strutture ad *harpin* vengono risolte preferenzialmente dal sistema MNR (Mre11/Rad50/Nbs1), mentre le forche replicative stallate dalla via Eme1 (Bastin-Shanower et al., 2003; Doe et al., 2002).

Molte delle proteine citate sono componenti del base excision repair (BER). Un ruolo particolare, entro questo sistema è svolto da PARP (poly (ADP-ribose) polimerasi), una proteina nucleare contenente un motivo *zinc finger* in grado di rilevare la presenza di rotture a carico del DNA. (Ferro & Olivera, 1984; Kasid et al., 1989; Malanga et al., 2008).

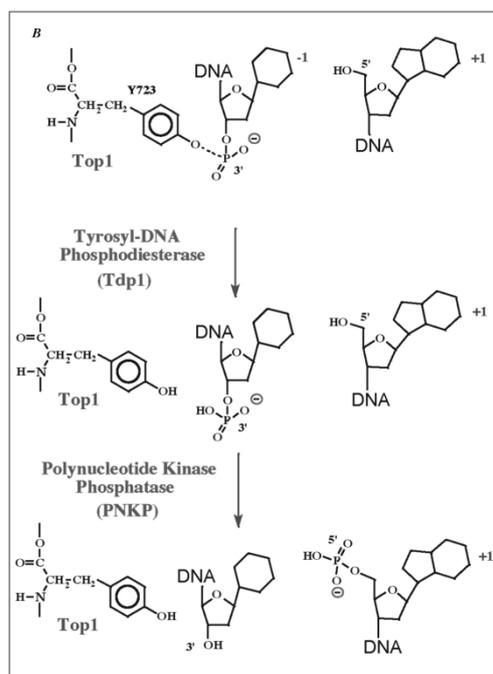


Figura 1.6.2.2.:Schema del meccanismo d'azione di Tdp1.Tdp1 idrolizza il legame tirosil-fosfodiesterico , generando un' estremità tirosil nel peptide della Htop1 e un'estremità 3'-fosfato sul DNA.PNKP può idrolizzare l' estremità 3'-P e fosforillare l' estremità 5'-OH, in questo modo le due estremità divengono il substrato per azione della DNA-polimerasi o ligasi. Adattato da (Sordet et al., 2003)

Il legame di PARP a queste lesioni promuove il trasferimento di un gruppo ADP-ribosio dal NAD⁺ a macromolecole accettrici. Tra questi compaiono enzimi che processano il DNA, la cromatina e PARP stessa. In particolar modo va sottolineato che il ruolo di PARP in questo processo rimane piuttosto controverso, infatti, mentre da sola è in grado di stimolare , per interazione diretta, l'attività della Top1, nella forma poly-ADP ribosilata la inibisce.

1.6.3 Topoisomerase I-induced recombination repair (TIRR)

Tutti i dati sperimentali supportano l' ipotesi secondo cui esiste un meccanismo di riparo mediato dall'azione della stessa Top1. Studi in vitro hanno evidenziato che la presenza di un *cleavage complex* intrappolato è in grado di stimolare il legame di un' altra Top1 a monte del primo taglio (*fig. 1.6.3.1*), (Søe et al, 2003; Søe et al, 2002).

2. Riconoscimento del TCC da parte di una seconda topoisomerasi , a cui consegue il taglio da parte della stessa a monte del primo complesso di cleavage.
3. Il gap generato viene richiuso grazie alla reazione di ricucitura promossa dalla seconda topoisomerasi (nel caso specifico agisce come ligasi o strand transferase).
4. Rilascio della seconda topo isomerasi.

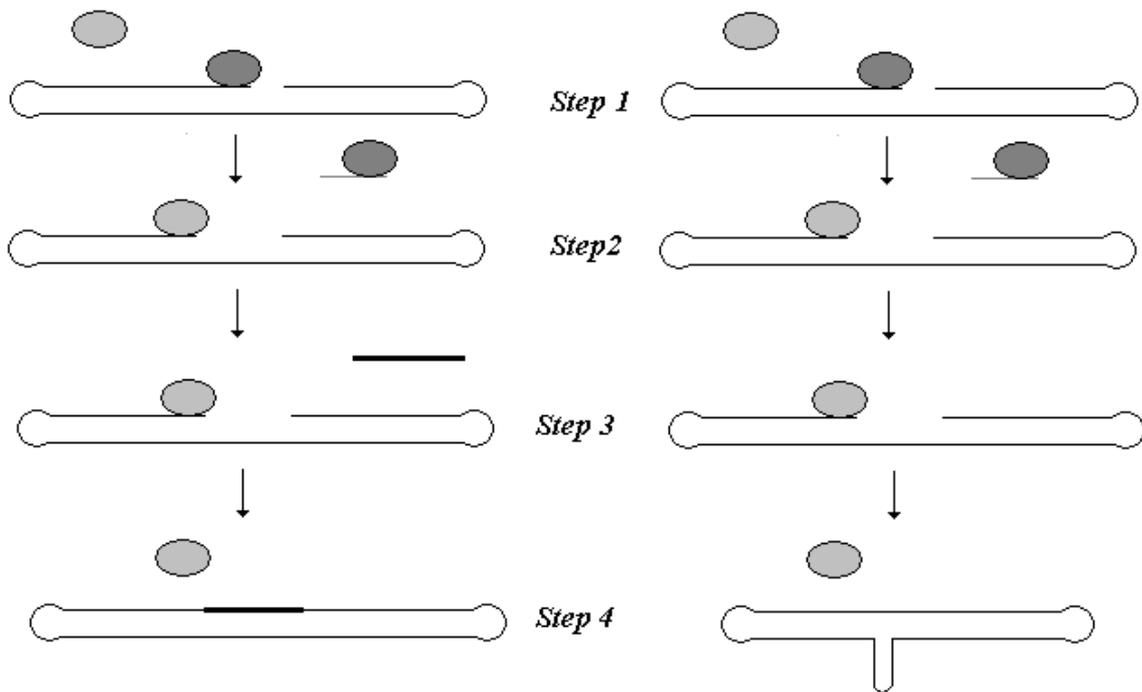


Figura 1.6.3.3. Meccanismo di riparo per ricombinazione promossa dalla topoisomerasi I. Nello schema sono illustrati i due possibili prodotti conseguenti ad eventi di ricombinazione illegittima o delezione.

L'attività della Top1 è stimolata notevolmente da p53 , che agisce aumentando la dissociazione della Top1 dal DNA, inducendo ,probabilmente cambiamenti conformazionali, che favoriscono l'apertura della clamp (Søe et al, 2002; Søe et al, 2003), p53 nella sua forma monomerică è in grado di stimolare l'attività di rilassamento della Top1, ma in questa condizione non è in grado di stimolare il TIRR. Il riparo indotto dalla Top1 è invece promosso da p53 solo se questa è presente in forma tetramerică, e l'attivazione di questa via di riparo sembra strettamente dipendente dalla presenza di p53. (Gobert et al., 1996; Stewart et al., 1996; Stewart et

al., 1996). Questi dati suggeriscono, che la topoisomerasi può svolgere almeno due reazioni distinte dal punto di vista funzionale ma equivalenti a livello biochimico.

In dipendenza del numero di complessi di taglio intrappolati sul DNA, una cellula è in grado di attuare risposte diverse.

Il dato sicuramente più interessante in questo tipo di ipotesi è che la topoisomerasi è in grado di agire sia da sensore che da effettore ,rilevando un meccanismo di regolazione piuttosto complesso.

1.6.4 Processamento delle estremità 5'

Le rotture a doppio filamento generate dalla collisione delle forche replicative con i complessi di taglio intrappolati sul DNA vengono risolte mediante ricombinazione omologa (Rad52/Rad51) o con la riunione non omologa delle estremità (NHEJ Ku/DNA-PK) (fig.1.6.4.1), (Pommier et al., 2003).

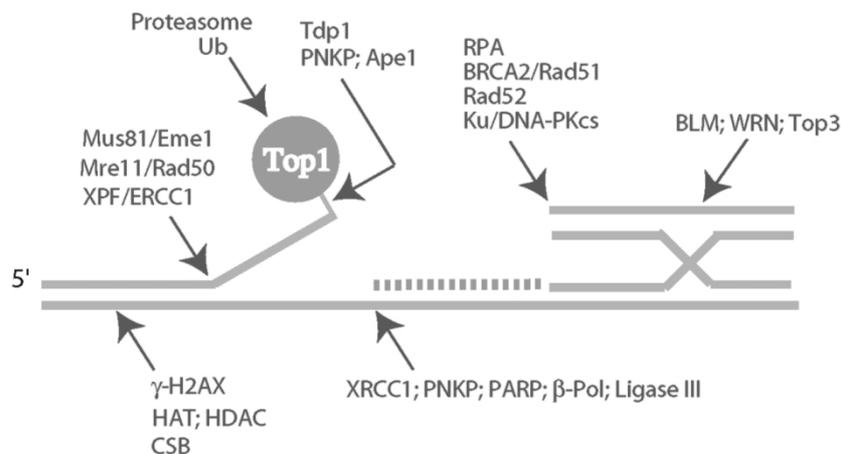


Figura 1.6.4.1 :Rappresentazione schematica dei meccanismi di riparo coinvolti nel riaprire di danni al DNA conseguenti al blocco dei complessi di taglio. Processamento delle estremità 3' ha luogo a seguito dell' azione di Tdp1, PNKP (Ape1), seguita dalla proteolisi ubiquitino-mediata della Top1. Il processamento delle estremità 3' può anche aver luogo mediante l' azione di 3 differenti complessi endonucleasici 3' flap : Rad1/Rad10 (XPF/ERCC1 in uomo), Mre11/Rad50/Xrs2 (Nbs1 è l' ortologo umana di Xrs2), e Mus81/Mms4 (Mus81/Eme1 in humans). Il processamento delle estremità 5' coinvolge sia la ricombinazione omologa (HR)mediata da (BRCA2, RAD52, RAD51), che la ricombinazione non omologa (NHEJ) ad opera di (Ku e DNA-PK). La risoluzione della giunzione di Holliday implica l' azione delle elicasi RecQ (BLM, WRN) in associazione con Top3. Il gap viene annullato dall' azione del sistema BAR (base-excision repair: XRCC1, PNKP, PARP, b-polymerase, ligase III). Il rimodellamento della cromatina implica la modificazione degli istoni (fosforilazione di H2AX (γ -H2AX), acetilazione sotto il controllo dell' acetil-transferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC)). Cockayne syndrome B (CSB) rimodella la cromatina in concomitanza con il riparo e la trascrizione del DNA Adattato da (Sordet et al., 2003)

Dopo la rimozione del complesso di taglio il *gap* generato può essere riparato sfruttando il filamento intatto come stampo per la sintesi del frammento di Okazaki (Michel et al., 2001); mentre la risoluzione delle rotture a doppio filamento ha luogo secondo un processo di ricombinazione omologa.

In alternativa può verificarsi un fenomeno noto come regressione della forca replicativa, che porta all'appaiamento dei filamenti neosintetizzati, con la formazione di una struttura cruciforme (*chickenfoot*). Queste strutture vengono risolte solo dopo la rimozione del complesso di taglio, che può aver luogo o per riallineamento dell'estremità 5'-OH o per azione dei sistemi di riparo. La struttura cruciforme, quindi, va in contro a ricombinazione o viene svolta per azione delle elicasi RecQ (*fig.1.6.4.2*), (Gaymes et al., 2002).

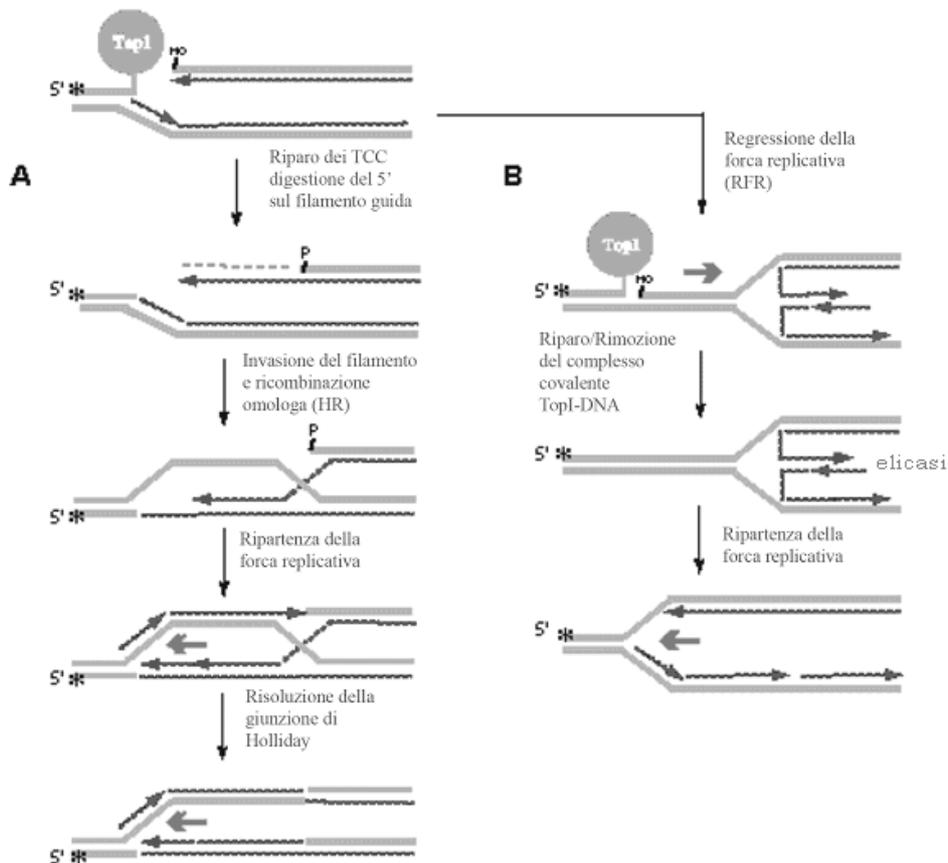


Figura 1.6.4.2: (A) I complessi di cleavage e il filamento guida è rilegato per ripristinare il duplex. L'estremità 5' è digerita portando alla formazione di un tratto 3'ss che è usato come substrato per la ricombinazione omologa. (B) il processo noto come regressione della forca replicativa porta alla formazione di un intermedio analogo alle giunzioni di Holliday poi risolta mediante azione dell'elicasi RecQ e analoghi. Adattato da (Sordet et al., 2003)

1.6.5 Regolazione della Topoisomerasi I umana

La degradazione della Top1 ha luogo in risposta ai blocchi generati durante la trascrizione ma sembra del tutto indipendente rispetto allo stallo delle forche replicative. Nel caso specifico, la collisione di complessi di taglio con la RNA-polimerasi porta ad una degradazione proteosomica dell'enzima, che si verifica a livello nucleare e interessa solo le forme iperfosforilate (Kasid et al., 1989; Pommier et al., 1990; Mao et al., 2002; Mao et al., 2000; Desai et al., 2003).

L'attuazione di questo processo ha come fine, probabilmente, quello di conferire alla cellula una maggiore tolleranza nei confronti della CPT e, al contempo, fornire un substrato adeguato all'azione di Tdp1/PNKP.

La CPT, però, è in grado di promuovere anche la sumolazione della Top1, infatti, la coniugazione dell'enzima con SUMO-1, costituisce un risposta precoce e transiente, attuata dalle cellule nei confronti della CPT e suoi analoghi.

SUMO-1 è una proteina di 11Kda con un similitudine di sequenza del 18% rispetto all'ubiquitina (Mao et al., 2000).

Entrambe le modificazioni hanno luogo presso residui lisina (K117 e K153 sono soggetti a sumolazione nella Top1) e sono indipendenti dalla replicazione del DNA. Mutazioni dei residui K117 e K153, eliminano la sumolazione ma non alterano l'ubiquitinazione della Top1, inoltre, mentre la seconda interessa solo forme iperfosforilate, la coniugazione con SUMO-1 è specifica per quelle defosforilate. La sumolazione non è legata alla degradazione dell'enzima, ma, sembra essere coinvolta nella modulazione sia della localizzazione, che dell'attività dello stesso, infine, la coniugazione della Top1 con SUMO-1 può abrogare completamente il processo di ubiquitinazione. (Seeler & Dejean, 2003; Christensen et al., 2004; Ayaydin & Dasso, 2004; Verger et al., 2003).

Esistono altre modificazione della Top1, che interessano l'attività di questo enzima; , infatti, come già detto p53, in forma monomeric, è in grado di stimolare l'attività di topoisomerizzazione mediante interazione con la regione N-terminale (p53³⁰²⁻³²¹ –core domain 156-653).

Anche c-Abl, è in grado di modulare l'attività della Top1. c-Abl è una tirosin chinasi (TK) finemente regolata che si trova associata a DNA-PK e ATM. La colocalizzazione

di queste tre proteine non è casuale, infatti in presenza di danni a carico del DNA è attivata da queste stesse.

Probabilmente c-Abl contribuisce all'arresto del ciclo cellulare secondo un meccanismo che coinvolge p53 ed è in grado di promuovere la fosforilazione della Top1, stimolandone l'attività.

In particolar modo il dominio SH3 di c-Abl interagisce e lega una regione ricca di proline con una sequenza consenso del tipo XPXXXXPXXP, che nel caso della Top1 è localizzata nel dominio core (PVFAPPYEP 225-233), (Zakian, 1995; Yu et al., 2004).

L'interazione tra c-Abl e la Top1 è completamente indipendente dalla presenza di DNA e si traduce nella fosforilazione della seconda sul residuo Y268 (elica $\alpha 2$ del core subdomain II). Mutazioni di questo residuo sono associate ad una diminuzione della fosforilazione mediata da c-Abl, anche se non la eliminano completamente, indicando la presenza di siti multipli di fosforilazione (Kharbanda et al., 1995; Pourquier & Pommier, 2001).

In accordo con questi risultati la mancata fosforilazione della Top1 si assocerebbe ad un calo della sua attività ed a una diminuzione nella sensibilità alla CPT.

1.7 Il lievito come organismo modello per lo studio della DNA Topoisomerasi IB umana

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un organismo modello ideale per lo studio della DNA Topoisomerasi IB umana. Il genoma di questo organismo è completamente noto e l'elevato grado di ricombinazione omologa consente di integrare frammenti di DNA nel genoma mediante un unico passaggio (Longtine et al., 1998; Papa et al., 1999). Queste caratteristiche permettono di interrompere il *reading frame* di determinati geni impedendo l'espressione di specifiche proteine.

Sono disponibili vettori specifici che possono essere introdotti e mantenuti stabilmente in lievito consentendo l'espressione di proteine poste sotto il controllo di promotori forti costitutivi o inducibili.

Il maggior vantaggio dello studio della DNA Topoisomerasi IB umana in lievito, rispetto ad altri eucarioti superiori, risiede nel fatto che la topoisomerasi I endogena non è essenziale e la sua delezione produce ceppi che non evidenziano particolari condizioni di stress.

Studi genetici hanno chiarito che altri prodotti genici quali la topoisomerasi II e Trf4p compensano le funzioni svolte dalla topoisomerasi I endogena. (Goto & Wang, 1985). I ceppi *wild type*, in genere, sono insensibili all'azione di molti inibitori della Top1 a causa della ridotta permeabilità della parete cellulare. Diversi studi hanno chiarito che il gene *ise1* influenza la permeabilità della parete alle camptotecine; tale sensibilità, inoltre, può essere incrementata mutando geni coinvolti nei *checkpoints* (*rad9*) o nel riparo dei danni a carico del DNA (*rad52*).

Alternativamente un aumento nei livelli di espressione della DNA Topoisomerasi IB, ottenuto usando un promotore GAL4, è sufficiente ad indurre sensibilità alle camptotecine in ceppi *wild type* anche in assenza di mutazioni volte ad aumentare la permeabilità della parete (Bjornsti et al., 1989; Bjornsti et al., 1994).

2 Materiali e Metodi

2.1 Materiali

2.1.1 Ceppi di S. Cerevisiae usati

EKY3 (MAT α , top1::TRP1, trp1 Δ 63, his3 Δ 200, ura3-52, leu2 Δ 1)

JCW28 (Mat α , ura3-52, his3 Δ 200, leu2 Δ 1, trp Δ 63, top2-4, top1 Δ)

2.1.2 Terreni

Terreno minimo selettivo

Per 1 litro di soluzione acquosa:

1,3 g di una miscela composta da: adenina 2,4 g, triptofano 2,4 g, istidina 2,4 g, arginina 2,4 g, metionina 2,4 g, tirosina 3,6 g, leucina 7,2 g, lisina 3,6 g, fenilalanina 6,0 g, treonina 24,0 g

5 g di ammonio solfato

1,7 g di yeast nitrogen base

2 ml di Na OH 1N

Per terreni solidi: aggiunta di 20 g di agar

In presenza di CPT: aggiunta di 24 ml HEPES 1M pH 7,5

Ura^{glu}: terreno minimo selettivo in presenza di glucosio 2%

Ura^{gal}: terreno minimo selettivo in presenza di galattosio 2%

YPD glu

Per 1 litro di soluzione acquosa:

10 g di estratto di lievito

20 g di peptone

20 g di glucosio

Per terreni solidi: aggiunta di 20 g di agar

LB

Per 1 litro di soluzione acquosa:

10 g di bacto triptone

5 g di bacto yeast extract

10 g di NaCl

Per terreni solidi: aggiunta di 15 g agar

LB amp

A 1 litro di LB vanno aggiunti 4 ml di ampicillina 25mg/ml

NZY+

Per 1 litro di soluzione acquosa:

10 g di NZ ammina

5 g di estratto di lievito

5 g di NaCl

NaOH fino a pH 7,5

12,5 ml di MgCl₂ 1M

12,5 ml di MgSO₄ 1M

20 ml di glucosio 20%

Tutti i terreni sono stati autoclavati a 121°C per 15 minuti.

2.1.3 Tamponi

TBE

Per 1 litro di soluzione acquosa:

6.05 g di TRIS

3.9 g di acido borico

0.37 g EDTA

pH=8,3

TE

10 mM TRIS-HCl pH=7,5

1mM EDTA

TRIS-HCl

0,5 M TRIS

HCl fino a pH 6,8

Oppure

3M TRIS

HCl fino a pH 8,9

TG

Per 600ml di soluzione acquosa:

9g di TRIS

43,2g di glicina

3g di SDS

NaOH fino a pH 8,8

TEEG

Per un litro di soluzione acquosa:

50 ml di tris 1M

2 ml di EDTA 0,5M

2ml di EGTA 0,5M

100ml di glicerolo al 100%

HCl fino a pH a 7,5

STOP BUFFER (o STOP MIX)

2,5% SDS

25% Ficol 400

0,03% blu di bromofenolo

0,03% xilene cianolo

25mM EDTA

TOPO MIX

20mM Tris pH 7,5

0,1 mM Na₂EDTA

10mM MgCl₂

50µg/ml BSA acetilata

100mMKCl

2.1.4 Farmaci utilizzati

CPT :camptotecina (sigma-aldeich)

2.2 Mutagenesi sito specifica del gene.

I mutanti oggetto di questo studio sono stati realizzati mediante mutagenesi sito-specifica, utilizzando “ QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit”.

I primers di mutagenesi sono stati disegnati in accordo con le indicazioni fornite dal protocollo di mutagenesi:

- Lunghezza degli oligo compresa tra 24 e 45 basi.
- Temperatura di melting pari o superiore a 78°C.
- Mutazione posizionata al centro del primer.
- Sequenza contenente una percentuale minima di GC del 40% e possibilmente presenza di tali basi all’ estremità dello stesso.

Mutanti posizione 729: Thr729Ala, Thr729Pro,Thr729Glu e Thr729Lys

Mutanti regione *hinge*: Pro431Gly,Arg434Cys,Arg434Ala

2.2.1 Trasformazione delle XL10-Gold con prodotto di PCR

Materiali

Cellule XL10-Gold (Quiagene)

β-ME mix

DNA plasmidico

Terreno LB

Piastre LB-Amp

Metodi

1. Trasferire 45 µl di cellule XL10-Gold in tubi sterili precedentemente raffreddati.
2. Aggiungere di 2µl di β-ME mix a ciascuna aliquota di cellule.
3. Ruotare i tubi gentilmente. Incubare le cellule in ghiaccio per 10 min e girare gli stessi gentilmente ogni 2 min.
4. Trasferire 2µl di prodotto di PCR precedentemente trattato con DpnI. Quindi girare gentilmente e incubare per 30 min in ghiaccio.

5. Heat-pulse per 30 sec a 42°C (passaggio critico).
6. Incubare i tubi in ghiaccio per 2 min.
7. Aggiungere 0,5 ml di terreno LB precedentemente riscaldato a 42°C e incubare i tubi per 1 h a 37°C a 225-250 rpm.
8. Piastrare su terreno selettivo LB-Amp.
9. Incubare le piastre per almeno 16h a 37°C.

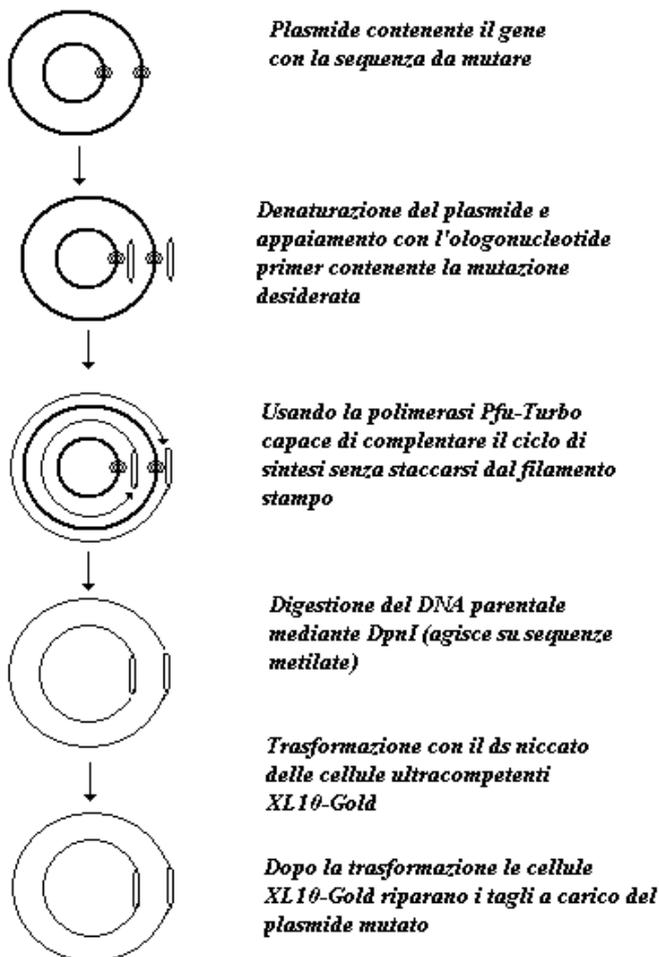


Figura 2.2.1 Schematizzazione del processo di mutagenesi sito-specifica.

2.2.2 Estrazione e controllo del plasmide.

- Crescere le colonie in 5 ml di terreno LB-Amp overnight
- Estrarre il plasmide mediante miniprep

- Controllare il plasmide estratto mediante analisi di restrizione (BamHI ClaI)
- Sequenziamento delle colonie positive alla restrizione.

2.3 Trasformazioni di ceppi di lievito con il plasmide YCp

Materiali

LiOAc SOLUTION 1X : TE 1X (10mM Tris pH 7.5 , 1mM EDTA), 0.1M LiOAc.

PEG SOLUTION: TE 1X , 0.1M LiOAc, 40% PEG.

DNA salmon sperm (Sigma).

Terreno YPD

glucosio 20%

DNA plasmidico

Metodi

1. Crescere le cellule in terreno YPD-glu2% sino al raggiungimento di OD₆₀₀ compreso tra 0.8 e 3 (le cellule devono trovarsi in fase di crescita logaritmica).
2. Centrifugare per 10min a 2200 rpm.
3. Risospendere il pellet in LiOAc solution ottenendo un volume finale pari a 1/4 di quello iniziale.
4. Centrifugare per 10 min a 2200 rpm.
5. Risospendere il pellet in LiOAc solution ottenendo un volume finale pari a 1/100 di quello iniziale.
6. Utilizzare 100 µl delle cellule risospese per ogni trasformazione.
7. Aggiungere ad ogni aliquota di cellule 150µg di DNA salmon sperm e 2γ di DNA da trasformare (1γ = 1000 ng /µl).
8. Aggiungere 350µl di PEG solution ad ogni provetta .
9. Incubare per 30 min a 30° C in leggera agitazione.
10. Heat shock per 15 sec a 42 ° C
11. Spinnare per 30 sec e risospendere il precipitato in 100 µl di surnatante.
12. Piastrare su terreno selettivo
13. Crescere per 3-4 giorni a 30 ° C.

2.3.1 Plasmidi utilizzati

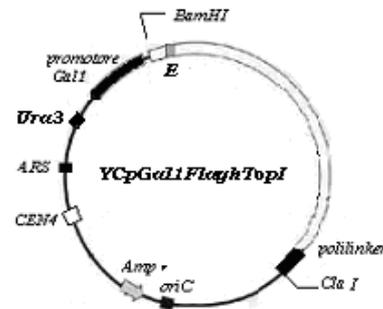
I ceppi di lievito utilizzati in questo studio sono deleti del gene della topoisomerasi I, quindi possono essere trasformati con vettori di espressione, che consentano un'espressione inducibile del gene della topoisomerasi I umana.

In questo studio è stato utilizzato un vettore *shuttle* entrambi contenente :

- origine di replicazione batterica (oriC) e marker selezionabile per crescita in batteri (Amp^r).
- Marker selezionabile per lievito (URA3).
- Promotore inducibile per espressione in lievito (Gal1).

Vettore YCpGAL1-flagHtopI a copia singola contenente:

- origine di replicazione per lievito (ARS).
- sequenza centromerica derivata dal lievito (CEN4).



2.3.2 Spot Test

Materiali

Ceppi di lievito trasformati con opportuni plasmidi

Terreno ura⁻

Glucosio 20%

Piastre ura⁻glu, ura⁻glu-drug, ura⁻gal, ura⁻gal-drug

Metodi

Questo test consente di analizzare la vitalità di ceppi di lievito trasformati con diversi plasmidi, valutando la capacità degli stessi di formare colonie in presenza o meno di veleni selettivi.

Spottando aliquote serialmente diluite su piastre contenenti diverse concentrazioni del farmaco, si può stabilire, in modo semi-quantitativo, la dose di veleno capace di indurre citotossicità.

1. Piccare singole colonie di lieviti trasformati in 5ml di ura⁻ glu2% e crescere overnight a 30°C.
2. Misurare OD₆₀₀ e diluire ottenendo una soluzione con OD₆₀₀ pari a 0.3.
3. Effettuare tre diluizioni seriali di un fattore 10.
4. Aliquotare 5 µl di ciascuna soluzione su piastre ura⁻glu2%, ura⁻glu2%-drug ura⁻gal2% e ura⁻gal2%-drug. Nel caso specifico si sono utilizzate le seguenti concentrazioni per la CPT: 0,05γ , 0,1γ , 0,5γ, 1γ e 5γ (tab.2)
5. Lasciare asciugare le piastre e incubare per 3-4 giorni a 30°C.

Tabella n°2 :Conversione delle concentrazioni µg/ml in molarità.

	PM	0,05γ	0,1γ	0,5γ	1γ	5γ
CPT	348,36	0,14µM	0.28µM	1.4µM	2.8µM	14.3µM

2.4 Purificazione della proteina

Materiali

Lieviti *S.Cerevisiae* EKY-3

Tubi Oak Ridge da 35 ml

Bottiglie per centrifuga da 250 ml

Colonne Biorad Poly-prep (2 ml)

Resina Fosfocellulosa P11 (Whatman)

Resina Anti-flag (Sigma-Aldreich)

Complete Protease Inhibitor cocktail (Roche molecular biochemicals)

Ammonio Solfato

TEEG 1X

Metodi

Trasformare il ceppo EKY-3 con i plasmidi di interesse (YCpWT e YCpT729A)

1. Piccare 3-5 colonie in 15 ml di ura⁻glu²% e crescere overnight a 30°C.
2. Misurare OD₆₀₀ delle culture se è compreso tra 0.8 e 3.0 diluire le stesse di un fattore 1/1000 in terreno ura⁻raffinosisio²%. In questo modo ci si assicura che tutto il glucosio presente in soluzione venga metabolizzato prima dell' induzione con galattosio.
3. Crescere a 30°C e misurare OD della coltura se pari a 1 indurre aggiungendo 1/10 del volume di gal²%.
4. Dopo 8 h centrifugare a 2500g ,4°C per 15 min.
5. Pesare il pellet e risospendere lo stesso in 2ml per g di cellule di TEEG 1X, contenente 1X sodio fluoruro, 1X sodio bisolfito e 1X inibitore proteasi *complete* (si tratta di una miscela di inibitori di proteasi ad ampio spettro capace di inibire, soprattutto, serin- e cistein-proteasi di cui il lievito è ricco).
6. Prelevare 15 ml del pellet risospeso e a questo aggiungere 7 ml di beads. Per rompere la parete dei lieviti sottoporre la miscela così ottenuta a 30 cicli di vorticazione della durata di 30 sec, ciascuno dei quali deve essere intervallato da 30 sec di refrigerazione in ghiaccio.

7. Centrifugare il lisato cellulare a 15000 rpm, 4°C per 30min.
8. Aggiungere al surnatante (o estratto crudo contenente la proteina di interesse) 0,516 gr per ml di Ammonio Solfato.,in modo da ottenereuna soluzione satura all' 80% (si determina il *salting out* della proteina , che verrà a trovarsi nel pellet).Lasciare in agitazione tutta la notte sul *rocker*.
9. Centrifugare a 15000rpm ,4°C per 30 min.
10. Risospendere il pellet in TEEG 1X contenente inibitori mediante agitazione sul *rocker*.

2.4.1 Preparazione della colonna di fosfocellulosa e caricamento del campione

SI caricano 2 ml di resina , precedentemente risospesa in potassio solfato e conservata a 4°C, su una colonnina Biorad poly-prep. Dopo averla lasciata decantare la si equilibrarla con una soluzione di TEEG1X 200mM KCl.

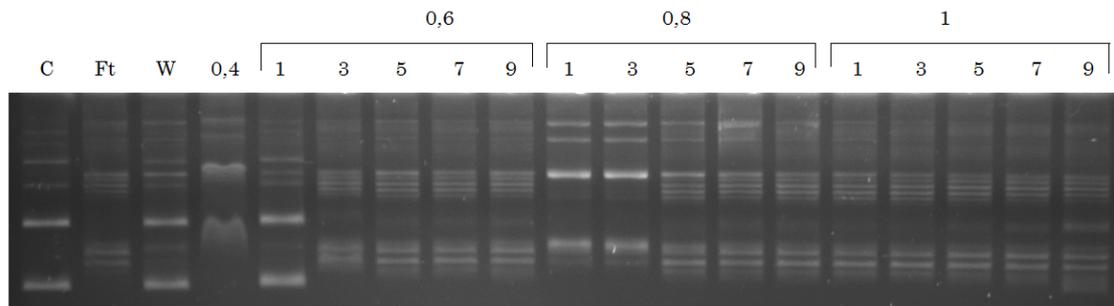
L' attacco della proteina allo scambiatore ionico è possibile solo se questa possiede una forza ionica inferiore rispetto al tampone con cui si è equilibrata la resina.

Quindi, si misura la conduttanza del tampone di equilibrazione e del pellet risospeso.

Il campione da caricare viene, perciò, diluito utilizzando una soluzione di TEEG 1X , addizionato di inibitori, affinché la sua conduttanza risulti inferiore rispetto alla soluzione di equilibrazione.Dopo aver caricato il campione si prepara una soluzione tampone TEEG 1X 200mM KCl (wash), che viene caricata in colonna con lo scopo di consentire il distacco di componenti aspecifiche , presenti nell'estratto crudo. Si procede con la preparazione di un gradiente salino discontinuo (200mM, 400mM, 600mM, 800mM e 1M KCl), che consente di distaccare la proteina (intorno agli 800mM).

L' eluato di ciascun tampone viene raccolto in frazioni di 1ml a cui viene aggiunto 1ml di glicerolo 100% autoclavato, in modo da ottenere una soluzione finale al 50%. Per consentire l' omogeneizzazione dell' eluato con il glicerolo le frazioni vengono lasciate in agitazione sul *rocker* tutta la notte. Le varie frazioni sono testate , mediante saggio di rilassamento per individuare il picco di eluizione (*fig.2.4.1.1*).

I campioni risultati positivi sono stati uniti tra di loro e diluiti di un fattore $\frac{1}{2}$ con TEEG 1X, addizionato di inibitori (in modo da ottenere una soluzione con conduttanza pari a quella di una soluzione TEEG 1X 150mM KCl).



Figura

2.4.1.1 Saggio di rilassamento sulle frazioni eluite dallo scambiatore ionico. Le frazioni raccolte per ogni punto del gradiente discontinuo sono state testate alternativamente.

La soluzione, quindi, è caricata su una colonna anti-flag . In questo modo, infatti, sfruttando la presenza del peptide flag, posto all' N-terminale della proteina, è possibile separare la stessa, dagli altri componenti, mediante cromatografia per affinità. L' eluizione del campione caricato in colonna è effettuata mediante TEEG 150mM KCl 150ng/μl di competitore. L' eluato è raccolto in frazioni da 1ml a cui è aggiunto glicerolo per ottenere una concentrazione finale volume/volume pari al 50%. I campioni, poi, sono testati, mediante saggio di rilassamento (*fig2.4.1.2*).

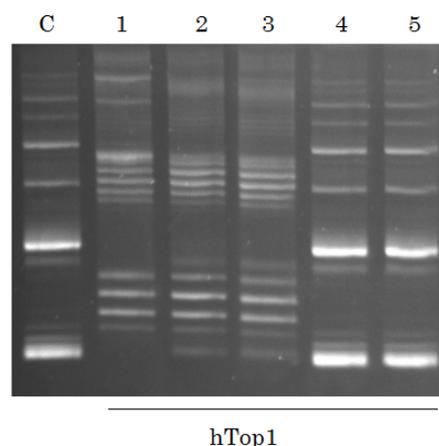


Figura 2.4.1.2 Saggio di rilassamento sulle frazione eluite mediante cromatografia per affinità (resina anti-flag)

Le aliquote che presentano maggiore attività sono analizzate mediante SDS PAGE e Western Blot.

2.4.2 SDS PAGE

I campioni positivi al saggio di rilassamento sono analizzati mediante SDS PAGE in modo da stimare la concentrazione relativa dei mutanti rispetto al WT. In questo modo, inoltre, è possibile valutare la procedura di purificazione in base alla capacità di separare la proteina d'interesse dalle altre presenti nell'estratto cellulare.

Materiali

Soluzione 29.2% acrilammide, 0.8% bis-acrilammide

Running gel buffer: 0.4% SDS, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8.

Stacking gel buffer: 0.4% SDS, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8.

TG: 0.1% SDS, 0.192 M glicina, 0.025M Tris, pH 8.8.

Ammonio per solfato 10%

N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TEMED)

Tampone di solubilizzazione : 5% SDS, 20% glicerolo, 5% 2 β -ME, 0.01% blu bromofenolo, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8.

Metodi

Si preparano due gel ognuno contenete una parte inferiore nota come running gel in cui avrà luogo la corsa delle proteine, e una superiore nota come stacking gel, in cui si verifica la compressione delle bande. Lo stacking gel (acrilammide 4%, pH 6.8) ha lo scopo di concentrare le proteine presenti nel campione all'interfaccia con il running. Le proteine, rivestite di SDS, si concentreranno all'interfaccia stacking-running in volume minore rispetto a quello caricato. Nel running gel le proteine migreranno in base alla loro mobilità relativa. Su ciascun gel sono stati caricati 10 μ l e 20 μ l sia dei mutanti (T729A e E418K) che della proteina WT. I campioni sono stati portati a un volume finale di 50 μ l aggiungendo acqua e tampone di solubilizzazione. Infine, prima di essere caricati sono stati bolliti per 5 min, al fine di consentire la completa denaturazione della proteina, e centrifugati. I gel sono stati corsi per circa 2h applicando una differenza di potenziale pari a 20mA. Uno dei due gel viene colorato con Comassie Brilliant Blue mentre l'altro è analizzato mediante Western Blot.

2.4.3 Colorazione con Comassie Brilliant Blue

Materiali

Soluzione di colorazione: 0.2% Comassie Brilliant Blue

7,5% acido acetico

50% etanolo

Soluzione di decolorazione: 7.5% acido acetico

50% etanolo.

Metodi

Si immerge il gel di poliacrilamide nella soluzione di colorazione lasciandolo in agitazione per circa 2h. Quindi lo si sciacqua con acqua distillata e si aggiunge la soluzione di decolorazione lasciandolo in agitazione si quando non si raggiunge un rapporto ottimale tra bande e rumore di fondo.

2.4.4 Western Blot

Materiali

Gel di poliacrilamide

Carta assorbente 3MM (Whatman)

Nitrocellulosa (Amersham)

Transfer buffer 1X : Tris 25 mM

Glicina 192mM

pH 8.2

Metanolo 20% (aggiunto fresco)

Latte al 3% ottenuto sciogliendo 1.5 g di latte in polvere in 50 ml di TBS-T

TBS: 50mM Tris, pH 7.6

150mM NaCl

TBS-T: TBS + 0.05% Tween-20 (500µl/L)

ANTI-FLAG M2-Alkaline Phosphatase Conjugate (1mg/ml) diluito 1/10000 in TBS(Sigma).

Soluzione rilevatrice *BCIP/NBT-blue liquid substrate system* (Sigma)

Metodi

Il gel viene rimosso dai vetri e adagiato su due fogli di carta 3MM precedentemente imbevuti con transfer buffer, sopra viene posta la membrana di nitrocellulosa e altri due fogli di carta assorbente. Il sandwich viene trasferito in un apparato per Western Blot verticale, a cui è applicata una differenza di potenziale di 35V per 8h. Il campo elettrico trasversale al sandwich forza le proteine a migrare fuori dal gel verso la membrana di nitrocellulosa su cui aderiscono. Finito il trasferimento la nitrocellulosa è lavata con acqua deionizzata e incubata con latte scremato per 90 min. Poiché sulla membrana rimangono dei siti liberi, ricoprendola con una miscela di proteine non specifiche (latte) se ne assicura la saturazione, minimizzando l'attacco aspecifico degli anticorpi alla nitrocellulosa. Si effettuano tre lavaggi di 15 min con TBS-T, necessari per rimuovere il latte in eccesso. La membrana, quindi, è incubata per 2 h con anticorpo M2, coniugato con la fosfatasi alcalina, che riconosce in modo specifico l'octapeptide FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) fuso all' N-terminale della proteina. La nitrocellulosa, quindi, è lavata tre volte per 15 min con TBS-T e poi ricoperta con la soluzione rilevatrice BCIP/NTB (*fig 2.4.4.1*).

Questa contiene un substrato della fosfatasi alcalina (BCIP, 5-bromo-4-cloro-3-indosil fosfato di sodio) e un reagente che facilita la reazione cromogena (NTB nitro blu tetrazolo cloruro). Il risultato della reazione è la formazione di un precipitato blu scuro prodotto dall'idrolisi del fosfato del BCIP. Ovviamente questo metodo consente di rilevare in modo specifico la proteina WT e il mutante solo nel caso in cui non si sia verificata una completa degradazione del dominio N-terminale.

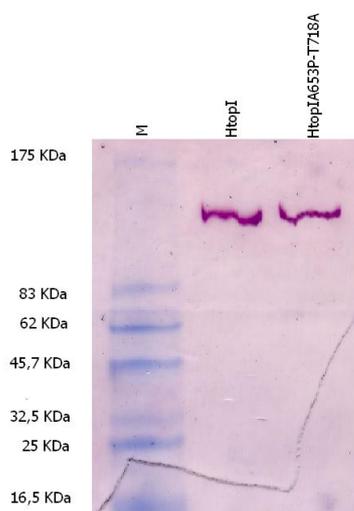


Figura 2.4.4.1 Western blot della proteina WT e del doppio mutante *htopA653P-T718A*.

2.5 Definizione dell'attività specifica del mutante

In base alle indicazioni fornite dal Western Blot si normalizza il rapporto tra i mutanti e il WT in modo da utilizzare la stessa quantità di proteina. Si effettua, quindi, un saggio di rilassamento in diluizione seriale : 1/1, 1/10, 1/100.

2.5.1 Saggio di rilassamento

Materiali

Soluzione Topo mix 10X

Soluzione di bromuro di etidio (1mg/ml BioRad)

Soluzione 1M KCl sterile

Soluzione di DNA plasmidico pHC624

Soluzione di Stop mix 5X

Gel di agarosio all' 1% TBE 1X

Metodi

Per valutare l'attività di un aliquota di proteina si effettua un saggio di rilassamento di DNA plasmidico. Utilizzando come substrato un plasmide completamente superavvolto negativamente, si può valutare l'attività di topoisomerizzazione analizzando il substrato dopo l'interazione con la topoisomerasi. In questo modo, mediante elettroforesi su gel di agarosio, è possibile visualizzare i vari topoisomerasi in funzione del volume idrodinamico, caratteristico di ciascuna popolazione cellulare. La reazione in questione può essere condotta in eccesso di substrato o eccesso di proteina.

2.5.2 Saggi in eccesso di DNA

Si prepara una miscela di reazione contenente 5 μ l di DNA, Topo mix, KCl 1M (concentrazione finale della soluzione 150mM KCl), DMSO e 18 μ l di proteina, in modo da ottenere un rapporto DNA:Topo 3:1.

La reazione è incubata a 37°C. Sono stati prelevati 30µl dalla miscela a tempi diversi (30", 1',2',4',8',15',30") bloccati mediante aggiunta di 2.5 µl di SDS 10%. Ad ogni campione sono stati aggiunti 7.5µl di Stop mix 5X. La reazione è stata condotta in parallelo per le proteine mutanti e quella wt .I campioni sono stati caricati su un gel di agarosio all' 1% TBE 1X corso per 4h a 100V.

Il gel è stato immerso in una soluzione acquosa contenente etidio bromuro (1µg/ml) e lasciato in agitazione a colorare. Dopo circa 30 min il gel è stato estratto e fotografato.

2.5.3 Saggi in eccesso di proteina

Si prepara una miscela di reazione contenente 5γ di DNA, Topo mix, KCl 1M (concentrazione finale della soluzione 150mM KCl), DMSO e 54µl di proteina, in modo da ottenere un rapporto DNA:Topo 1:3.

La reazione è incubata a 37°C. Sono stati prelevati 30µl dalla miscela a tempi diversi (4",8",15",30",60",120",240",480") bloccati mediante aggiunta di 2.5 µl di SDS 10%. Infine, ad ogni campione sono stati aggiunti 7.5µl di Stop mix 5X.La reazione è stata condotta in parallelo per le proteine mutanti e quella WT. I campioni sono stati caricati su un gel di agarosio all' 1% TBE 1X corso per 4h a 100V.

Il gel è stato immerso in una soluzione acquosa contenente etidio bromuro (1µg/ml) e lasciato in agitazione a colorare. Dopo circa 30 min il gel è stato estratto e fotografato.

2.5.4 Saggi in eccesso di proteina digestione con PK

I campioni sono trattati mediante aggiunta di 1µl di protenasi k(5mg/ml) per 30 min a 37°C e poi estratte con fenolo cloroformio.

Infine, ad ogni campione sono stati aggiunti 7.5µl di Stop mix 5X.La reazione è stata condotta in parallelo per le proteine mutanti e quella WT. I campioni sono stati caricati su un gel di agarosio all' 1% TBE 1X corso per 4h a 100V.

Il gel è stato immerso in una soluzione acquosa contenente etidio bromuro (1µg/ml) e lasciato in agitazione a colorare. Dopo circa 30 min il gel è stato estratto e fotografato.

2.6 Saggio di taglio

Il saggio di taglio su substrato lineare consente, grazie all'uso di denaturanti come l'SDS, di intrappolare gli intermedi di reazione e visualizzarli. Infatti i prodotti di cleavage possono essere risolti mediante corsa in gel denaturante grazie alla marcatura selettiva del substrato al 3' con ^{32}P . L'intensità relativa delle bande può essere determinata attraverso esposizione di lastre impressionabili per raggi X.

2.6.1 Preparazione del substrato lineare

Materiali

pBlueScriptAK3-1

AseI(5 μl , 10U/ μl ,New England Biolabs)

NE Buffer 3: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ditiotreitolo, pH7.9

SspI (5 μl , 10U/ μl ,New England Biolabs)

NE Buffer SspI: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 0.025% TritonX-100, pH 7.5

Etanolo 100% e 70%

Sodio acetato 3M pH 5.6

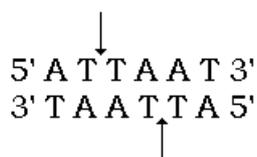
T7 sequenasi (13U/ μl USB)

Fenolo Cloroformio (Sigma)

Gel loading buffer 10X

Metodi

1. Digerire 10 μg di pBlueScriptAK3-1 con l'enzima AseI, in tampone NE buffer3 (volume finale 200 μl) per 120 min a 37°C. Il prodotto di reazione è costituito da tre frammenti prodotti dal taglio in corrispondenza della sequenza:



- Trattare con 10 U di T7 sequenasi dopo aver aggiunto alla miscela dGTP, dCTP, dTTP e 50 μ Ci di dATP α^{32} P. Incubare per 15 min a 37 °C



- Estrarre il DNA linearizzato mediante aggiunta alla soluzione di un uguale volume di fenolo cloroformio (200 μ l).
- Centrifugare per 10 min a 13000 rpm.
- Prendere il surnatante e precipitarlo mediante aggiunta di 1/10 del volume di sodio acetato 3M, tRNA, 3 volumi di Et-OH 100% (overnight a -20°C o 30 min a -80 °C).
- Centrifugare 20 min a 13000rpm. Lavare il pellet con 150 μ l di Et-OH 70% e lasciare asciugare.
- Risospendere in NEBuffer SspI, H₂O e digerire con SspI per 120 min a 37°C.
- Precipitare la reazione mediante aggiunta di 1/10 del volume di sodio acetato 3M, tRNA, 3 volumi di Et-OH 100% (overnight a -20°C o 30 min a -80 °C).
- Centrifugare per 20 min a 13000 rpm, lavare il pellet con Et-OH 70%.
- Risospendere il pellet in 30 μ l di *gel loading buffer* e acqua.
- Caricare i campioni in un gel di poliacrilamide 5% non denaturante e correre per circa 2 h a 800 V.
- Rimuovere il gel dall'apparato di elettroforesi, disporlo in una cassetta schermata e impressionare una lastra per raggi X (30-60 sec).
- Dopo aver sviluppato la lastra e individuato la banda, tagliarla e incubarla insieme a 1 ml di sodio acetato 3M tutta la notte a 37°C in leggera agitazione (impressionare una seconda lastra per verificare la correttezza dell'estrazione), (*fig 2.6.1.1*)
- Centrifugare per 10 min a 13000 rpm, quindi precipitare.
- Centrifugare per 20 min a 13000 rpm, lavare con Et-OH 70%. Lasciar asciugare il *pellet*. Misurare al β -counter.

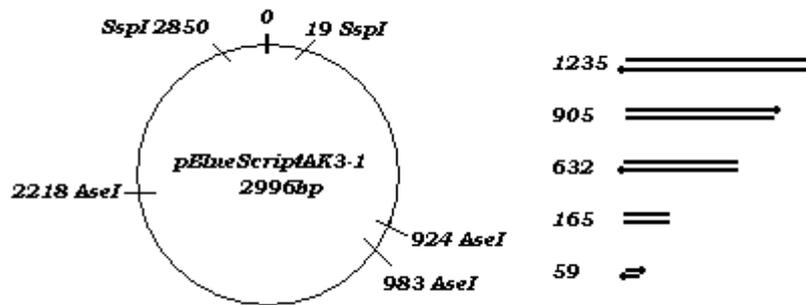


Figura 2.6.1.1 : Il plasmide pBlueScriptAK3-1 e il suo prodotto di restrizione e marcatura.

Miscela gel di estrazione

- 12.5 ml acrilamide 40%
- 10 ml TBE 10X
- 77.5 ml H₂O
- 400µl APS 10%
- 150µl TEMED

2.6.2 Reazione di taglio

Si prepara una miscela di reazione contenente 5000 cpm di substrato (circa 10-50 ng di DNA), in presenza di KCl per ottenere una soluzione 50 mM KCl, DMSO, CPT per un volume finale di 50µl.

Metodi

1. Incubare per 30 min a 37°.
2. Bloccare mediante aggiunta di 5µl di SDS 10%.
3. Incubare per 10 min a 75°.
4. Aggiungere 1µl di PK (5mg/ml) per 15 min a 37°.
5. Precipitare aggiungendo 1µl tRNA(10mg/ml), 1/10 del volume di sodio acetato 3M, 2.5 volumi di Et-OH 100%. Lasciare tutta la notte a -20°.
6. Centrifugare per 30 min a 13000 rpm, lavare con Et-OH 70% e lasciare asciugare il *pellet*.
7. Risospendere il *pellet* in 5µl di acqua e µl di Stop Solution (USB).

8. Incubare per 5 min a 95° e centrifugare
9. Caricare in un gel denaturante di poliacrilamide all' 8%.
10. Correre a 45Watt per circa 1,5 h.
11. Asciugare il gel e depositare in una cassetta piombata .Esporre su di una lastra a raggi X per almeno 12 h.

Miscela gel denaturante acrilammide 8%

20ml acrilamide 40% (

48 g UREA

10 ml TBE 10X

acqua sino a volume finale di 100 ml

20µl TEMED

400 µl di APS 10%.

2.7 Saggio di Riligazione

2.7.1 Preparazione substrato

Materiali

Oligonucleotidi CP 25(Sigma)

CL 14(Sigma)

R 11 (Sigma)

dATP γ -³²P (Amersham).

dATP(Sigma).

T4 polynucleotide kinase (USB).

10X Kinase Buffer: 500mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM MgCl₂ e 20mM dithiothreitol.

Colonnine Sephadex G50 (Amersham).

Metodi

CP 14 marcatura calda

1. Preparare una soluzione contenente 10 pmol dell' oligo CP14 , 20 U di polinucleotide china si T4, 5 μ l di polinucleotide chinasi buffer e 5 μ l di dATP γ -³²P.
2. Incubare per 30 min a 37°C.
3. Bloccare la reazione incubandola per 10 min a 65°C.
4. Purificare l' oligonucleotide marcato su colonnina Sephadex G50 mediante centrifugazione per 1min a 3600 rpm.

CL25 marcatura fredda

1. Preparare una soluzione contenente 10 pmol dell' oligo CL25 , 20 U di polinucleotide china si T4, 5 μ l di polinucleotide chinasi buffer e 5 μ l di dATP.
2. Incubare per 30 min a 37°C.
3. Bloccare la reazione incubandola per 10 min a 65°C.
4. Purificare l' oligonucleotide marcato su colonnina Sephadex G50 mediante centrifugazione per 1min a 3600 rpm.

Incubare entrambe le miscele per 5 min a 95°C quindi unire le due soluzioni e lasciarle per 1 h a temperatura ambiente. Conservare a 4°C.

2.7.2 Cinetica di Riligazione

1. Preparare una miscela contenente 10µl del substrato, KCl per una concentrazione finale 150mM, Topo mix e proteina. Lasciare per 1 h a temperatura ambiente.
2. Aggiungere 2,1µl di R11 100µM e farmaci o DMSO (concentrazione finale 50µM).
3. Incubare a 37°C e prelevare 5µl a tempi definiti (30", 1',2',4',8',15'30') bloccando con 1µl di SDS 10% per 10 min a 70°C.
4. Precipitare aggiungendo 1µl tRNA(10mg/ml),1/10 del volume di sodio acetato 3M, 2.5 volumi di Et-OH 100%. Lasciare tutta la notte a -20°C.
5. Centrifugare per 30 min a 13000 rpm, lavare con Et-OH 70% e lasciare asciugare il *pellet*.
6. Risospendere il *pellet* in 5µl di acqua e µl di Stop Solution (USB).
7. Incubare per 5 min a 95° e centrifugare.
8. Caricare in un gel denaturante di poliacrilammide all' 20%.
9. Correre a 20mA per circa 1 h.
10. Asciugare il gel e depositare in una cassetta piombata .Esporre su di una lastra a raggi X per almeno 12 h.

Miscela gel denaturante acrilammide 20%

25ml acrilamide 40% (
24 g UREA
5 ml TBE 10X
acqua sino a volume finale di 50 ml
10µl TEMED
300 µl di APS 10%.

2.7.3 Suicide Cleavage Assay

Materiali

Oligonucleotide 52-bp

5'GCTATACGAATTCGCTATAATTCATATGATAGCGGATCCAAAAAAGACTTAG-3'

Oligonucleotide 100-bp:

3'CGATATGCTTAAGCGATATTAAGTATACTATCGCCTAGGTTTTTTCTGAATCTTTTTTTTTTCGAATTCGTTGTATACCATAGCAGCCTTAAGTTACTC-5'

Oligonucleotide 50-bp:

5'AGAAAAAAAAAAGCTTAAGCAACATATGGTATCGTCGGAATTCAATGAG-3'

dATP γ -³²P (Amersham).

dATP(Sigma).

T4 polynucleotide kinase (USB).

10X Kinase Buffer: 500mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM MgCl₂ e 20mM dithiothreitol.

Colonnine Sephadex G50 (Amersham).

L'oligonucleotide 52-bp è marcato radio attivamente ,mentre gli oligonucleotidi 100-bp e 50bp sono marcati freddi secondo i protocolli descritti per la marcatura del CL14 e CP25.

I tre oligonucleotidi sono annilati secondo i seguenti rapporti molari 2:3:1rispettivamente per 100nt:52nt:50nt in una soluzione 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, e 1 mM DTT e successivamente incubati per 5 min a 95°C in modo da favorirne la denaturazione. L' annealing dei tre filamenti, in modo per formare il substrato *total annealed*, è realizzato facendo raffreddare overnight la soluzione a temperatura ambiente.

1. Preparare una miscela contenente 10 μ l del substrato, KCl per una concentrazione finale 50mM, Topo mix e proteina. Incubare a 25 °C.
2. Prelevare 10 μ l a tempi definiti (30", 1',2',4',8',15'30") bloccando con 1 μ l di SDS 10% per 10 min a 75°C.
3. Precipitare metà delle aliquote prelevate (5 μ l) aggiungendo 1 μ l tRNA(10mg/ml),1/10 del volume di sodio acetato 3M, 2.5 volumi di Et-OH 100%.

Lasciare tutta la notte a -20°C. Quindi risolvere i prodotti in un gel 7 M Urea-12% acrilamide.

4. Alla seconda metà dei campioni aggiungere 2,5 µl di loading buffer (156 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 25% glycerol, 12.5% mercaptoethanol, 0.0025 % bromphenol blue), bollirli per 5 min e caricare 10 µl di ciascun campione in un gel SDS-PAGE Tricina 10%.
5. I prodotti di reazione sono visualizzati usando il PhosphorImager(R) STORM820.

2.7.4 Religation Assays

Sono utilizzati gli stessi oligonucleotidi impiegati nel *Suicide Cleavage Assay*. L'oligonucleotide 50 bp non viene fosforilato all'estremità 5', in modo che possa essere utilizzato nella fase di riligazione. La reazione viene condotta come descritto precedentemente. Le aliquote ,prelevate a diversi tempi e bloccate mediante aggiunta di SDS 0,5% e incubazione per 10 min a 75°C, sono risolte in un gel 7M Urea 16% acrilamide TBE 1X.

2.8 Saggio di attività in vivo

2.8.1 Trasformazione dei lieviti , estrazione e corsa del DNA

Materiali

Soluzione di Toluene(20 mM TRIS pH 8.0; 95% etanolo; 3% toluene; 10 mM EDTA);

Buffer TE;

Spheroplasting media (1M sorbitolo; 100 mM TRIS pH 8.8; 20 mM EDTA; 0.1% β -mercaptoetanol);

1 mg/ml Yeast lytic enzyme ICN. Gli ultimo due componenti sono aggiunti prima di usare la soluzione).

Metodi

In questo esperimento viene utilizzato un ceppo di lievito contenente l'enzima topoisomerasi II temperatura-sensibile e deleto per la topoisomerasi I endogena (JCW28 and KLY1), La topo isomerasi IB umana viene aggiunta mediante trasformazione con plasmide contenente il gene Top1. I trasformanti sono selezionati su terreno ura-, trp-glucosio 2% e 5-6 colonie sono inoculate in 100 ml di terreno liquido ura-trp-glu overnight a 26°C. In seguito le colture sono diluite ad OD₆₀₀ 0.1-0.5 in terreno liquido ura-trp-raffinosio2% ed incubate a 26°C. Una volta raggiunto l'OD₆₀₀ pari a 1,2 viene indotta l'espressione del gene Top1 mediante aggiunta di galattosio sino a raggiungimento di una concentrazione finale pari al 2%.Dopo 5 ore ciascuna coltura viene divisa in due frazioni da 55ml. Una frazione è incubata a 26°C mentre l'altra a 35°C. Dopo 3 ore la crescita cellulare viene interrotta mediante aggiunta di 1ml di soluzione di toluene (conservata a 20°C). Le cellule possono essere conservate senza alcuna alterazione nello stato topologico del DNA. Le cellule vengono centrifugate per 8 min a 3000 rpm e il surnatante viene rimosso. Si procede al lavaggio del pellet con 5 ml di TE e quindi alla risospensione in 1 ml di spheroplasting media. Le sospensioni vengono trasferite in eppendorf ed incubate per 1 ora a 37°C in agitazione. Si procede alla centrifugazione per 5 min a 5000 rpm, il surnatante viene rimosso ed il pellet risospeso in 300 μ l di TE. Vengono aggiunti 30 μ l di SDS 10% e dopo 5 min a temperatura ambiente vengono aggiunti 200 μ l di potassio acetato 2,5 M

(pH6). Dopo aver mescolato gentilmente le sospensioni sono centrifugate per 5 min a 15000 rpm e a ciascun surnatante viene aggiunto 1,2 ml di etanolo al 100%.

I campioni vengono incubati per 10 min a -20°C ed in seguito centrifugati per 10 min a 15000 rpm a 4°C. Ciascun pellet viene lavato con 1 ml di etanolo al 70% e risospeso in 100 µl di TE -Rnase (100 mg di RNase in 1 ml di TE 1X). Dopo un'incubazione di 30 min a temperatura ambiente, i campioni sono precipitati con sodio acetato 3M (1/10 volume), 1µl tRNA ed etanolo 100% (2,5 volumi). I campioni vengono incubati per 15 a -20°C e centrifugati per 10 min a 14000 rpm. Il surnatante viene rimosso e al pellet è aggiunto 1 ml di etanolo al 70%. Dopo 5 min di incubazione a temperatura ambiente i campioni vengono centrifugati per 5 min a 14000 rpm, il surnatante viene rimosso e al pellet vengono aggiunti 200 µl di TE e 200µl di fenolo cloroformio. I campioni vengono sottoposti all'azione del vortex e poi centrifugati per 10 min a 14000 rpm. La fase acquosa (superiore) viene prelevata e precipitata con etanolo. In seguito i campioni sono risospesi in un volume finali pari a 20µl di TE.

Viene preparato un gel di agarosio all' 1% (TBE 2X) contenente cloroquina ad una concentrazione finale pari a 0,6 mg/ml. Il buffer per la prima corsa elettroforetica (TBE 2X) contiene cloroquina (0,6 mg/ml). Circa 5-6µl di ciascun campione vengono caricati e corsi per 20 ore a 35V. Il buffer per la seconda corsa è il TBE2X contenente cloroquina ad una concentrazione finale di 3mg/ml. Il gel è lasciato a colorare per 3 ore nel secondo buffer di corsa e poi trasferito nell'apparato di elettroforesi ruotato di 90° rispetto alla direzione della prima corsa. La seconda corsa è effettuata per 20 ore a 20-30 V.

2.8.2 Southern blot

Soluzioni stock

20X SSC (per 2 litri: 351 g NaCl e 176.4 g tri-sodium-citrate, pH 7)

150 ml *Church buffer* (75 ml 1 M pH 7.5 bufferfosfato; 1.5 g 1% w/v BSA; 37.5 ml dH₂O; 37.5 ml 20% SDS)

soluzione di lavaggio a bassa stringenza (per 500 ml: 20 ml 1M buffer fosfato, 125 ml 20% SDS, 355ml dH₂O)

soluzione di lavaggio ad alta stringenza (per 500 ml: 20 ml 1M buffer fosfato, 25 ml 20% SDS, 455ml dH₂O)

Materiali

Amersham® Hybond®- N+ membrane

Carta 3MM® Whatman®

Hoefer® UVC500 UV-crosslinker

Amersham® hybridization mesh

Amersham® hybridization bottle

Amersham® Megaprime™ DNA Labeling System, dNTP

Amersham® a 32P dATP (3000 Ci/mmol)

Metodi

Dopo la corsa il gel è trattato secondo il seguente protocollo:

1. Lavare con dH₂O per 5 min (temperatura ambiente).
2. Incubare con 0.25 M HCl 2 x 15 min (t.a.).
3. Risciacquare con dH₂O per 5 min (t.a.).
4. Denaturazione 1.5 M NaCl + 0.5 M NaOH 2 x 20 min (t.a.).
5. Lavare con dH₂O per 5 min (t.a.).
6. Neutralizzazione 1 M Tris, pH 8 + 1.5 M NaCl 2 x 20 minutes (t.a.).
7. Risciacquare con dH₂O per 5 min (t.a.).

Per settare l' apparato di trasferimento per il Southern blot , sei strati di carta 3MM Whatman® vengono tagliati ed imbevuti in buffer SSC 6X. Tutti i fogli di carta usati in seguito sono stati imbevuti nella stessa soluzione.

Del buffer SSC 10X è versato in una bacinella, una piastra di vetro è posta sopra ortogonalmente. Viene ritagliata una lunga striscia di carta 3MM e le estremità inserite entro il buffer SSC. In seguito viene adagiato sopra il gel, la membrana Hybond® (precedentemente imbevuta in buffer 6X SSC), strisce di Parafilm® (una per lato), utilizzate per isolare il blot, tre fogli di carta 3MM (posizionati sopra la membrana Hybond®), carta assorbente (circa 30 fogli), una piastra di vetro di supporto e infine un peso (circa 700 gr). Il trasferimento ha luogo in circa 8 ore. La

superficie superiore della membrana viene contrassegnata e viene utilizzato un crosslinker (Hoefer® UVC500 UV) per immobilizzare il DNA sulla superficie della membrana Hybond® (2 trattamenti per 700 mJ/cm²). La membrana viene arrotolata ed inserita in un tubo di ibridazione. All'interno vengono versati 25 ml di buffer Church precedentemente scaldato e il tubo viene fatto ruotare per circa 30 min a 65°C. Questo passaggio di pre-ibridazione viene ripetuto più volte. La sonda viene preparata aggiungendo 5 ml di DNA 10ng/ml a 5 ml di una soluzione primer (Amersham® Megaprime™ DNA Labeling System kit). La mix viene scaldata per 5 min a 95°C al fine di indurre la denaturazione del DNA. Dopo una rapida centrifugazione sono aggiunti i seguenti componenti 4 µl dGTP, 4 µl dCTP, 4 µl dTTP, 5 µl reaction buffer, 21 µl di H₂O e 2 µl DNA polimerasi. Infine, dopo una rapida centrifugazione sono aggiunti 5 µl [³²P] dATP e la soluzione è incubata per 20 min a 37°C. La reazione di polimerizzazione viene bloccata aggiungendo 2 µl 0.5 M EDTA. Per separare la sonda dai nucleotidi non polimerizzati la soluzione è caricata su una colonnina G-50 (an Amersham® G-50 spin column) e centrifugata per 2 min a 3000 rpm. Il probe viene quindi denaturato incubandolo per 5 min a 95°C e poi trasferendolo in ghiaccio. Dopo 15 min di lavaggio con buffer church (65°C) la sonda è inserita nella bottiglia e la reazione di ibridazione è incubata overnight a 65°C. Vengono effettuati quattro lavaggi a bassa stringenza (ciascuno con 25 ml di soluzione a bassa stringenza) due per 30min a temperatura ambiente e due per 30 min a 60°C. Infine viene effettuato un lavaggio ad alta stringenza per 30 min a 60°C con 25 ml di soluzione ad alta stringenza. I prodotti di reazione sono visualizzati usando il PhosphorImager(R) STORM820.

2.9 Saggio di Binding (filter binding)

Materiali

Oligonucleotide 100 bp FW

5'GCTATCGAATTCGCTATAATTCATATGATAGCGGATCCAAAAAAGACTTAGAA
AAAAAAAAGCTTAAGCAACATATGGTATCCGGAATTCAAT-3'

Oligonucleotide 100 bp RE

5'ATTGAACCGGATACCATATGTTGCTTAAGCTTTTTTTTTTTTTCTAAGTCTTTT
TTTGATCCGCTATCATATGAATTATAGCGAATTCGATAGC-3'

dATP γ -³²P (Amersham).

dATP(Sigma).

T4 polynucleotide kinase (USB).

10X Kinase Buffer: 500mM Tris-HCl, pH 7.6, 100mM MgCl₂ e 20mM dithiothreitol.

Colonnine Sephadex G50 (Amersham).

Binding Buffer [20mM Tris (pH 7.5),10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 50 mg/ml gelatin
e 1mM β -mercaptoetanol],

Colonnine per micro-centrifuga in cellulose acetate con filtro di nitrocellulose del
diametro di 6 mm (porosità 0.45 mm) (Micron Separations Inc.,USA)

Metodi

La marcatura calda (100 bp FW) e fredda (100 bp RE) viene effettuata secondo il
protocollo precedentemente descritto per i substrati di religation

I due filamenti sono annilati con rapporto molare 1:1, in una soluzione 100mMNaCl,
1mMEDTA e 1mMDTT. Il substrato viene incubato per 5 min a 95°C (denaturazione)
e poi lasciato raffreddare a temperatura ambiente (annealing).

1. Incubare quantità crescenti della proteina WT e dei mutanti (0-5 pmol) in
100 μ l di binding buffer, 150 mM KCl contenente 20000 cpm (50-100 fmol di
substrato marcato) per 5 min a temperatura ambiente.
2. Effettuare un pre-lavaggio delle colonnine con 100 μ l di *salmon sperm
solution* (100 mg/ml) per ridurre il legame aspecifico del DNA al filtro.

3. Caricare il campione al centro della colonnina e centrifugare per 1 min a 6000 rpm (2800g).
4. Effettuare un lavaggio con 100µl di binding buffer 200 mM KCl.
5. Contare in scintillatore liquido sia il DNA eluito che quello trattenuto dal filtro. La percentuale di binding è stimata come rapporto tra (c.p.m filtro)/[(c.p.m filtro)+(c.p.m eluato)].

Nel controllo negativo la percentuale delle conte si aggira intorno all' 1-2%. Il legame delle proteine al filtro va verificato mediante immunoblot.

3 Scopo della tesi

L'analisi delle strutture cristallografiche della Top1 ha consentito di spiegare il comportamento di molti mutanti che mostrano resistenza alla CPT e suoi analoghi.

Alcune di queste mutazioni sono localizzate vicino al sito attivo o nella tasca di legame della CPT. In questi casi la resistenza è dovuta alla soppressione di interazioni tra farmaco e enzima o, in alternativa, ad alterazioni strutturali nella tasca di legame. In altri casi, mutazioni collocate distanti dal sito attivo o dal putativo sito di legame del farmaco (Stacker et al., 2002) sono in grado di indurre resistenza in quanto capaci di modificare la dinamica delle interazioni stabilite tra CPT e Top1, come nel caso del mutante A653P (*fig. 3.1.B*). La mutazione A653P, situata nella regione linker è stata isolata nel nostro laboratorio (Fiorani et al., 2003). Predizioni di dinamica molecolare, uniti a esperimenti di biochimica, hanno dimostrato che la destrutturazione di questa porzione si associa ad un aumento dello spazio visitato dalle sue fluttuazioni, provocando lo spostamento dell'equilibrio della reazione verso la riligazione. Questo cambiamento si traduce in un calo del tempo di vita dell'intermedio covalente che limita la possibilità della CPT di permanere nel suo sito di attività. Nel nostro laboratorio è stato isolato e caratterizzato anche un altro mutante il T718A, situato nel dominio C-terminale, che presenta un comportamento opposto rispetto a quello esibito dal mutante A653P. Questo mutante se espresso in lievito o cellule umane induce un drastico calo della vitalità dovuto ad uno spostamento dell'equilibrio della reazione verso il taglio (*fig. 3.1.A*).

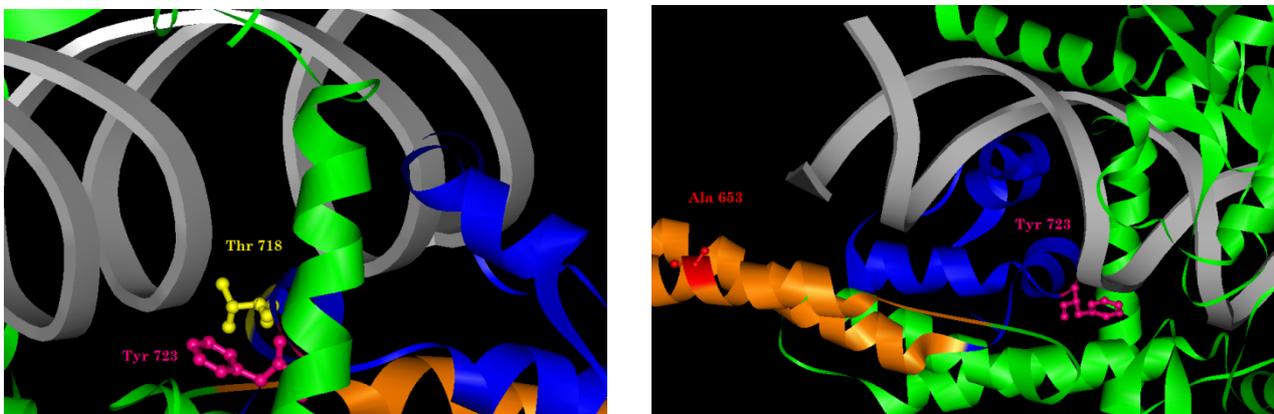


Figura 3.1. Struttura della hTop1. (A) Struttura della Top1 in cui sono evidenziati il residuo Thr718 (giallo) e la Tyr 723 (fucsia). (B) Struttura della Top1 in cui sono evidenziati il residuo Ala 653 (rosso) e la Tyr 723 (fucsia).

Tale alterazione causa una riduzione del tasso di riligazione e induce un fenotipo camptotecina-simile. (Fioranti et al., 1999) Studi strutturali e funzionali forniscono scarse evidenze sul fatto che la flessibilità del dominio linker possa condizionare la geometria del sito attivo influenzando sia l'attività catalitica che la resistenza alla CPT della Top1. Per verificare questa ipotesi abbiamo realizzato un doppio mutante (htopA653P-T718A) al fine di riscontrare se l'aumento nel tasso di riligazione, tipico del mutante A653P, fosse in grado di revertire il fenotipo camptotecina-simile causato dalla mutazione T718A (*fig. 3.2*). Scopo di questa tesi è la caratterizzazione biochimica e strutturale del doppio mutante htopA653P-T718A (DM) sia in relazione alla sua attività catalitica che alla sensibilità alla CPT. (Losasso et al., 2007).

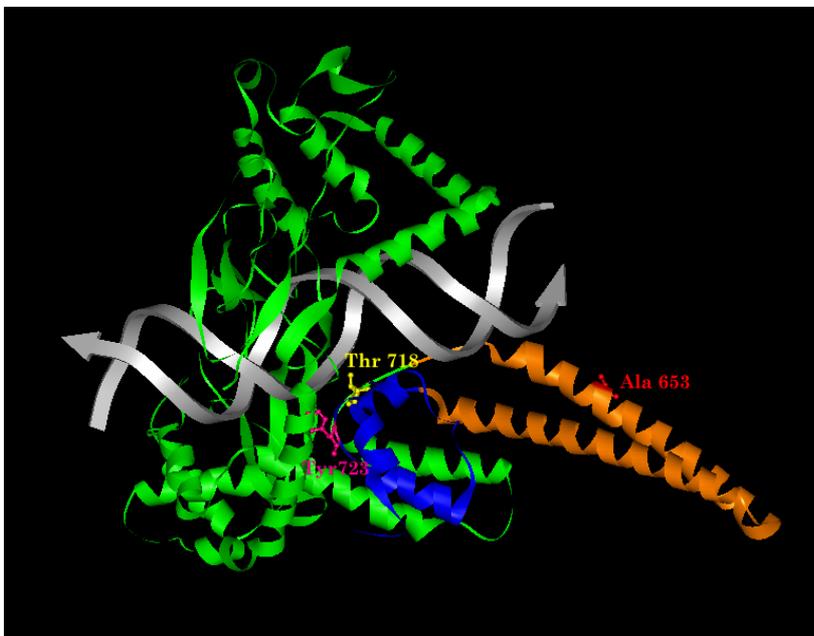


Figura 3.2 Struttura della Top1. Rappresentazione della DNA topoisomerasi I umana in cui sono evidenziati i residui Thr 718 (giallo), Ala 653(rosso) e la Tyr catalitica 723(fucsia).

La posizione del dominio linker rispetto al sito attivo è controllata da interazioni stabilite tra dominio C-terminale (α -elica 21) e core(α -eliche 17 e 18). La soppressione di queste interazioni può determinare un cambiamento nella posizione relativa dei singoli domini alterando l'attività catalitica e la sensibilità agli inibitori. La Thr 729, collocata al centro dell' α -elica 21, stabilisce alcune interazioni con i residui del core contribuendo, insieme a questi e al dominio linker, alla formazione di un *cluster idrofobico* cruciale per l'interazione con il substrato e per la sensibilità alle CPTs. La mutazioni di questo residuo in alanina (T729A) è stato isolata in cellule tumorali (PC-7/CPT), che evidenziano resistenza nei confronti del CPT-11 (analogo della CPT) di un

fattore compreso tra 5 e 10 rispetto alle parentali (PC-7) (fig.3.3), (Kanzawa et al., 1990; Kubota et al., 1992).

Nonostante questi amminoacidi non siano direttamente coinvolti nell'interazione con la CPT, essendo la DNA topoisomerasi I umana un' enzima estremamente flessibile e cooperativo, è possibile che alterazioni strutturali in domini distanti dalla tirosina catalitica, esercitino il loro effetto sul sito attivo.

E' noto, infatti, che interazioni a lunga distanza risultino fondamentali nel determinare la cinetica delle fasi di taglio e riligazione così come la sensibilità alla CPT (Cretaio et al.,2007; Losasso et al., 2007).

Il mutante T729A se espresso in lievito non risulta resistente alla CPT e presenta un fenotipo simile a quello dell' enzima WT. Per chiarire il ruolo svolto dalla Thr 729 nel ciclo catalitico e nella sensibilità agli inibitori della Top1 sono stati realizzati altri tre mutanti:T729P, T729K e T729E. Queste sostituzioni sono state scelte rispettivamente per la capacità di alterare la struttura elicoidale (T729P) e per quella di modificare il bilancio elettrostatico della regione in questione (T729E eT729K). Ulteriore scopo di questi tesi è la caratterizzazione *in vivo* e *in vitro* di questi mutanti (Losasso et al., 2008).

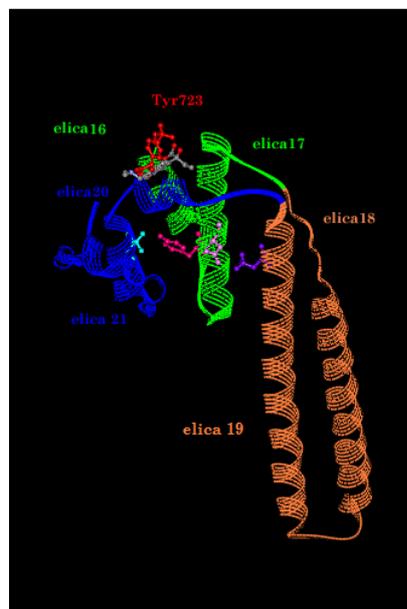
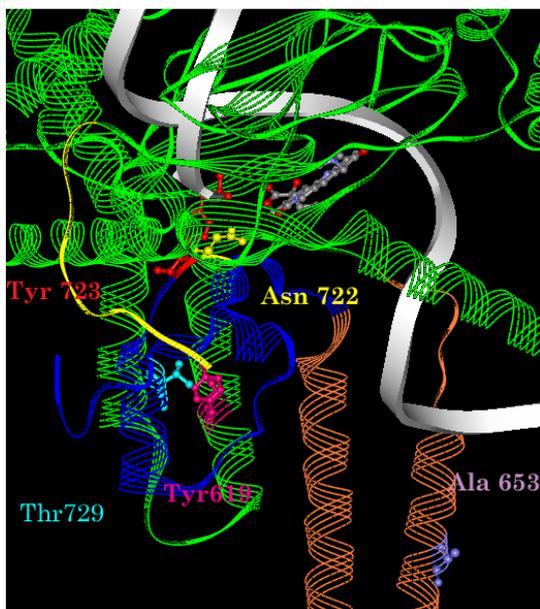


Figura3.3 Struttura della Top1. (A) Rappresentazione della regione C-terminale.Sono evidenziati i residui Thr 729 (azzurro),Tyr 619 (magenta),Asn 722 (giallo). (B) Rappresentazione del cluster idrofobico presenti nella regione C-terminale, in particolar è evidenziata l' α -elica 21 (C-terminale), α -elica 16 e 17 (Core) e le α -eliche 18 e 19 (linker)

La Top1 agisce chiudendosi come una tenaglia intorno al DNA per far questo è necessario che la proteina si apra per consentendo l'ingresso del substrato entro la cavità enzimatica ed, in seguito all' azione di topoisomerizzazione, passi dalla

conformazione chiusa a quella aperta al fine di rilasciare il DNA. Perché ciò abbia luogo è richiesta la presenza di un perno che Stacker et al, nell' analisi della struttura cristallografica, hanno individuato nel residuo Pro431. Recentemente alcuni lavori di dinamica molecolare hanno ipotizzato che la Top1 possieda un diverso meccanismo di rilassamento per substrati di segno opposto (Sari L et al., 2005).

In particolare il rilassamento dei superavvolgimenti positivi coinvolgerebbe la regione delle "lips", che si allontanerebbero di circa 10-14 Å passando da una conformazione chiusa ad una parzialmente aperta. Il rilassamento dei superavvolgimenti negativi, invece, interesserebbe l'α- elica dell' *hinge* che si allungherebbe di circa 12 Å per consentire la rotazione del DNA entro una cavità enzimatica che rimane comunque chiusa. (Sari L et al., 2005). La struttura cristallografica più completa per la Top1 (1K4T e 1K4S) presenta 14 residui appartenenti al dominio N-terminale, che si trovano vicino alla regione *hinge* (429-436)(fig.3.4). La prossimità dei residui del dominio N-terminale all' α-elica del perno consente di ipotizzare un coinvolgimento di questa regione nel rilassamento dei superavvolgimenti negativi. In questo contesto la Pro 431 e l'Arg 434 (fig.3.4) potrebbero avere un ruolo chiave nel favorire un corretto ripiegamento della regione che consenta di preservare le interazioni elettrostatiche esistenti tra l'*hinge* e le altre parti della proteina.

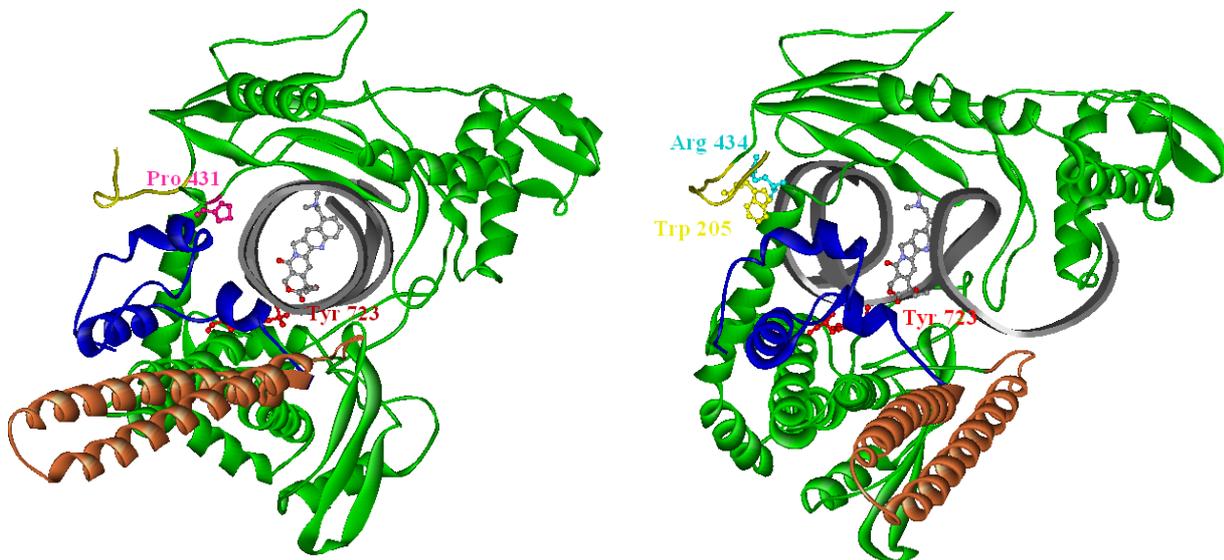


Figura 3.4. Struttura della Top1. Rappresentazione della struttura enzimatica in cui sono evidenziati i residui Arg434 (azzurro), Trp205(giallo),Pro431(fucsia,) e Tyr 723 (rosso). La regione N-terminale è visualizzata in giallo, il core in verde, il dominio linker in arancio e la regione C-terminale in blu.

Al fine di indagare l'azione svolta dalla regione *hinge* abbiamo in primo luogo mutato il residuo Pro 431 in Gly, inserendo un aminoacido privo di catena laterale, per

verificare se mutazioni a carico dell' ipotetico perno possano influenzare e o alterare l' attività catalitica. Il residuo Arg 434, situato all'apice dell' α -elica dell' *hinge*, è vicino al Trp205. Tale prossimità potrebbe indicare la presenza di interazioni tra il dominio N-terminale ed il perno.

Le mutazioni dell' Arg 434 in Ala (R432A) o in Cys (R434C), dovrebbero alterare le interazione elettrostatiche che si stabiliscono tra questo residuo e il Trp205. Le sostituzioni sono state scelte, nel caso dell' alanina per alterare l' intorno chimico sia in termini sterici che elettrostatici, mentre per quanto riguarda la cisteina, per la capacità di formare ponti disolfuro. Dopo la caratterizzazione del singolo mutante R434C verrà prodotto il doppio mutante htop1W205C-R434C inducendo la formazione di un legame covalente capace di ancorare il dominio N-terminale alla regione perno. L'analisi del comportamento di questi mutanti, in presenza o meno della regione N-terminale, potrà fornire importanti informazioni sul ruolo svolto da questo dominio nel controllo dell'attività enzimatica.

Scopo di questo lavoro è lo studio preliminare dei singoli mutanti htop1P431G, htop1P431G-70, htop1R434A, htop1R434A-70, htop1R434C e htop1R434C-70 al fine di valutare se le mutazioni introdotte siano capaci di alterare l'attività catalitica dell' enzima.

4 Risultati

4.1 Risultati del doppio mutante *htopA653P-T718A*

4.1.1 Clonaggio del gene *htopA653P-T718A*

Il gene *htopA653P-T718A* è stato clonato in un vettore per l'espressione di proteine in lievito che presenta modalità di replicazione a singola copia. In questo modo è possibile studiare l'espressione basale del gene d'interesse e valutarne il fenotipo in ceppi di lievito deleti per il gene della topoisomerasi I endogena. Il gene è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore inducibile GAL4, in modo da attivarne l'espressione a piacimento.

4.1.2 Spot test

L'espressione dei mutanti della topoisomerasi umana *htop1A653P*, *htop1T718A* e *htop1A653P-T718A* sotto il controllo del promotore inducibile GAL4 consente di ottenere importanti indicazioni sulla vitalità e la sensibilità alla CPT. Il lievito *S. cerevisiae* deleto del gene che codifica per la topoisomerasi I endogena risulta resistente alla CPT (Knab et al., 1993). Di conseguenza, perché si manifesti citotossicità è necessaria l'espressione di una topoisomerasi esogena.

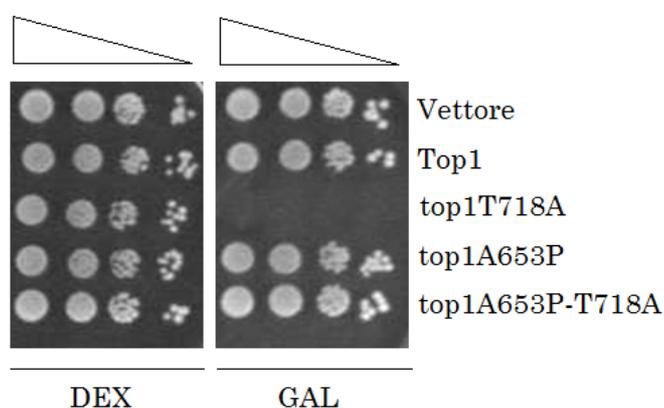


Figura 4.1.2.1 Spot test. Saggi in vivo condotti su terreno solido *ura-dex* e *ura-gal*. Il mutante *T718A* presenta un fenotipo letale, il mutante *A653P* è vitale, il doppio mutante *A653P-T718A* è vitale. La mutazione situata nel dominio linker reverte il fenotipo letale indotto dalla mutazione situata nel dominio C-terminale.

Dopo la trasformazione in cellule EKY3 (MAT α , top1::TRP1, trp1 Δ 63, his3 Δ 200, ura3-52, leu2 Δ 1), le colonie ottenute sono state fatte crescere su terreno solido contenente glucosio e replicate su terreno contenente galattosio. Come si può vedere in *fig.4.1.2.1*, la presenza di colonie nelle piastre ura-glu e ura-gal dimostra che il mutante A653P e il doppio mutante A653P-T718A sono vitali, mentre il singolo mutante T718A induce un drastico calo nella vitalità se espresso in questo sistema. Quindi la mutazione situata nel dominio linker reverte il fenotipo letale provocato dalla mutazione T718A producendo un doppio mutante vitale. Per comprendere il comportamento del DM in termini di resistenza o sensibilità alla CPT sono stati condotti una serie di saggi di vitalità utilizzando come terreno di crescita piastre ura-glu e ura-gal contenenti diverse concentrazioni di farmaco.

I risultati dimostrano che il doppio mutante top1A653P-T718A è resistente alla CPT in quanto capace di formare colonie su piastre contenenti l' inibitore in concentrazioni pari a 5 μ g/ml. In queste condizioni il doppio mutante presenta un tipo di crescita del tutto paragonabile a quella del singolo mutante A653P (*fig.4.1.2.2*).

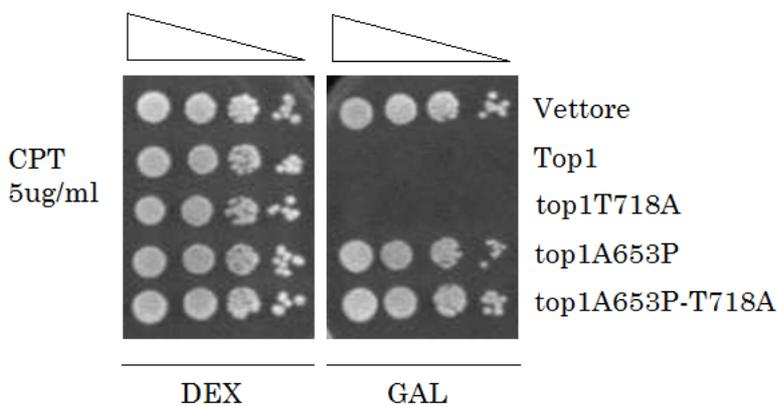


Figura 4.1.2.2 Spot test in presenza di CPT. Saggi *in vivo* condotti su terreno solido ura-dex e ura-gal in presenza di CPT 5 μ g/ml. Il mutante T718A presenta un fenotipo letale, il mutante A653P è resistente alla CPT, il doppio mutante A653P-T718A è resistente alla CPT. Il doppio mutante mantiene la resistenza alla CPT presentando un tipo di crescita paragonabile a quella del singolo mutante A653P.

La capacità di crescere in presenza di CPT è tipica di enzimi resistenti all' azione dell' inibitore o inattivi. Per valutare l'attività del doppio mutante *in vivo* sono stati condotti dei saggi di attività *in vivo* usando il ceppo JCW28.

4.1.3 Saggio di attività *in vivo* -gel 2D

Il saggio viene condotto nel ceppo di lievito JCW28 caratterizzato dalla presenza della topoisomerasi II endogena temperatura sensibile e dalla delezione del gene endogeno della topoisomerasi I. Il ceppo viene cotrasformato con due vettori: il primo (YE ρ)

contiene il gene per la topA batterica espresso a partire da un promotore costitutivo, il secondo (YCp) contiene il gene per la topoisomerasi IB umana sotto il controllo del promotore inducibile GAL4. Il mantenimento dei due plasmidi entro i trasformanti è garantito dalla presenza di una doppia selezione auxotrofa: il gene TRP per il plasmide YEp ed il gene URA per il vettore YCp.

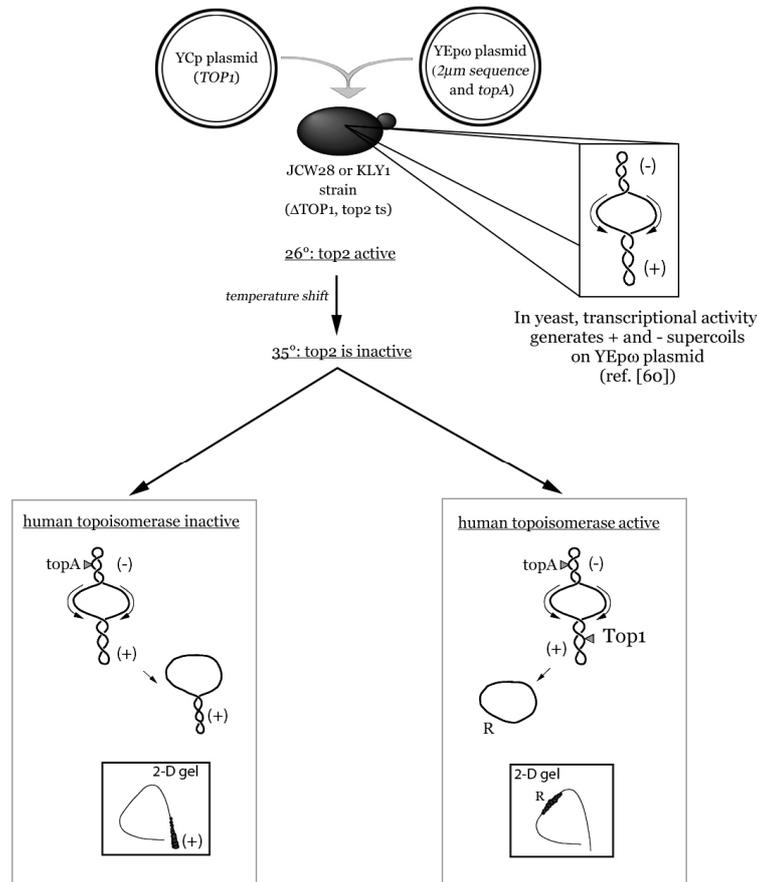


Figura 4.1.3.1. Rappresentazione schematica dell' esperimento di gel 2D. Il ceppo JCW28 costrasformato con i vettori YCp e YEp prima è cresciuto a temperatura permissiva (26°C), poi dopo aver cambiato la temperatura di crescita (35°C) il DNA è estratto ed analizzato in gel di agarosio bidimensionale

La trascrizione a partire dal promotore $2\mu m$ genera superavvolgimenti negativi e positivi. In condizioni di temperatura permissive (26°C) la topoisomerasi II è in grado di rimuovere gli stress torsionali generati dal processo trascrizionale. Quando i lieviti vengono fatti crescere in condizioni di temperatura non permissive (35°C) l'attività della topoisomerasi II viene persa. In assenza di una Top1 attiva i superavvolgimenti saranno rimossi per azione della *topA* batterica, che è in grado di rilassare solo superavvolgimenti negativi causando un accumulo di superavvolgimenti positivi (fig.4.1.3.1). Se viene espressa anche una Top1 cataliticamente attiva questa rimuoverà i superavvolgimenti positivi causando uno spostamento del segnale verso i

rilassati presenti sull'arco (*fig.4.1.3.1 e 4.1.3.2*). Il DNA estratto viene analizzato mediante elettroforesi bidimensionale su gel di agarosio. La corsa nella prima dimensione separa i diversi topo isomeri presenti nella miscela in base al grado di superavvolgimento senza discriminare tra superavvolgimenti di segno opposto. La corsa nella seconda dimensione, invece, consente di distinguere superavvolgimenti positivi e negativi permettendo di analizzare l'attività della Top1 e dei mutanti top1A653P e top1A653P-T718A.

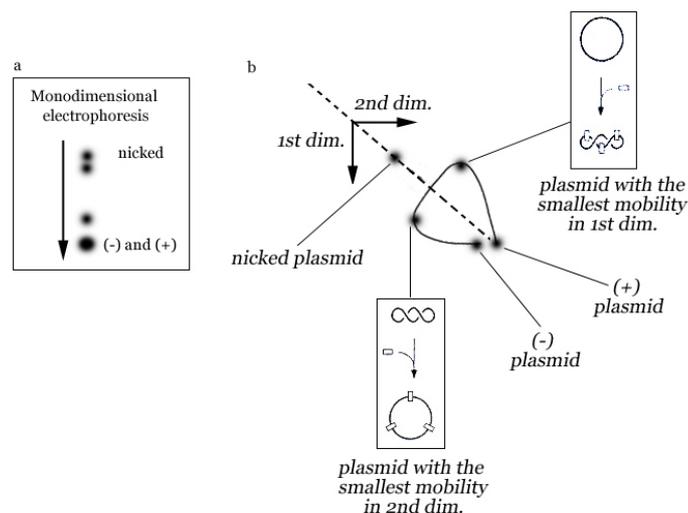


Figura 4.1.3.2 Rappresentazione schematica della risoluzione di vari topo isomeri mediante gel 2D.(a) In una elettroforesi monodimensionale i superavvolgimenti positivi e negativi aventi lo stesso numero di legame co-migrano come un' unica banda e quindi non possono essere distinti gli uni dagli altri.(b)Elettroforesi bidimensionale. La concentrazione dell' agente intercalante (rappresentato come rettangoli) è aumentata prima della seconda corsa. Il plasmide niccato possiede la mobilità minore sia nella prima che nella seconda dimensione, quindi l' incremento nella concentrazione dell' agente intercalante non produce alcune effetto sulla sua topologia. I plasmidi rilassati possiedono una bassa mobilità nella prima dimensione e l' aumento nella concentrazione dell' agente intercalante ne causa un superavvolgimento positivo con conseguente aumento della loro mobilità nella seconda dimensione. Al contrario i plasmidi superavvolti negativamente risulteranno più rilassati dopo l' aggiunta dell' intercalante per cui nella seconda dimensione correranno più lentamente rispetto alla prima. I plasmidi superavvolti positivamente risulteranno ancora più superavvolti presentando un elevato grado di motilità in entrambe le dimensioni.

I lieviti trasformati con il plasmide YEpGPD-topA(YEpW) e il plasmide controllo (YCp privo del gene Top1) accumulano superavvolgimenti positivi quando cresciuti a temperatura non permissiva (35°C). Se i lieviti sono co-trasformati con un vettore esprime la topoisomerasi WT i superavvolgimenti positivi sono rimossi ed il segnale si sposta sull' arco , ove migrano le molecole rilassate.(*fig.4.1.3.3B*). Quando viene espresso il singolo mutante A653P si verifica una parziale rimozione dei superavvolgimenti positivi, infatti il segnale corrispondente al DNA rilassato risulta maggiore rispetto al controllo ma non paragonabile a quello del Top1.(*fig.4.1.3.3C*). Il doppio mutante A653P-T718A presenta un attività inferiore rispetto alla proteina WT e al mutante A653P. Il segnale corrispondente ai superavvolgimenti positivi è ancora presente, mentre quello relativo

alle molecole rilassate risulta meno intenso e distribuito lungo l' arco ad indicare la presenza di una minore attività catalitica (*fig.4.1.3.3D*).

Questi risultati evidenziano che il doppio mutante possiede un attività catalitica inferiore rispetto alla proteina WT e al singolo mutante A653P. Quindi la resistenza alla CPT del DM riscontrata negli *spot test* non è dovuta ad una mancanza di attività *in vivo*.

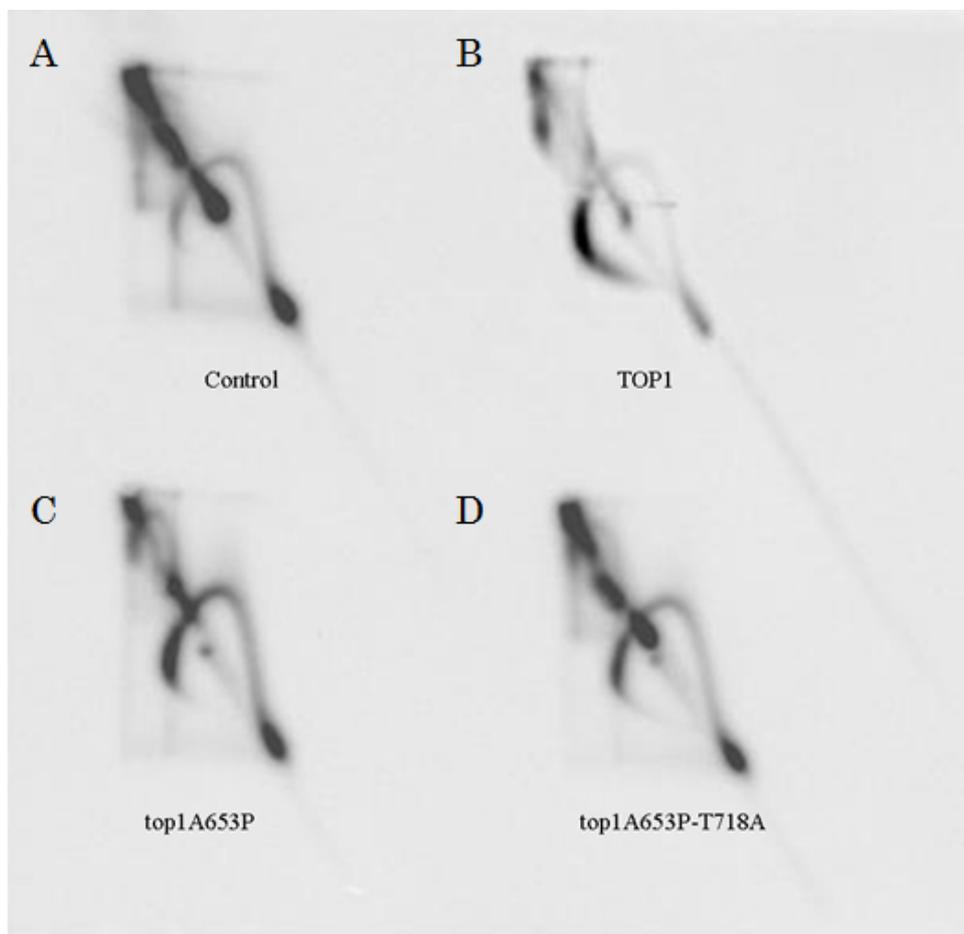


Figura 4.1.1.3 Esperimento 2D. I lieviti JCW28 cotrasformati con il plasmide YEpGPD-topA e il vettore controllo (A), YCpGAL-TOP1 (TOP1) (B), YCpGAL1-top1A653P (top1A653P) (C), or YCpGAL1-top1A653P/T718A (top1A653P/T718A) (D). Le cellule sono cresciute inizialmente a temperature permissive (26°C) in terreno selettivo in presenza di raffinoso al 2%. In seguito all' induzione con galattosio i lieviti sono cresciuti in condizioni di temperatura non permissive (36°C). La crescita delle cellule è stata bloccata mediante soluzione di toluene, il DNA estratto e corso in gel di agarosio bidimensionale. I prodotti sono stati visualizzati mediante Southern blots. La posizione relativa dei superavvolgimenti positivi (SC+) e negativi (SC-) e delle molecole di DNA rilassato sono schematizzato in figura 4.1.1.2

4.1.4 Attività specifica

Le proteine Top1, A653P e A653P-T718A sono state purificate e la loro attività specifica valutata mediante saggio di rilassamento. Diluzioni seriali delle stesse quantità proteiche (120pmol) sono state incubate in presenza di 500 ng di DNA negativamente superavvolto e di una concentrazione salina finale pari a 150 mM KCl.

I prodotti di reazioni sono stati risolti in un gel monodimensionale di agarosio all' 1% TBE 1X e, dopo colorazione con etidio bromuro, visualizzati mediante trans illuminatore (*fig.4.1.4.1*).

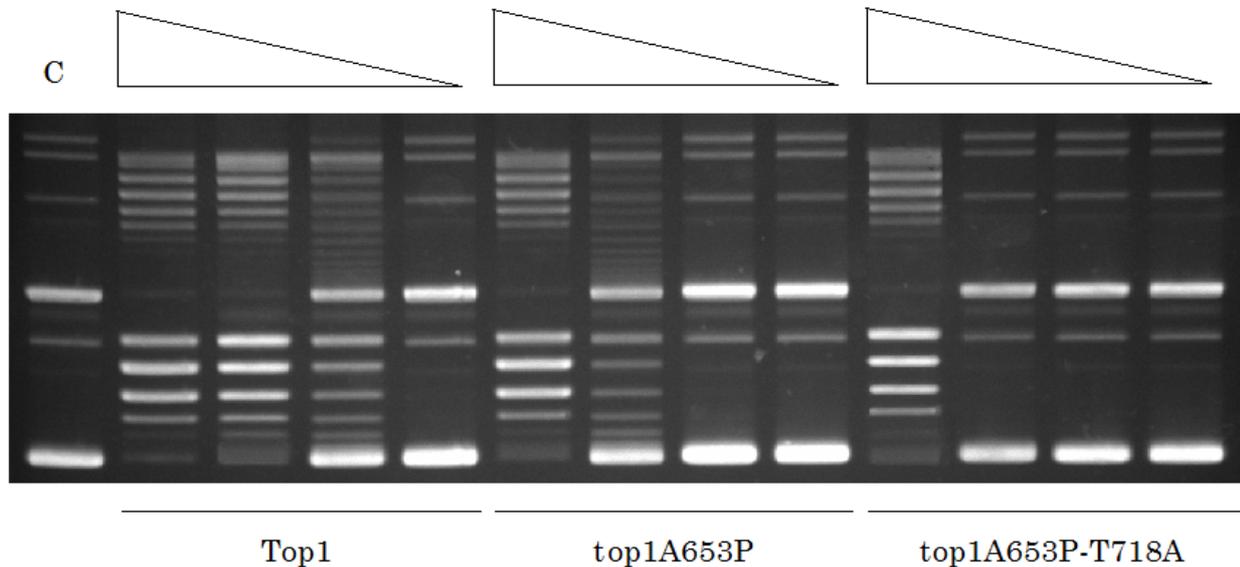


Figura4.1.4.1 Attività specifica della proteina WT e dei mutanti A653P e A653P-T718A. 120 pmol di ciascuna proteina, diluite serialmente di un fattore 10, sono incubate in presenza di 500 ng di DNA negativamente superavvolto. I prodotti di reazione sono risolti in gel di agarosio 1% e visualizzati dopo colorazione con etidio bromuro. C indica il controllo in cui il DNA non è stato incubato con alcun enzima.

L'analisi dei prodotti di reazione evidenzia la presenza per entrambi i mutanti di un'attività specifica inferiore rispetto all'enzima WT. La proteina A653P possiede un'attività specifica ridotta di un fattore 10 rispetto al WT. Mentre il doppio mutante presenta un'attività specifica 2-3 volte inferiore rispetto al singolo mutante A653P e circa 10-20 volte inferiore rispetto alla Top1 (*fig.4.1.4.1*). La riduzione dell'attività specifica, evidenziata dal doppio mutante, può essere causata da alterazioni nel ciclo catalitico che riguardano una diminuzione dell'affinità per il substrato o un calo nel tasso di taglio/riligazione del DNA.

4.1.5 Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche

Per discriminare tra queste due possibilità sono stati condotti dei saggi di rilassamento a diverse forze ioniche al fine di individuare l'*optimum salino* di attività e quindi ottenere una stima dell'affinità delle singole proteine per il DNA. Ad elevate concentrazioni saline diminuisce la capacità della topoisomerasi di rilassare il substrato in quanto il legame della proteina al DNA risulta inibito, mentre a basse

forze ioniche il fattore limitante la topo isomerizzazione è costituito dalla dissociazione dell'enzima dal substrato (*fig.4.1.5.1*).

La quantità di DNA superavvolto rimasta dopo l'incubazione con i due enzimi è stata calcolata mediante analisi del gel ed utilizzata per stimare la percentuale di rilassamento in rapporto alla forza ionica. Come indicato dal grafico (*fig.4.1.5.1B*), la proteina WT presenta un massimo di attività a 150 mM KCl mentre il doppio mutante rilassa il DNA in modo efficace a 50 mM KCl.

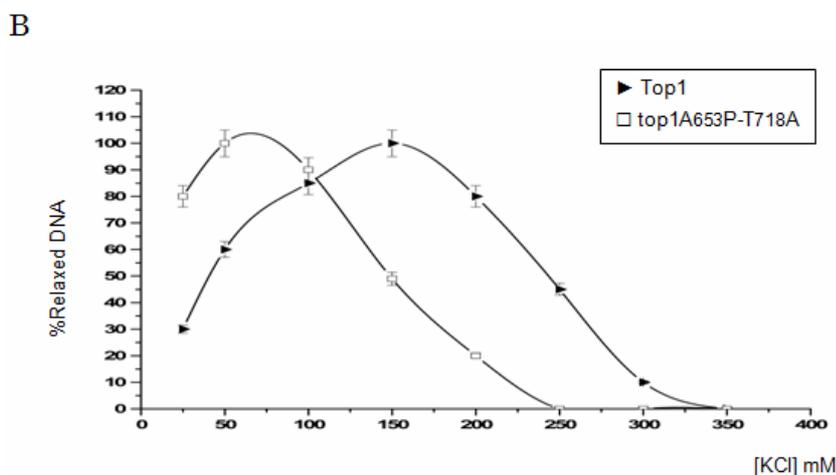
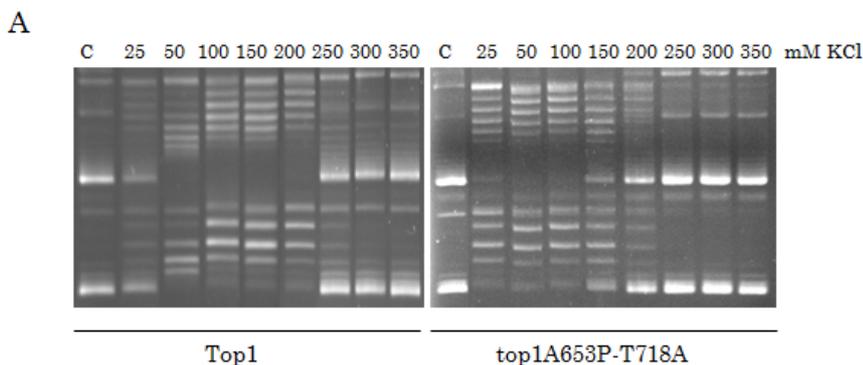


Figura 4.1.5.1 Il doppio mutante top1A653P-T718A presenta un optimum di attività di rilassamento a concentrazioni saline inferiori rispetto alla proteina WT.

(A) Quantità limitate di proteina WT o del doppio mutante sono incubate con DNA plasmidico a 37°C in presenza di diverse concentrazioni di KCl.

I prodotti di reazioni sono risolti un gel monodimensionale di agarosio all' 1% come descritto nei materiali e metodi.

(B) Le percentuali del DNA rilassato da ciascuna proteina (Top1 ► etop1A653P-T718A◻) in funzione della forza ionica presente nella soluzione sono riportate in grafico e costituiscono la media di tre diversi esperimenti. La banda di errore indica la deviazione standard.

Questi risultati indicano che il doppio mutante presenta una minore affinità per il DNA rispetto alla proteina WT. Alterazioni a carico del dominio linker e del sito attivo determinano un incremento dell'attività proteica a basse forze ioniche, aumentano probabilmente, il tasso di dissociazione dell'enzima dal DNA.

4.1.6 Cinetiche di rilassamento

Per valutare la capacità di topoisomerizzazione delle due proteine sono state effettuate delle cinetiche di rilassamento in eccesso di DNA alle forze ioniche in cui le proteine presentano la massima attività di rilassamento (50 e 150 mM KCl).

La proteina WT rilassa il DNA in modo efficiente a 150 mM KCl, infatti, in queste condizioni, l'enzima ha rilassato completamente il substrato già dopo 1min. A basse forze ioniche (50 mM KCl) la reazione di topoisomerizzazione risulta meno efficiente. Questa ridotta capacità di rilassamento unita al comportamento distributivo è legata alla diminuzione nel tasso di dissociazione enzima-DNA (*fig4.1.6.1*).

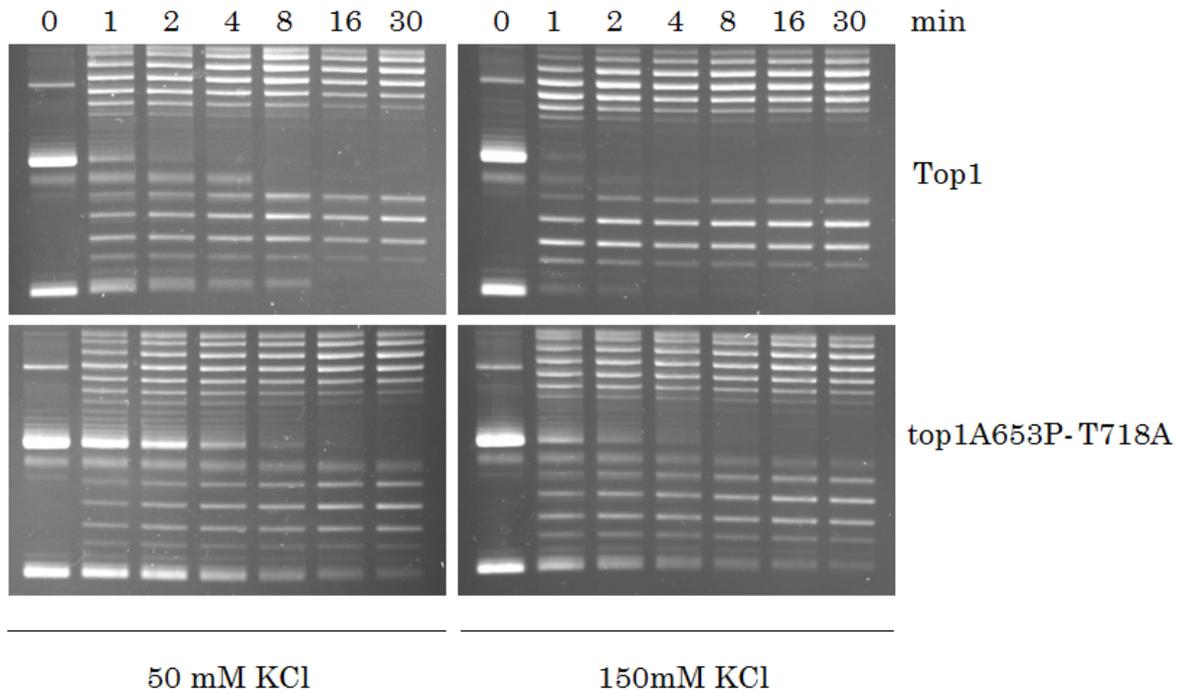


Figura 4.1.6.1 Cinetiche di rilassamento catalizzate dalle proteine Top1 e top1A653P-T718A. Stesse quantità dell'enzima WT e top1A653P-T718A sono incubate con Dna superavvolto a 50 e 150 mM KCl. Aliquote sono prelevate a tempi definite trattate con SDS allo 0,5%. I prodotti sono risolti in gel di agarosio all' 1%.

Il doppio mutante presenta un comportamento distributivo ad entrambe le forze ioniche, inoltre la reazione di topoisomerizzazione è portata a compimento con scarsa efficienza indicando la presenza di una diminuita attività catalitica.

4.1.7 Saggio di taglio

Per valutare la capacità della CPT di intrappolare i complessi di taglio sono stati condotti dei saggi di taglio. Uguali quantità della proteina WT e dei mutanti sono incubate con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi, marcato ad una delle estremità 3,' a 50 mM KCl in presenza o meno della CPT.

La reazione è bloccata mediante aggiunta di SDS e i prodotti risolti in un gel di sequenziamento (7M Urea, 8% Acrilamide). In queste condizioni l'intensità relativa delle bande e la loro distribuzione fornisce indicazioni sulla presenza di mutazioni o

alterazioni nella capacità della CPT di stabilizzare i complessi di taglio. Come mostrato in fig. 4.1.7.1 in presenza di DMSO vengono intrappolati solo pochi complessi di taglio nel caso della proteina WT in corrispondenza del sito preferenziale. In presenza della CPT si assiste ad un drammatico incremento del numero degli intermedi di reazione stabilizzati dall' inibitore.

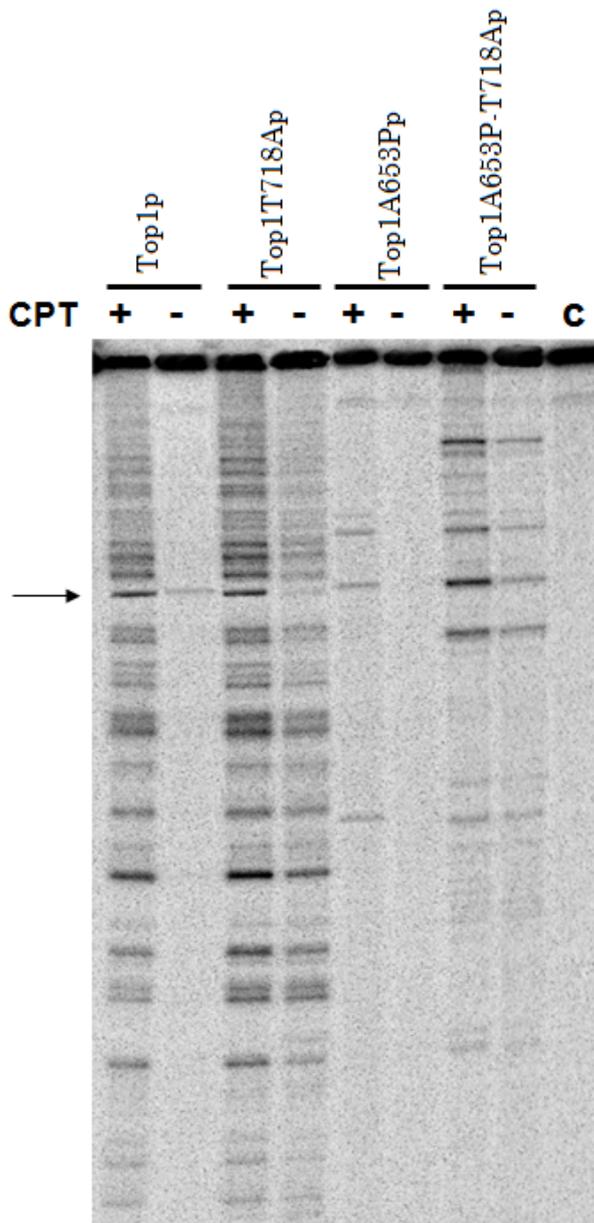


Figura 4.1.7.1 Il mutante *top1A653P-T718A* presenta una alterata sensibilità alla CPT *in vitro*. Uguali concentrazioni dell' enzima *Top1p* e *Top1A653P-T718Ap* sono incubati in presenza di un frammento di DNA marcato ad una delle estremità 3', in presenza o meno della CPT. Dopo 30min la reazione è bloccata mediante aggiunta di SDS allo 0,5% e i prodotti di reazione sono risolti in gel di 7M Urea -8% Acrilamide. La freccia indica il sito preferenziale di taglio.

In assenza di inibitore il doppio mutante presenta un livello di complessi di taglio basso ma riproducibile. Il loro numero risulta aumentato in presenza di CPT. Sia l' enzima A653P che A653P-T718A possiedono un livello di tagli inferiore al WT e al singolo mutante T718A in presenza dell' inibitore. Questi risultati suggeriscono che i difetti nella riligazione causati dalla mutazione T718A, in assenza di CPT, sono

eliminati dalla mutazione A653P. Infatti, quando le due mutazioni vengono combinate nel doppio mutante si verifica una riduzione nell' affinità per il DNA che determina l'abolizione della letalità causata dalla mutazione T718A.

I complessi di taglio intrappolati in presenza di CPT da parte del doppio mutante sono localizzati nella parte superiore del gel e corrispondono a frammenti di DNA lunghi più di 100 coppie di basi (*fig.4.1.7.1*). Questo tipo di distribuzione non è osservata nel caso del WT mentre risulta analoga a quella ottenuta per il mutante A653P. Questi dati indicano la presenza di alterazioni nella specificità di riconoscimento e nel legame del DNA che risultano causate dalla mutazione collocata nel dominio linker

4.1.8 Saggio di riligazione

Il doppio mutante è incapace di interagire in modo efficace con substrati in cui sia presente un duplex parziale e che siano più corti di 100bp ,come la coppia CP25/CL14 normalmente utilizzata in questo tipo di saggi. La necessità di un substrato a doppio filamento a valle del sito di taglio conferma la presenza di alterazione nel legame e nel riconoscimento del DNA. Per valutare gli effetti della CPT sulla cinetica di taglio e riligazione del mutante A653P-T718A è stato effettuato un saggio di riligazione in presenza di un substrato totalmente annilato , lungo 100 coppie di basi, marcato radioattivamente ad una delle estremità 5'. La fase di taglio è analizzata utilizzando un substrato in cui il filamento complementare (50nt), che dovrebbe essere utilizzato nella reazione di riligazione, è stato fosforilato generando un substrato suicida a doppio filamento (*fig.4.1.8.1A*).

Uguali concentrazioni delle proteine d'interesse sono incubate insieme al substrato suicida ed aliquote sono prelevate a tempi definiti. La reazione è bloccata mediante aggiunta di SDS. Metà dei prodotti di reazioni sono analizzati su gel di acrilamide 7M urea(*fig.4.1.8.1B*), l'altra metà è risolta in TricinaSDS-PAGE (*fig.4.1.8.1C*). I prodotti sono visualizzati mediante analisi con PhosphorImager. La percentuale del DNA presente nel complesso Top1-DNA e nel complesso Top1A653P-T718Ap-DNA è determinata mediante ImageQuant e normalizzata rispetto al numero totale di conte presente in ciascun campione (*fig.4.1.8.1D*). Sia l'enzima WT che il doppio mutante sono capaci di tagliare il filamento scissile.Per stimare la percentuale dei complessi di taglio i prodotti di reazione sono analizzati anche mediante TricinaSDS-PAGE. In

causando un rapido accumulo del frammento lungo 100 nucleotidi. Il tasso di riligazione è drammaticamente ridotto in presenza della CPT. Questi dati confermano che il taglio del substrato costituisce lo stato limitante la reazione di topoisomerizzazione e che la CPT agisce rallentando la reazione di riligazione (fig 4.1.8.2).

Il doppio mutante taglia il DNA con un'efficienza inferiore rispetto alla proteina WT mentre il tasso di riligazione non risulta profondamente influenzato dalla presenza della CPT.

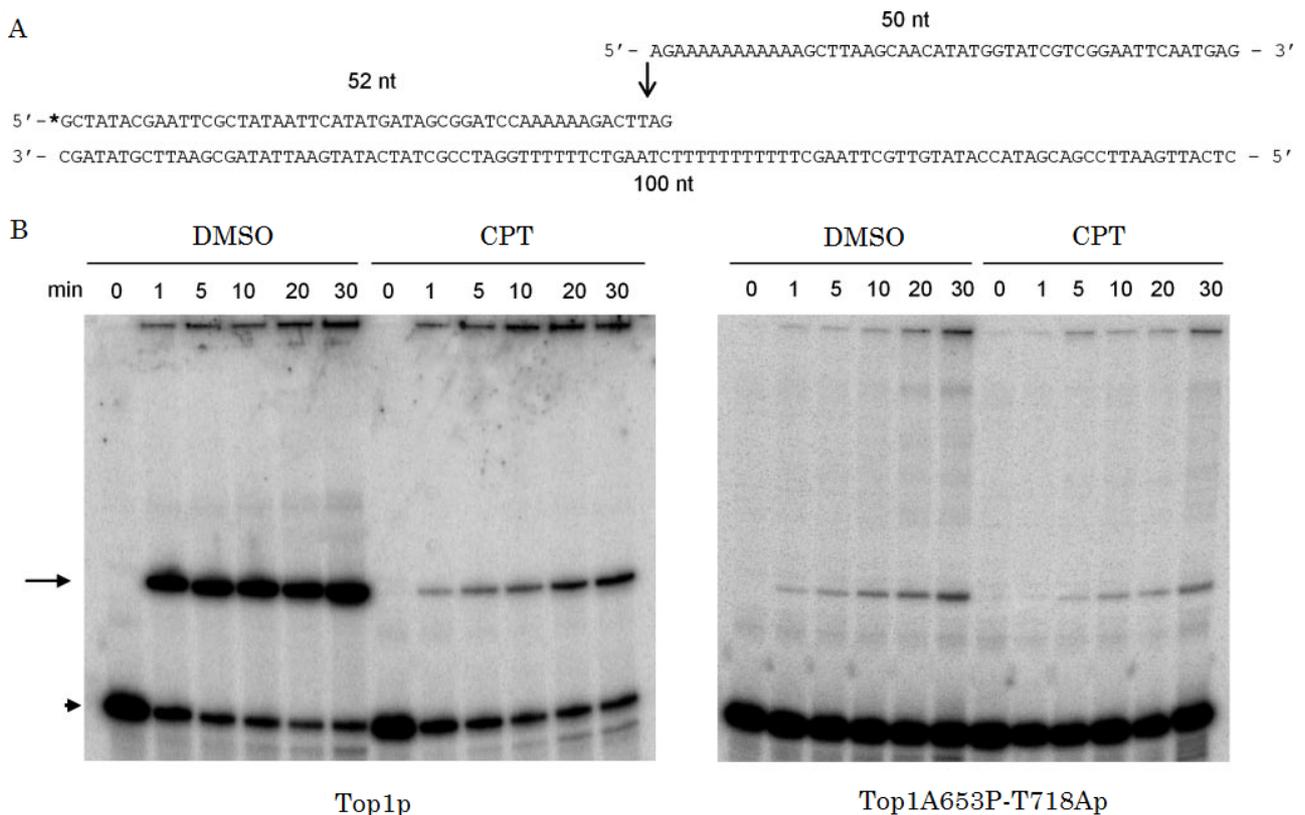


Figura 4.1.8.2 La riligazione del DNA da parte del mutante *top1A653P-T718A* non è influenzata dalla CPT. (A) Il taglio del filamento scissile (52 nt) libera un di nucleotide AG e blocca il complesso di taglio enzima-DNA, mentre la riligazione dell'oligonucleotide 50nt genera un prodotto lungo 100 coppie di basi. (B) Uguali quantità dell'enzima WT e A653P-T718A sono incubate con il substrato in presenza o meno della CPT. I prodotti della reazione sono visualizzati mediante PhosphorImager.

Questi dati confermano la presenza di una riduzione nella capacità di interagire con il substrato da parte del doppio mutante.

In lievito il tasso di riligazione del mutante T722A (analogo della mutazione T718A umana) risulta ridotto mentre quello del mutante A653P incrementato. Il confronto tra la quantità di substrato tagliato e riligato evidenzia che il tasso di riligazione è comparabile per l'enzima WT e il mutante A653P-T718A in assenza di CPT. Quindi la mutazione A653P sopprime i difetti di riligazione indotti dalla mutazione T718A.

4.2 Risultati di mutanti T729A, T729E, T729K e T729P

4.2.1 Clonaggio dei geni htopT729A, htopT729E, htopT729K, htopT729P

I geni htopT729A, htopT729E, htopT729K e htopT729P, sono stati clonati in un vettore per l'espressione di proteine in lievito che presenta modalità di replicazione a singola copia. In questo modo è possibile studiare l'espressione basale dei geni d'interesse e valutarne il fenotipo in ceppi di lievito deleti per il gene della topoisomerasi I endogena. Il gene è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore inducibile GAL4, in modo da attivarne l'espressione a piacimento.

4.2.2 Spot test

Il mutante htop1T729A è stato isolato durante uno screening su linee tumorali caratterizzate dalla presenza di resistenza all' analogo della CPT, irinotecano, di un fattore compreso tra 5 e 10 rispetto alle parentali. La Thr 729 si trova nella stessa α -elica contenente la Asn 722,. Questo residuo è coinvolto in un legame mediato da una molecola di acqua con la CPT; inoltre mutazioni dell' Asn 722 inducono resistenza alla CPT e suoi analoghi. La mutazione della Thr 729 in Ala potrebbe determinare l'abolizione di contatti fondamentali per il corretto posizionamento del residuo 722. Al fine di verificare questa ipotesi il mutante il mutante htopT729A è stato posto sotto il controllo del promotore GAL4 e la sua espressione indotta in presenza o meno dell' inibitore al fine di valutarne la vitalità e la sensibilità alla CPT.

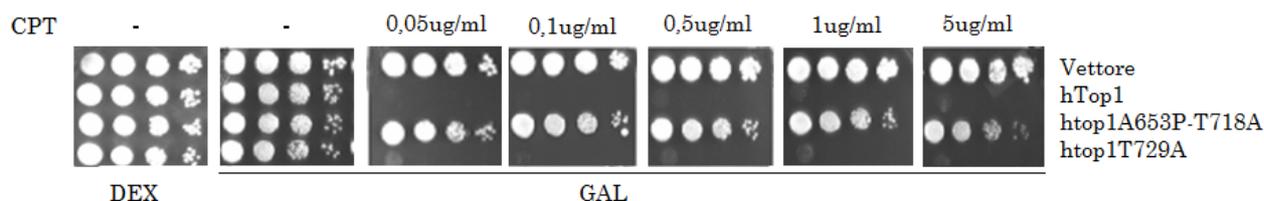


Figura 4.2.2.1 Spot test Saggi in vivo condotti su terreno solido ura-dex e ura-gal in presenza o meno di diverse concentrazioni di CPT come indicato in figura. Il mutante T729A risulta vitale e sensibile alla CPT, infatti risulta incapace di formare colonie in presenza anche di basse concentrazioni di CPT esibendo un tipo di crescita paragonabile al WT

Il mutante T729A se espresso in un sistema come il *S.cerevisiae* risulta vitale e sensibile alla CPT. Infatti non è in grado di formare colonie in condizioni di espressione in presenza anche di basse concentrazioni di CPT; evidenziando un tipo di crescita paragonabile alla proteina WT (*fig.4.2.2.1*). Per valutare il ruolo svolto del residuo 729 nella catalisi enzimatica e nella resistenza alla CPT sono stati prodotti altri tre mutanti : T729E, T729K e T729P. Le sostituzioni sono state scelte per la loro carica nel caso dell'acido glutammico e delle lisina e per la capacità di alterare la struttura elicoidale nel caso della prolina. I mutanti sono stati clonati in vettori di lievito sotto il controllo del promotore GAL4 e la loro espressione indotta in presenza di galattosio su terreno selettivo al fine di valutarne la vitalità e la sensibilità alla CPT.

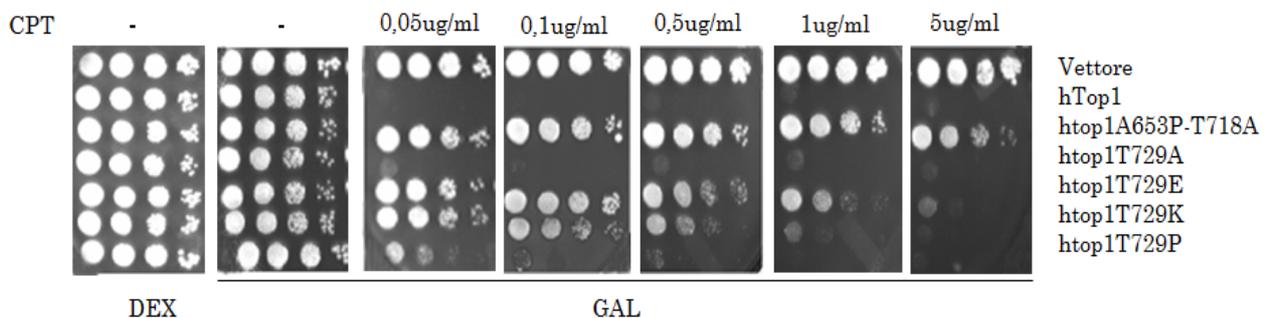


Figura 4.2.2.2 Spot test. Saggi in vivo condotti su terreno solido *ura-dex* e *ura-gal* in presenza o meno di diverse concentrazioni di CPT come indicato in figura. Il mutante T729A risulta vitale e sensibile alla CPT, infatti risulta incapace di formare colonie in presenza anche di basse concentrazioni di CPT. Il mutante T729P forma colonie a basse concentrazioni di CPT. I mutanti T729E e T729K sono vitali rispettivamente sino a 5ug/ml e 1ug/ml di CPT.

Il mutante T729P è in grado di formare colonie in presenza di basse concentrazioni di CPT corrispondenti a 0,05µg/ml. Il mutante T729K risulta vitale su piastre contenenti 1µg/ml di CPT, mentre il mutante T729E è ancora capace di formare colonie su terreni contenenti 5µg/ml di inibitore (*fig.4.2.2.2*). L'introduzione di queste nuove sostituzioni ha generato un gradiente di resistenza alla CPT massimo nel caso in cui venga introdotta una carica negativa e minima nel caso in cui si perturbi la struttura elicoidale senza alterare il bilancio elettrostatico della regione.

4.2.3 Attività specifica

Le proteine Top1, T729A, T729E, T729K e T729P sono state purificate e la loro attività specifica valutata mediante saggio di rilassamento.

Uguali quantità di ciascuna proteina e diluizioni seriali delle stesse sono state incubate con DNA superavvolto negativamente, in presenza di una concentrazione finale di KCl pari a 150 mM.

I prodotti di reazioni sono risolti in un gel di agarosio monodimensionale, colorati con etidio bromuro e visualizzate mediante trans illuminatore (fig. 4.2.3.1).

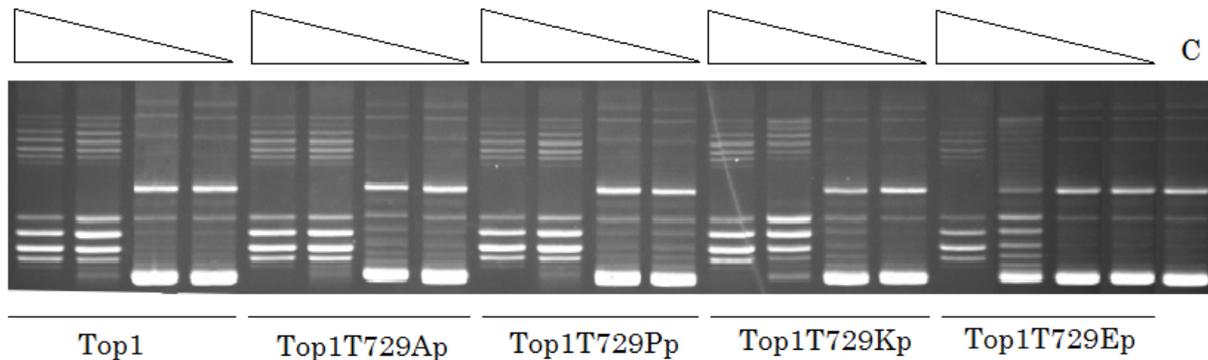


Figura 4.2.3.1 Attività specifica della proteina WT e dei mutanti T729A, T729P, T729K e T729E. Uguali quantità di ciascuna proteina, diluite serialmente di un fattore 10, sono incubate in presenza di 500 ng di DNA negativamente superavvolto. I prodotti di reazione sono risolti in gel di agarosio 1% e visualizzati dopo colorazione con etidio bromuro. C indica il controllo in cui il DNA non è stato incubato con alcun enzima.

I mutanti T729A e T729P presentano un'attività specifica paragonabile a quella della proteina WT, mentre il mutante T729K rilassa solo il 70% del substrato in condizioni di diluizione 1 a 10. Il mutante T729E presenta un'attività specifica inferiore rispetto alle altre proteine infatti in condizioni di diluizione 1 a 10 rilassa solo il 50% del DNA. La presenza di una minore attività specifica può essere dovuta ad alterazioni nel ciclo catalitico che comprendono una diminuita affinità per il substrato o variazioni nel tasso di taglio e riligazione del DNA.

4.2.4 Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche

Per stimare l'affinità dei mutanti per il substrato sono stati condotti dei saggi di rilassamento in presenza di diverse forze ioniche al fine di individuare l'*optimum salino* di attività. Per stimare con maggiore precisione l'affinità delle proteine per il DNA i saggi sono stati condotti in diluizioni seriali (fig. 4.2.4.1).

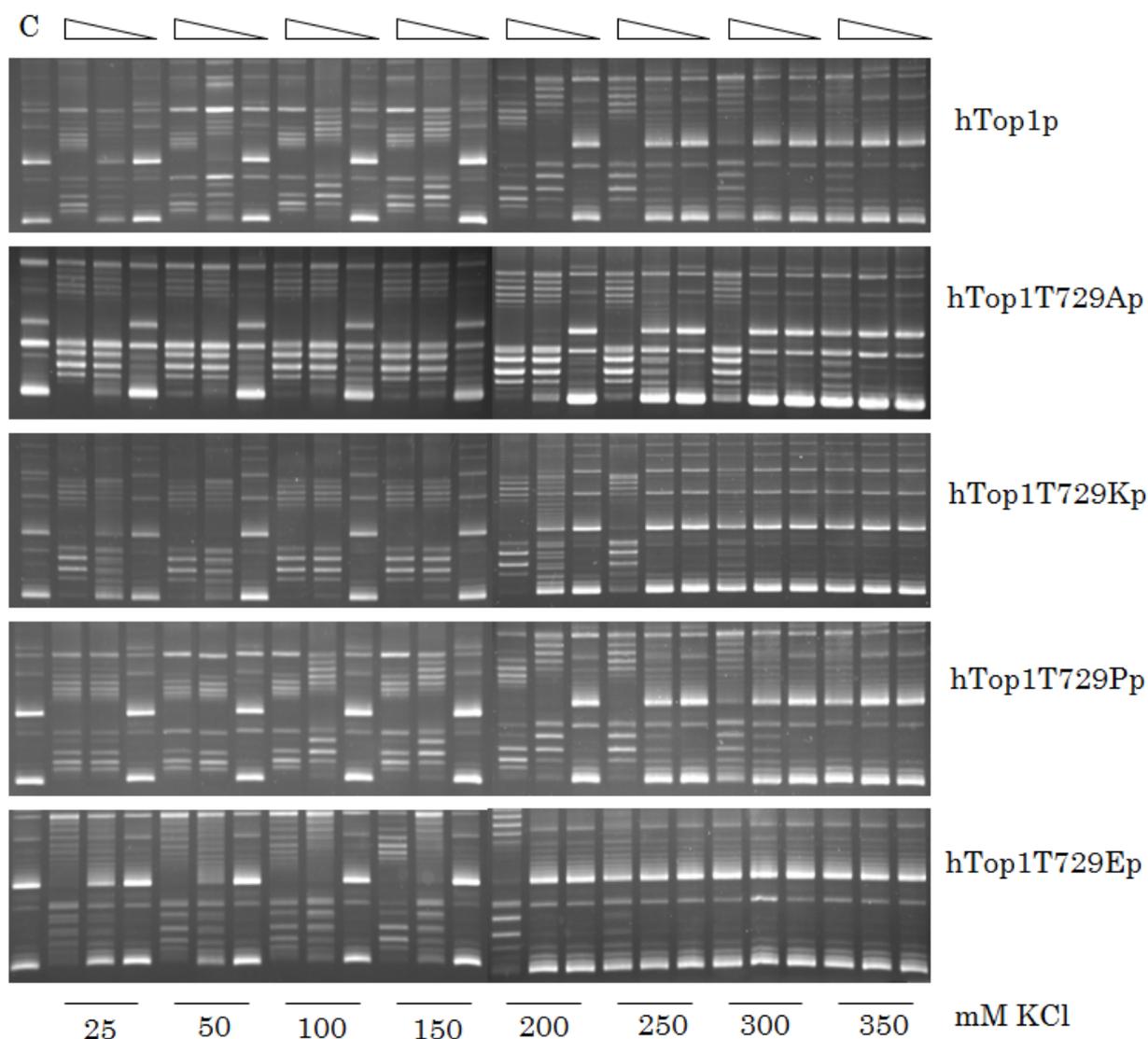


Figura 4.2.4.1 Saggio di rilassamento in diluizioni seriali a diverse forze ioniche Quantità limitate di proteina WT o dei mutanti sono incubate con DNA plasmidico a 37°C in presenza di diverse concentrazioni di KCl. I prodotti di reazioni sono risolti un gel monodimensionale di agarosio all' 1% come descritto nei materiali e metodi.

La quantità di DNA superavvolto rimasta dopo l'incubazione con i diversi enzimi è stata calcolata mediante analisi del gel ed utilizzata per stimare la percentuale di rilassamento in rapporto alla forza ionica. La percentuale del DNA rilassato è stata calcolata come rapporto tra $(\text{DNA relax})/[(\text{DNA relax})+(\text{DNA supercoil})]$ e plotata in funzione della concentrazione di KCl presente in soluzione (*fig.4.2.4.2*). Come indicato dal grafico (*fig.4.2.4.2*), la proteina WT presenta un massimo di attività a 150 mM KCl così come i mutanti T729A e T729P. Il mutante T729K presenta un massimo di attività a 100 mM KCl mentre il T729E a 50 mM KCl. Questi dati suggeriscono che mutazioni volte ad alterare il bilancio elettrostatico della regione causino un drastico calo dell' affinità per il substrato.

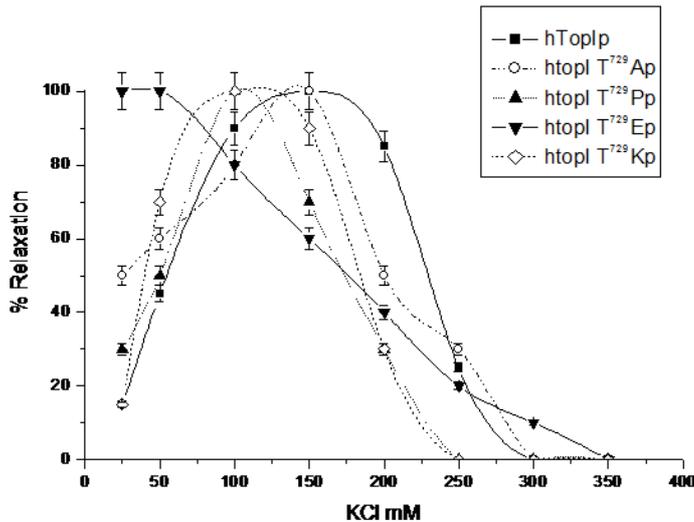


Figura 4.2.4.1 Saggio di rilassamento in diluizioni seriali a diverse forze ioniche
 Le percentuali del DNA rilassato da ciascuna proteina in funzione della forza ionica presente nella soluzione sono riportate in grafico e costituiscono la media di tre diversi esperimenti. La banda di errore indica la deviazione standard. (Top1■, T729A○, T729P▲, T729E▼ e T729K◇)

4.2.5 Saggio di taglio

Per valutare la capacità della CPT di intrappolare i complessi covalenti sono stati condotti dei saggi di taglio. Uguali quantità della proteina WT e dei mutanti T729A, T729P, T729E e T729K sono incubate con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in una soluzione 50 mM KCl in presenza o meno della CPT. La reazione è bloccata mediante aggiunta di SDS e i prodotti risolti in un gel di sequenziamento (7M Urea, 8% Acrilamide).

Quando la proteina WT è incubata con DMSO non viene bloccato alcun complesso di taglio mentre si registra un drammatico incremento in presenza dell'inibitore. Gli stessi risultati sono ottenuti in per il mutante T729A a conferma di quanto osservato negli esperimenti *in vivo*. Per il mutante T729E non è possibile intrappolare alcun complesso di taglio ne in presenza ne in assenza dell' inibitore. Questi risultati consentano di ipotizzare per questo mutante la presenza di resistenza o di una ridotta capacità di interazione con il substrato. Nel caso dei mutanti T729K e T729P sono bloccati alcuni complessi di taglio in presenza dell' inibitore, dimostrando che alterazioni del residuo 729 non aboliscono completamente la capacità della CPT di intrappolare alcuni complessi covalenti. I risultati degli esperimenti *in vitro* confermano il gradiente di sensibilità riscontrato nei saggi *in vivo* (fig.4.2.5.1).

Questi dati avvalorano la presenza per alcuni mutanti di resistenza all' inibitore e allo stesso tempo forniscono importanti indicazioni circa il ruolo svolto dalla Thr 729.

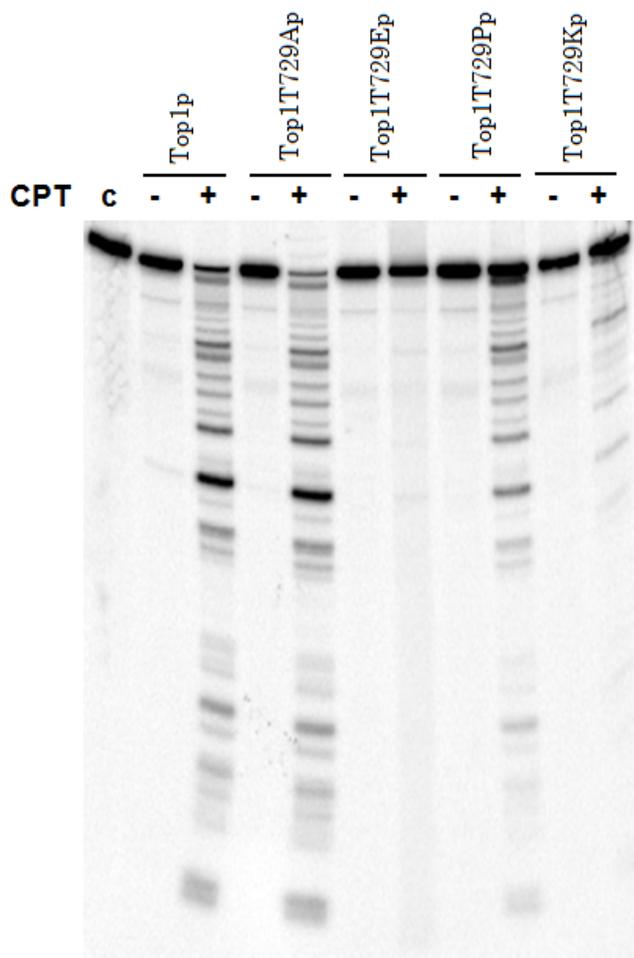


Figura 4.2.5.1 Equilibrio taglio-riligazione.

Uguali concentrazioni delle proteine Top1p, Top1T729Ap, Top1T729Ep, Top1T729Pp e Top1T729Kp sono incubati con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in presenza o meno della CPT. Dopo 30 min la reazione è bloccata con SDS 0,5% e i prodotti risolti un gel denaturante 7M Urea-8% acrilamide. C indica il controllo in cui non è stato inserito alcun enzima. La freccia indica il sito preferenziale di taglio

Infatti la Thr 729 potrebbe avere un ruolo chiave nel mantenimento della corretta geometria durante il legame della proteina al DNA e durante il legame del farmaco al complesso binario. Al fine di valutare e analizzare la fase di riligazione abbiamo realizzato dei saggi di riligazione.

4.2.6 Saggio di riligazione

Una strategia comune per disaccoppiare la reazione di taglio da quella di riligazione è l' utilizzo di una coppia di oligonucleotidi che formando un doppio filamento parziale generano un substrato suicida. (fig 4.2.6.1). L' oligonucleotide CL14 possiede due siti di taglio riconosciuti dalla Top1, quando il taglio ha luogo sul primo sito (1) viene liberato un dinucleotide ed il complesso di taglio enzima-DNA rimane intrappolato sul substrato.

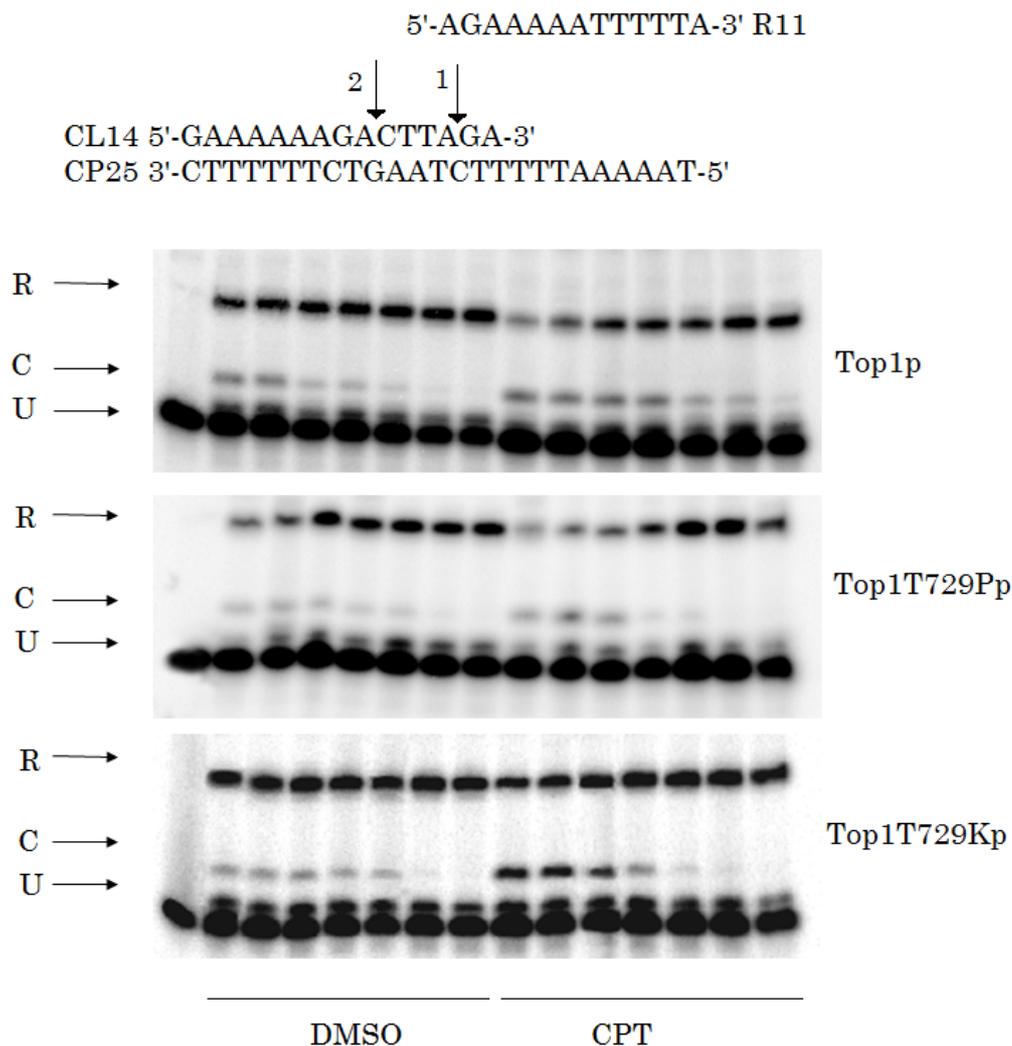


Figura 4.2.6.1 Saggio di riligazione per le proteine WT, T729P e T729K. Il taglio del filamento scissile (14nt) libera un di nucleotide AG e blocca il complesso di taglio enzima-DNA, mentre la riligazione dell' oligonucleotide R11 genera un prodotto lungo 23 coppie di basi. Uguali quantità dell' enzima WT e dei mutanti T729P e T729K sono incubate con il substrato in presenza o meno della CPT. I prodotti della reazione sono visualizzati mediante PhosphorImager.

In presenza di un oligo complementare l'enzima WT riliga rapidamente il DNA tagliato determinando la formazione di un prodotto di reazione lungo 23 coppie di basi. In presenza dell' inibitore, per l' enzima WT, si registra un drammatico calo nel tasso di riligazione. Lo stesso comportamento non è evidenziato per i mutanti TP e TK, infatti, l' analisi dei prodotti di reazione (*fig.4.2.6.2*) evidenzia che il tasso di riligazione per i mutanti non risulta influenzato dalla presenza della CPT.

Il mutante T729E è incapace di interagire e tagliare qualsiasi substrato sottoposto alla sua azione, confermando la presenza di alterazioni nella capacità di interagire con il DNA.

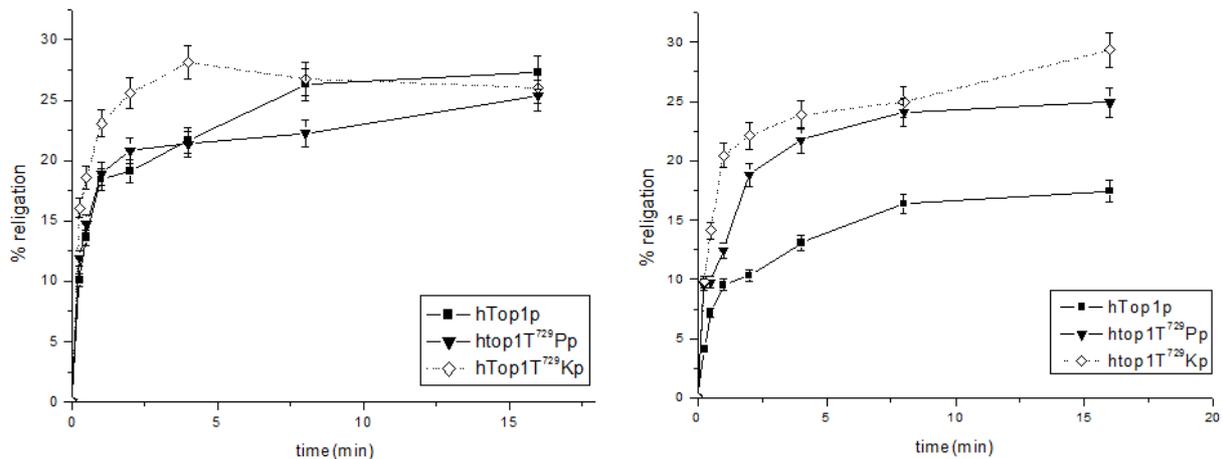


Figura 4.2.6.2 Saggio di religazione per le proteine WT, T729P e T729K. La percentuale del DNA presente nel complesso Top1-DNA è determinata mediante ImageQuant e normalizzata rispetto al numero totale di conte presente in ciascun campione. (Top1p■, Top1T729Pp▼ e Top1T729Kp◇)

4.2.7 Cinetiche di rilassamento

Al fine di valutare la capacità di rilassamento dei mutanti sono state realizzate delle cinetiche di rilassamento in condizione di eccesso di substrato. In queste condizioni lo stato limitante la reazione di topoisomerizzazione è costituito dalla dissociazione dell'enzima dal substrato (*fig.4.2.7.1*).

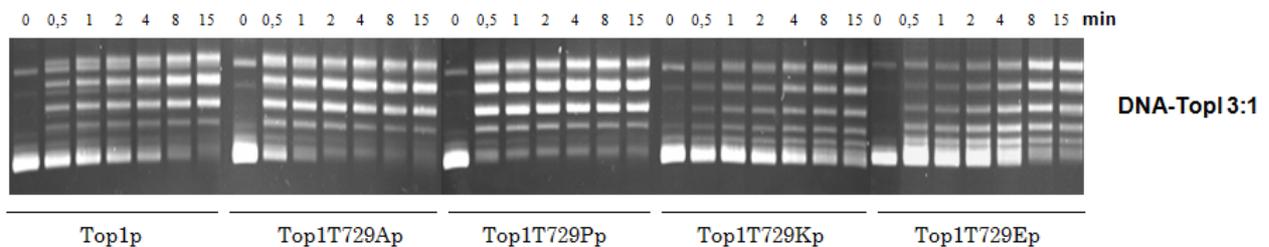


Figura 4.2.7.1 Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di DNA. Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti e risolte in un gel di agarosio all' 1%.

L'enzima WT, il mutante T729A e T729P rilassano il DNA in modo processivo portando a compimento la reazione di topo isomerizzazione già dopo 2-4 min. I mutanti T729K e T729E presentano un comportamento distributivo nel rilassare il DNA ed inoltre non portano a compimento la reazione di topoisomerizzazione.

Per valutare se questa minore capacità di rilassamento sia influenzata dal legame del substrato sono stati condotti dei saggi in eccesso di proteina. In queste condizioni ogni

molecola di DNA è legata almeno da un enzima per cui lo stato limitante la reazione di topo isomerizzazione non è più costituito dal tasso di dissociazione enzima-DNA.

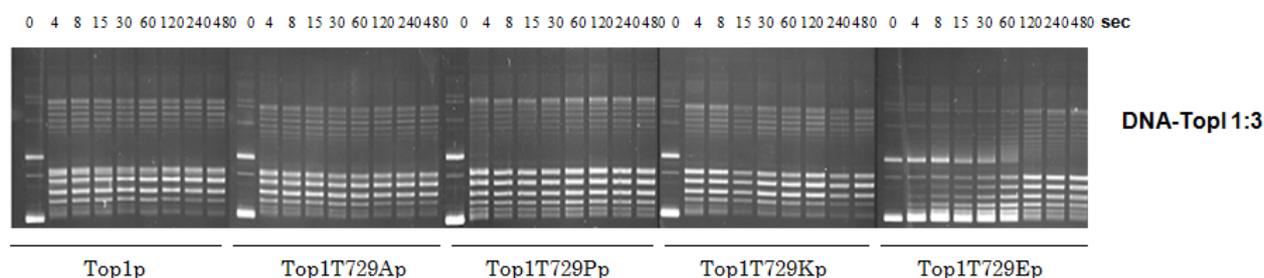


Figura 4.2.7.2 *Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di substrato.* Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti e risolte in un gel di agarosio all' 1%.

In queste condizioni le proteine WT, T729A e T729P presentano una cinetica di rilassamento processava. Il mutante T729K reverte i difetti di rilassamento evidenziati in condizioni di eccesso di DNA. Inoltre, il mutante T729E anche in queste condizioni non porta a compimento la reazione di rilassamento. Questi dati confermano la presenza di alterazioni nella capacità di interagire con il substrato da parte dei mutanti della posizione 729 (*fig. 4.2.7.2*).

4.2.8 Saggio di binding

Per stimare la riduzione nella capacità dei legame dei mutanti 729, sono stati effettuati dei saggi di *filter binding*. Quantità crescenti di proteine sono state incubate con un frammento di DNA lungo 100 coppie di basi marcato radio attivamente all' estremità 5'. Dopo l'incubazione i campioni sono stati caricati su colonnine da micro centrifuga contenenti una membrana di nitrocellulosa precedentemente saturata con *salmon sperm* in modo da limitare il legame aspecifico. La quantità di DNA intrappolato sul filtro corrisponde alla percentuale di substrato legato dalla proteina. La stima della percentuale di DNA legato è calcolato come rapporto tra (c.p.m. filtro) e [(c.p.m. filtro)+(c.p.m. eluato)] come descritto in materiali e metodi. L'analisi dei profili di legame evidenzia che i mutanti presentano un gradiente di legame massimo per la proteina WT e minimo per il mutante T729E. In grafico sono riportate le percentuali di legame in funzione della concentrazione proteica (*fig. 4.2.8.1*).

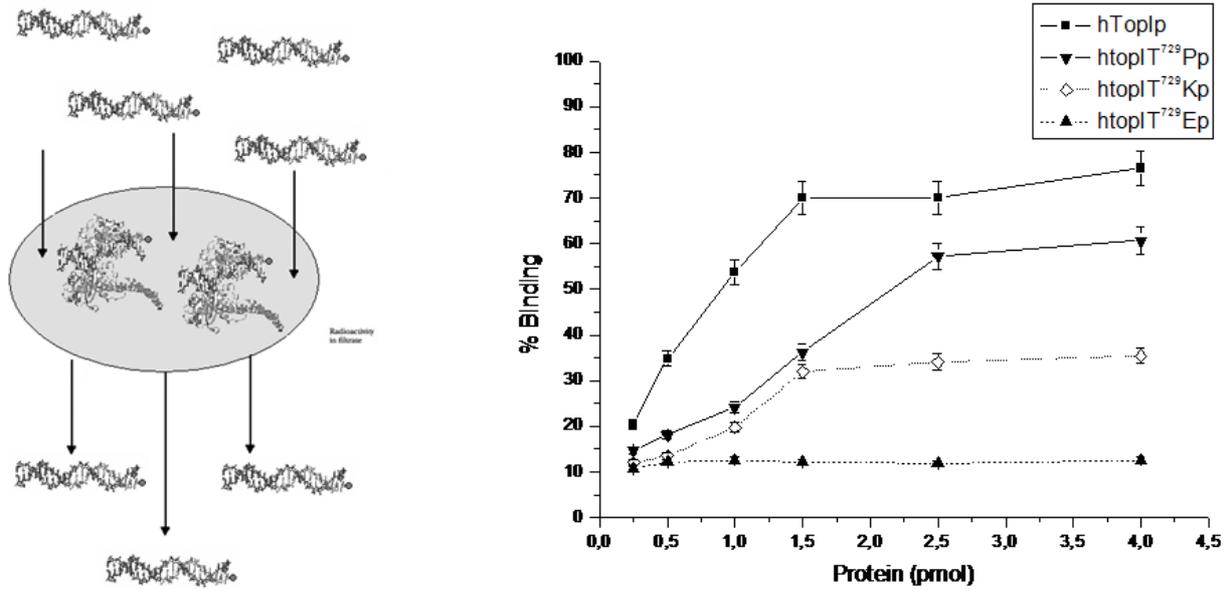


Figura 4.2.8.1 Saggio di binding. Quantità crescenti di proteine hTop1p, htop1T729P, htop1T729K e htop1T729E sono incubate con un frammento di DNA lungo 100 coppie di basi. La percentuale del DNA legato in funzione delle concentrazioni enzimatiche sono riportate in grafico. I risultati sono la media di cinque esperimenti e la barra di errore rappresenta la deviazione standard.

4.3 Risultati di mutanti P431G, P431G -70,R434A, R434-70,R434C e R434C-70.

4.3.1 Clonaggio dei geni *htopP431G*, *htopP431G-70*,*htopR434A*, *htopR434A-70*, *htopR434C*, *htopR434C-70*,

I geni *htopP431G*, *htopP431G-70*, *htopR434A*, *htopR434A -70*,*htopR434C*, *htopR434C-70* e *Topo70* sono stati clonati in un vettore per l'espressione di proteine in lievito che presenta modalità di replicazione a singola copia. In questo modo è possibile studiare l'espressione dei geni d'interesse e valutarne il fenotipo in ceppi di lievito deleti per il gene della topoisomerasi I endogena. Il gene è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore inducibile GAL4, in modo da attivarne l'espressione a piacimento. I mutanti sono stati realizzati sia nella versione *full lenght* che in quella privata del dominio N-terminale (70) al fine di verificare se l'assenza di questa regione possa alterare l'attività catalitica delle varie proteine.

4.3.2 Spot test

Questo test consente di analizzare la vitalità di ceppi di lievito trasformati con diversi plasmidi, esprimenti le proteine d'interesse valutando la capacità degli stessi di formare colonie in presenza o meno di veleni selettivi.

Piastrando aliquote serialmente diluite su piastre contenenti diverse concentrazioni di farmaco, è possibile stabilire, in modo semi-quantitativo, la dose di veleno capace di indurre citotossicità. L'espressione dei mutanti oggetto di questo studio è controllata da un promotore GAL4, per cui in presenza di galattosio sarà indotta la produzione della proteina d'interesse.

In condizioni d'espressione tutti mutanti risultano essere letali, mentre i lieviti trasformati con i vettori esprimenti la proteina WT e il DM sono vitali. Sulle piastre contenenti CPT si assiste ad un drammatico calo nella capacità di formare colonie da parte dei lieviti esprimenti la Top1. Questi dati confermano che la Top1 è l'unico bersaglio cellulare della CPT. I lieviti trasformati con il vettore esprimente il doppio mutante A653P-T718A risultano vitali sia in assenza che in presenza di alte concentrazioni di CPT confermando la condizione di resistenza.

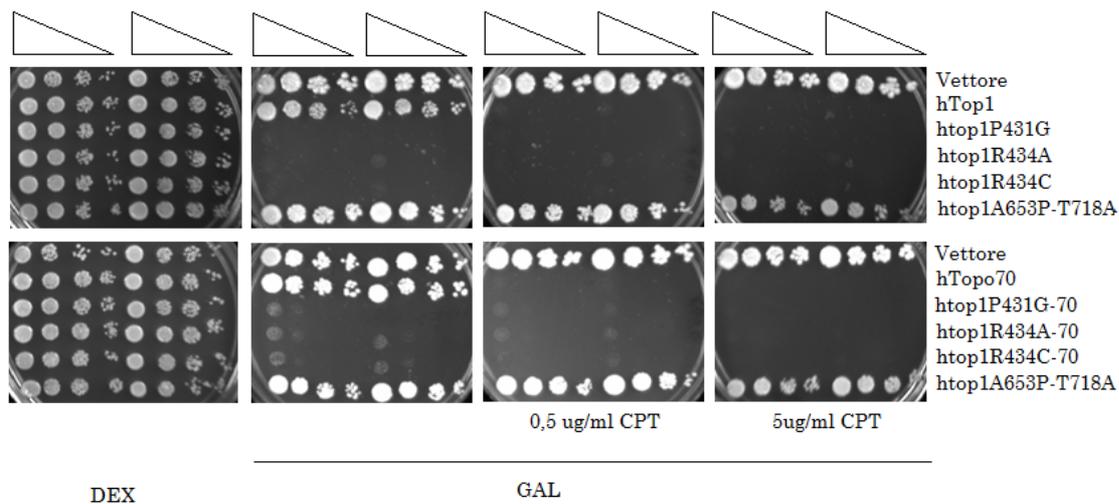


Figura 4.3.2.1 Spot test. Saggi in vivo condotti su terreno solido *ura-dex* e *ura-gal* in presenza o meno di diverse concentrazioni di CPT come indicato in figura. I mutanti P431G, R434A e R434C risultano letali. Anche i mutanti privati del dominio N-terminale presentano un fenotipo letale.

La letalità manifestata dai mutanti della regione *hinge* non è influenzata dalla presenza del dominio N-terminale, infatti, anche i mutanti privati di questa regione risultano letali (*fig.4.3.2.1*). I risultati non consentono di effettuare alcuna considerazione circa la sensibilità dei mutanti del perno alla CPT.

4.3.3 Attività specifica

Le proteine Top1, Topo70, P431G, R434A, R434C, P431G-70, R434A-70 e R434C-70 sono state purificate e la loro attività specifica valutata mediante saggio di rilassamento.

Uguali quantità di ciascuna proteina e diluizioni seriali delle stesse sono state incubate con DNA superavvolto negativamente, in presenza di una concentrazione finale di KCl pari a 150 mM. L'attività specifica delle proteine *full length* è stata confrontata con l'enzima Top1, (*fig.4.3.3.1*) mentre l'attività specifica dei mutanti 70 è stata confrontata con quella dell'enzima Topo70 (*fig.4.3.3.2*).

I prodotti di reazioni sono risolti in un gel di agarosio monodimensionale, colorati con etidio bromuro e visualizzate mediante trans illuminatore.

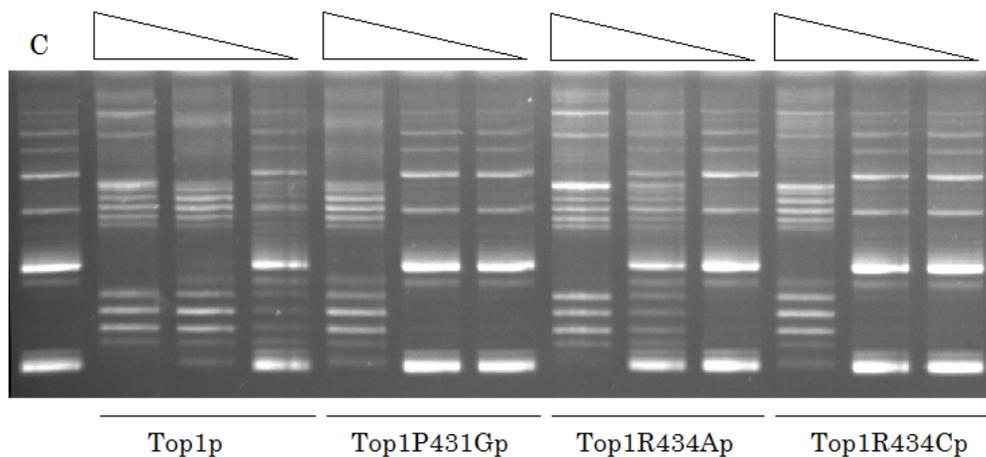


Figura 4.3.3.1 *Attività specifica della proteina WT e dei mutanti P431G,R434A e R434C.* Uguali quantità di ciascuna proteina , diluite serialmente di un fattore 10, sono incubate in presenza di 500 ng di DNA negativamente superavvolto. I prodotti di reazione sono risolti in gel di agarosio 1% e visualizzati dopo colorazione con etidio bromuro. C indica il controllo in cui il DNA non è stato incubato con alcun enzima.

I mutanti presentano un'attività specifica inferiore rispetto alla proteina WT, in particolare mentre l'enzima Top1 riesce a rilassare in modo efficace il DNA anche in diluizione 1/10 i mutanti riescono ad interagire in modo efficace con il substrato solo in condizioni di diluizione 1/1. L'attività dei mutanti privati del dominio N-terminale è stata confrontata con quello dell'enzima Topo70. I mutanti presentano un'attività specifica paragonabile a quella della proteina Topo70 ed in genere inferiore rispetto a quella degli enzimi *full lenght*. Questo calo di attività è dovuto alla mancanza del dominio N-terminale, infatti, enzimi privanti di questa regione evidenziano una minore affinità per il substrato.

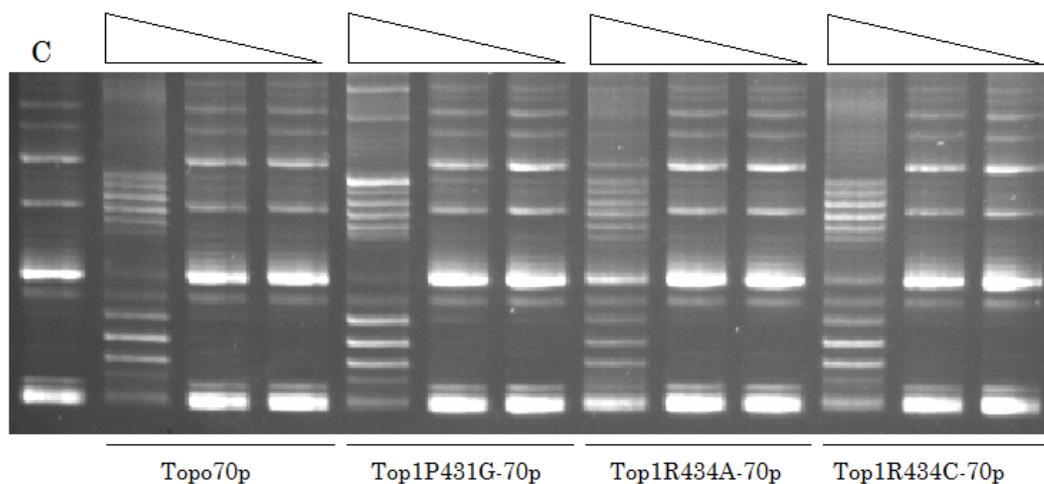


Figura 4.3.3.2 *Attività specifica della proteina Topo70 e dei mutanti P431G-70,R434A-70 e R434C-70.* Uguali quantità di ciascuna proteina , diluite serialmente di un fattore 10, sono incubate in presenza di 500 ng di DNA negativamente superavvolto. I prodotti di reazione sono risolti in gel di agarosio 1% e visualizzati dopo colorazione con etidio bromuro. C indica il controllo in cui il DNA non è stato incubato con alcun enzima.

L'analisi dei prodotti di reazione mediante ImageQuant rivela che in condizioni di diluizione 1/1 i mutanti presentano un'attività di rilassamento inferiore rispetto al WT e al Topo70 ma comunque paragonabile. In condizione di diluizione 1/10 le differenze diventano più marcate. Infatti l'enzima WT rilassa ancora il 65% del substrato mentre i mutanti *full length* rilassano meno del 10% del DNA (*fig.4.3.3.3*).

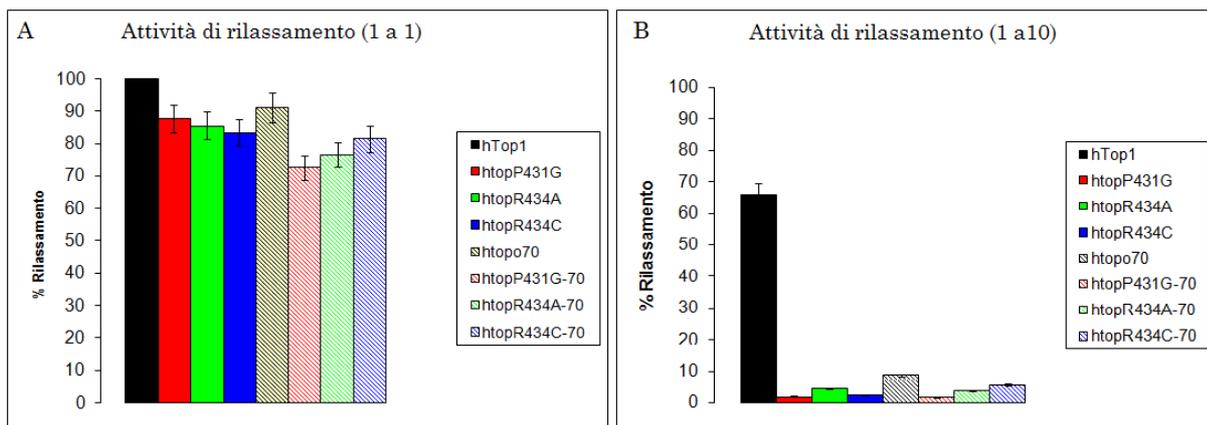


Figura 4.3.3.3 *Analisi grafica dell'attività specifica dei vari mutanti.* (A) L'attività specifica in condizioni di diluizione 1/1 è stata valutata mediante analisi del gel condotta con ImageQuant. (B) La stessa analisi è stata condotta anche in condizioni di diluizione 1/10 evidenziando che in tale contesto sperimentale solo l'enzima WT è in grado di rilassare il substrato in modo efficiente.

4.3.4 Saggio di rilassamento a diverse forze ioniche

Per stimare l'affinità dei mutanti per il DNA sono stati effettuati dei saggi di rilassamento a diverse forze ioniche in condizioni di diluizioni seriali.

Tutti i mutanti della regione *hinge* presentano un massimo di attività a 100 mM KCl mentre la proteina Top1 evidenzia un picco di attività a 150 mM KCl. (*fig 4.3.4.1*). La percentuale di DNA rilassato è stata determinata mediante analisi con ImageQuant e plottata in funzione delle diverse concentrazioni saline presenti nella soluzione. I risultati dell'analisi sono riportati in *fig.4.3.4.2*.

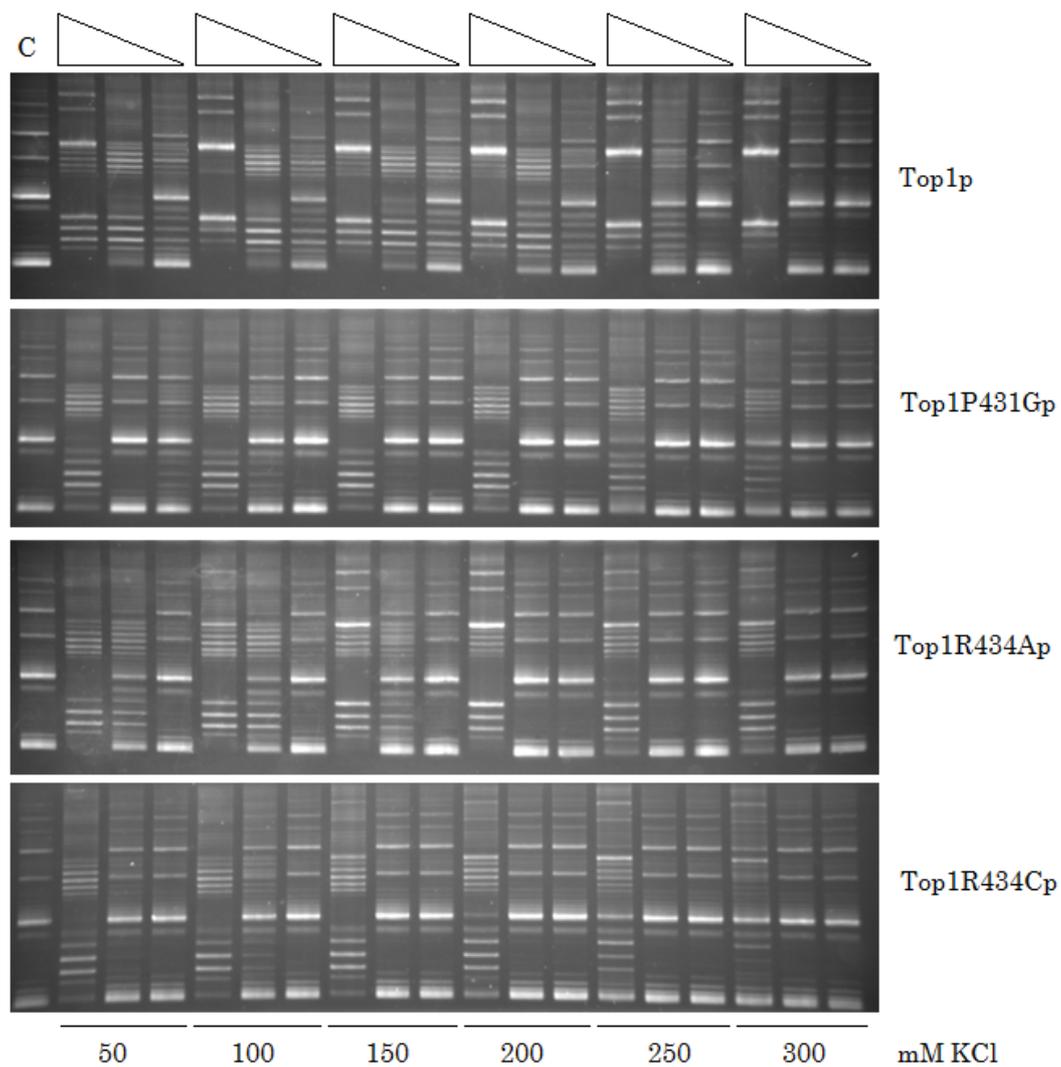


Figura 4.3.4.1 Saggio di rilassamento in diluizioni seriali a diverse forze ioniche Quantità limitate di proteina WT o dei mutanti P431G, R434A e R434C sono incubate con DNA plasmidico a 37°C in presenza di diverse concentrazioni di KCl. I prodotti di reazioni sono risolti un gel monodimensionale di agarosio all' 1% come descritto nei materiali e metodi.

Nel grafico è evidente che l'andamento nella reazione di rilassamento è del tutto paragonabile a quello dell' enzima WT e centrato intorno a 100 mM KCl.

Gli stessi esperimenti sono stati condotti per i mutanti privati del dominio N-terminale e confrontati con l' enzima Topo70.

La proteina Topo70 presenta un massimo di attività a 100 mM KCl così come i mutanti della regione *hinge*.

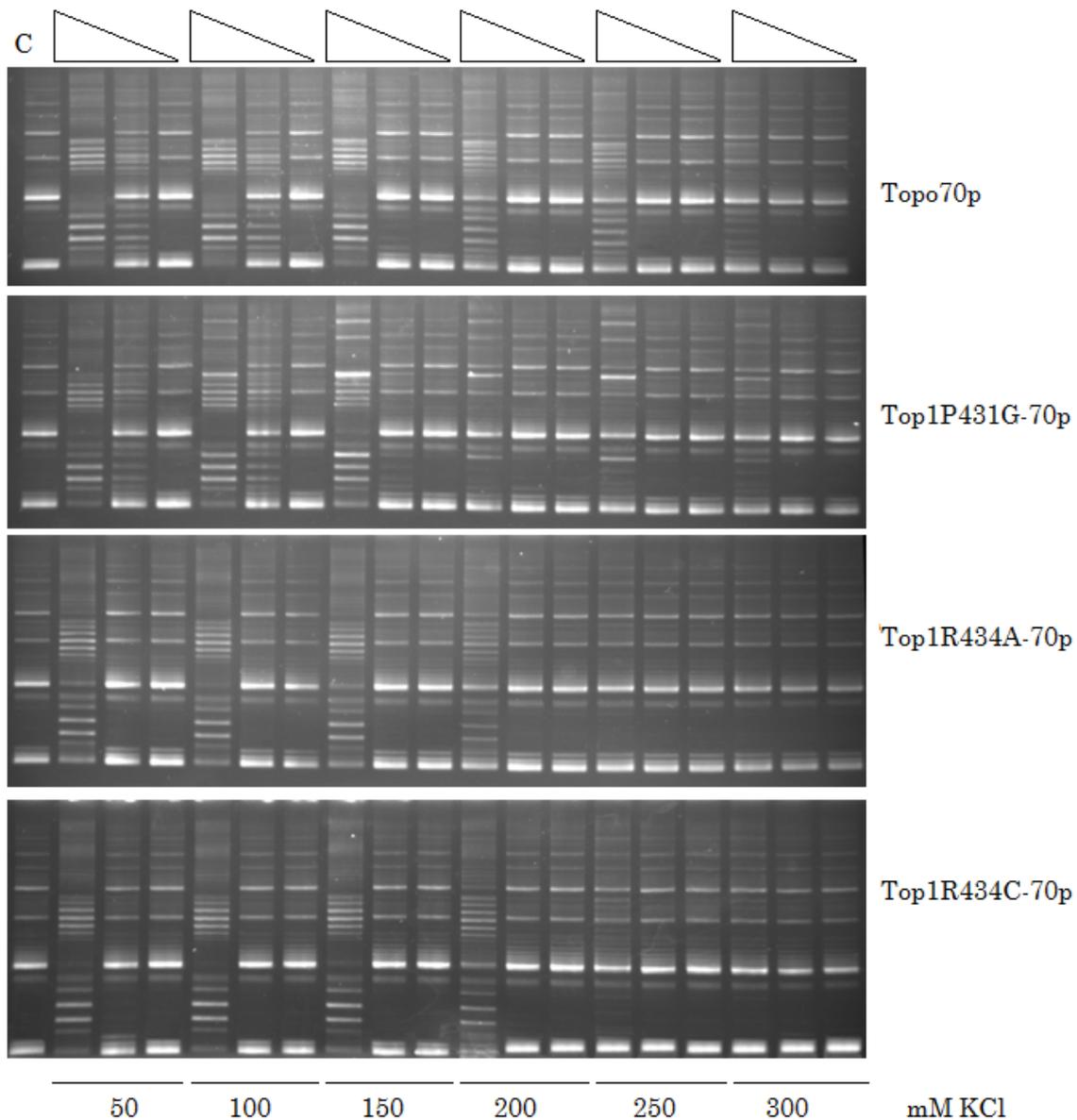


Figura 4.3.4.2 Saggio di rilassamento in diluizioni seriali a diverse forze ioniche Quantità limitate di proteina Topo70 o dei mutanti P431G-70, R434A-70 e R434C-70 sono incubate con DNA plasmidico a 37°C in presenza di diverse concentrazioni di KCl. I prodotti di reazioni sono risolti un gel monodimensionale di agarosio all' 1% come descritto nei materiali e metodi.

Il dato più interessante che emerge dall'analisi dei gel è la perdita della capacità di interagire con il DNA già a 250 mM KCl. Infatti mentre l'enzima Topo70 riesce a rilassare il DNA con bassa efficienza in condizioni di diluizione 1/1 a 300 mM KCl i mutanti sono capaci di rilassare il DNA sino a 200 mM KCl.

L'analisi grafica dei risultati mostra per i mutanti un andamento del tutto paragonabile all' enzima Topo70, infatti, la curva di reazione presenta lo stesso andamento e risulta traslata verso il basso (fig.4.3.4.3).

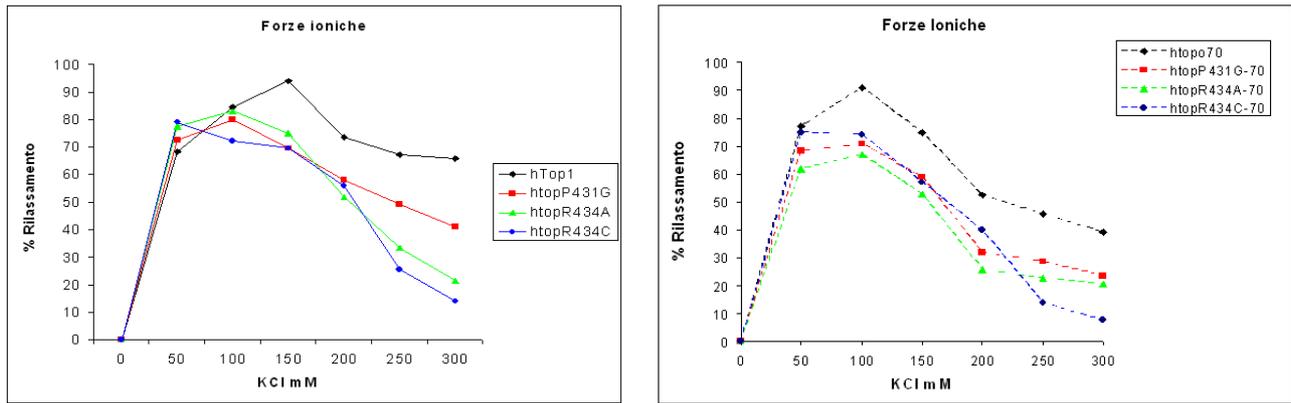


Figura 4.3.4.3 Analisi grafica dei saggi di rilassamento a diverse forze ioniche. Le percentuali del DNA rilassato da ciascuna proteina in funzione della forza ionica presente nella soluzione sono riportate in grafico e costituiscono la media di tre diversi esperimenti. La banda di errore indica la deviazione standard. (Top1—◆—, P431G—■—, R434A—▲— e R434C—●— / Topo70—◆—, P431G-70—■—, R434A-70—▲— e R434C-70—●—)

4.3.5 Cinetiche di rilassamento in eccesso di DNA

Al fine di valutare l'attività di rilassamento sono eseguite delle cinetiche di rilassamento in condizioni di eccesso di DNA. Uguali quantità di proteine sono incubate con DNA superavvolto negativamente in presenza di una concentrazione finale pari a 150 mM KCl. I prodotti della reazione sono risolti su un gel di agarosio monodimensionale, colorati con etidio bromuro e visualizzati mediante trans illuminatore.

In queste condizioni l'enzima WT rilassa il DNA con alta efficienza, evidenziando un tipo di comportamento processivo. La reazione di topoisomerizzazione è portata a compimento già dopo 30 secondi. Il mutante Top1P431G è meno efficiente nel rilassare il substrato e la reazione di topoisomerizzazione procede secondo un andamento distributivo, come può si può notare dalla distribuzione dei topoisomeri isolati nel gel a 30 secondi dall' inizio della reazione. Anche i mutanti top1R434A e top1R434C presentano una minore attività rispetto al WT e sono caratterizzati da un comportamento maggiormente distributivo. In genere una minore attività e un meccanismo di rilassamento distributivo possono essere dovuti o ad alterazioni nell' affinità per il substrato o ad alterazioni nella fase di taglio e riligazione. I dati ottenuti dai saggi di rilassamento a diverse forze ioniche rivelano la presenza di un picco di attività a concentrazioni di KCl inferiori ma comunque paragonabili alla proteina WT (fig 4.3.5.1 e fig.4.3.5.2).

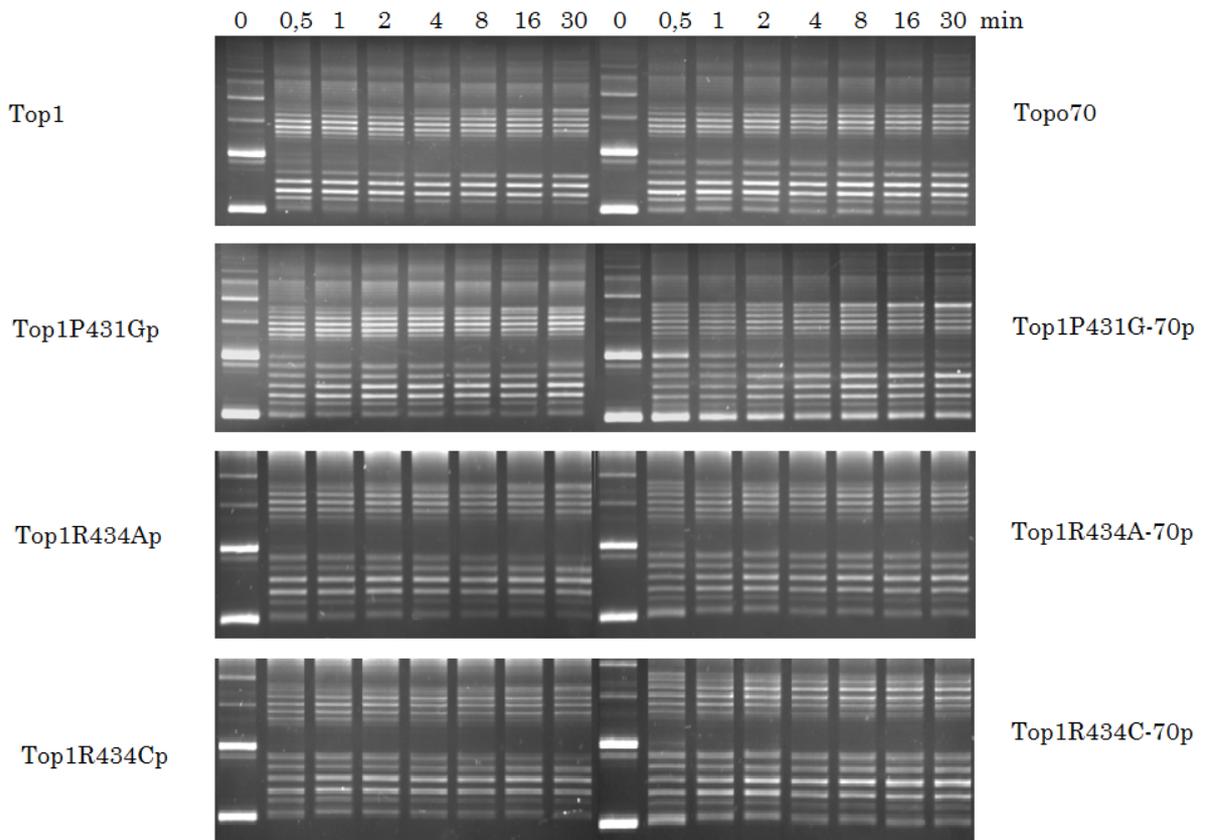


Figura 4.3.5.1 *Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di DNA. Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti e risolte in un gel di agarosio all' 1%.*

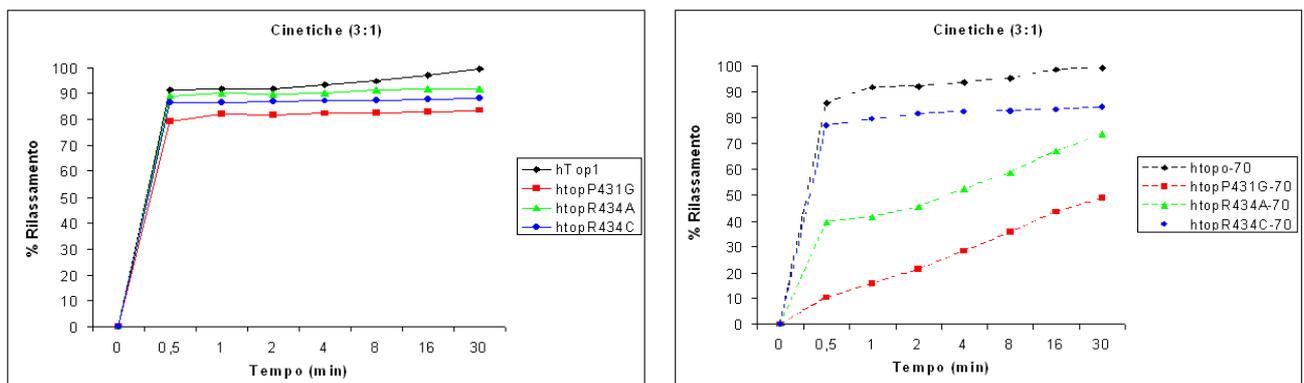


Figura 4.3.5.2 *Analisi grafica delle cinetiche di rilassamento in condizioni di eccesso di DNA . Le percentuali del DNA rilassato da ciascuna proteina in funzione del tempo sono riportate in grafico e costituiscono la media di tre diversi esperimenti. La banda di errore indica la deviazione standard. (Top1—◆—, P431G—■—, R434A—▲— e R434C—●— / Topo70 ---◆---, P431G-70---■---, R434A-70---▲--- e R434C---●---)*

L'enzima Topo70 presenta un comportamento processivo e rilassa completamente il DNA già dopo 30 secondi. I mutanti 70 della regione *hinge* presentano un andamento della reazione di rilassamento distributivo ed inoltre risultano molto meno efficienti nel promuovere la reazione di topoisomerizzazione. In particolare il mutante

top1P431G-70p non porta a compimento la reazione di rilassamento, infatti dopo 30min è ancora presente del DNA superavvolto negativamente. La percentuale del DNA rilassato in funzione del tempo è stata calcolata per ogni mutante e riporta nel grafico in *fig.4.3.5.2*.

Come evidenziata dall'analisi grafica i mutanti *full lenght* possiedono una cinetica di reazione che presenta un andamento paragonabile a quello dell'enzima WT anche se si associa ad una ridotta attività catalitica.

La situazione risulta più complessa nel caso dei mutanti privati del dominio N-terminale. Infatti le proteine Topo70 e top1R434C-70p hanno un comportamento paragonabile in termine di andamento della reazione anche se la seconda è meno attiva della prima. Il mutante topR434A-70p dopo un prima fase di crescita esponenziale presenta un andamento della reazione lineare. Questo mutante non è in grado di rilassare completamente il substrato infatti dopo 30min è presente ancora un 30% di DNA superavvolto. Il mutante topP431G-70p invece presenta un andamento della reazione che risulta lineare durante tutto il saggio ed associata a una bassa efficienza, infatti dopo 30 min è presente ancora il 50 % del substrato.

4.3.6 Cinetiche di rilassamento in eccesso di Proteina

I difetti evidenziati nelle cinetiche di rilassamento in condizione di eccesso di substrato potrebbero essere causati da alterazioni nella fase di dissociazione dell'enzima dal substrato e come tali associati ad un comportamento distributivo. Questo fenotipo può essere revertito se i saggi vengono condotti in eccesso di enzima. Infatti in tale condizione ogni molecola di DNA sarà legata almeno da una molecola di enzima e quindi lo stato limitante la reazione di topoisomerizzazione non sarà più rappresentata dalla dissociazione dell'enzima dal substrato.

In queste condizioni sia l'enzima WT che Topo70 presentano un andamento della reazione che risulta processivo; infatti portano a compimento la reazione di topoisomerizzazione dopo 4 secondi. I mutanti *full lenght* sono in grado di rilassare completamente il substrato con un'efficienza inferiore rispetto alla Top1. I mutanti topo70 presentano un'attività inferiore rispetto al Topo70 che si associa ad una maggiore distributività (*fig.4.3.6.1*).

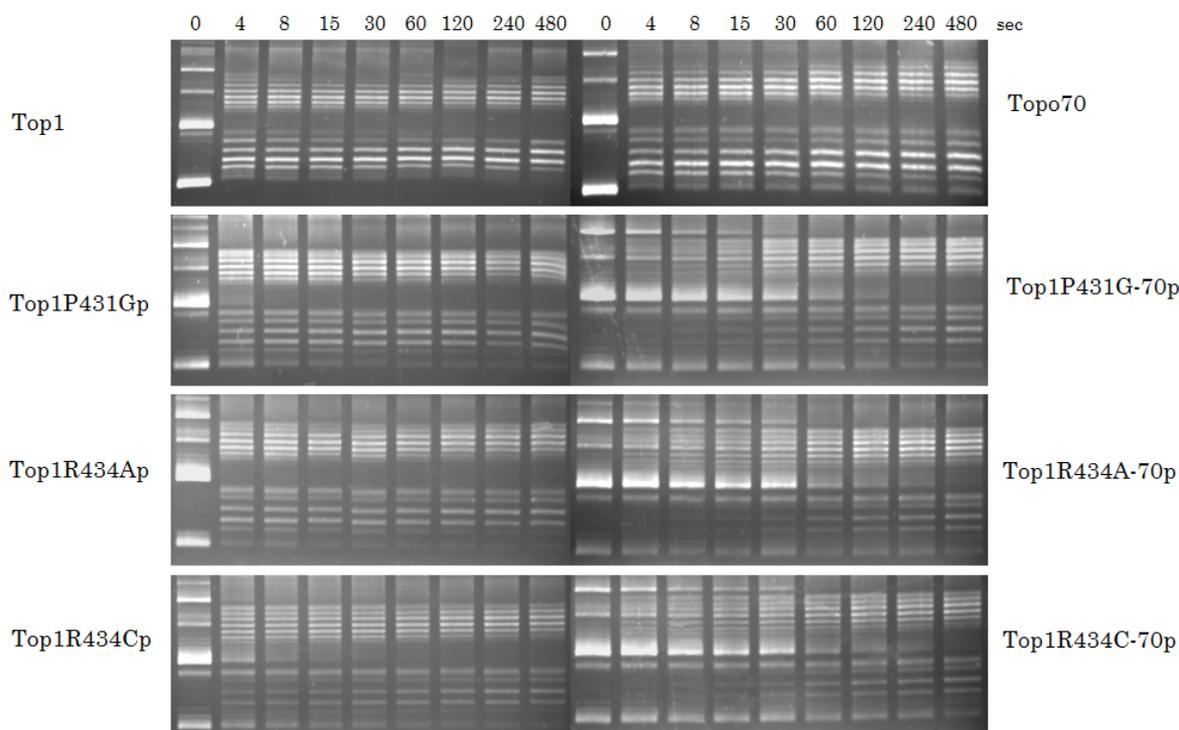


Figura 4.3.6.1 *Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di Proteina.* Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti e risolte in un gel di agarosio all' 1%.

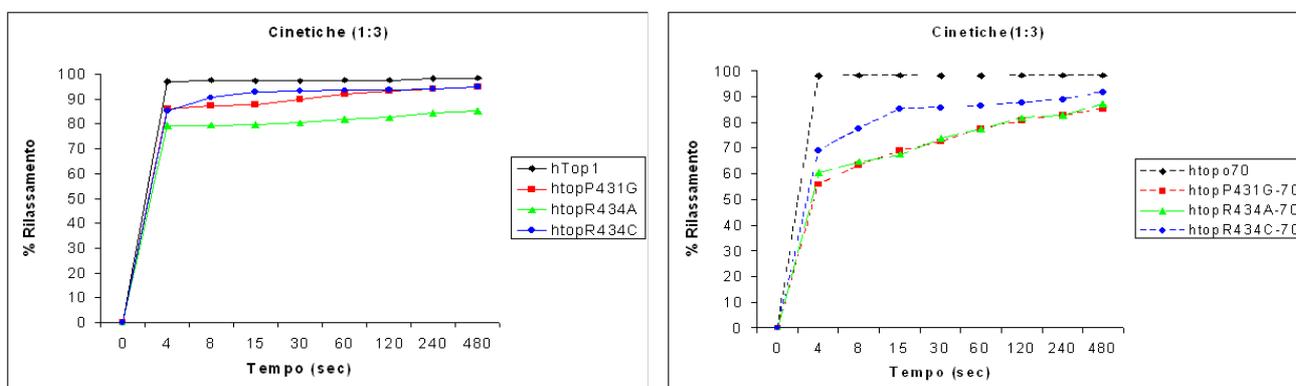


Figura 4.3.6.2 *Analisi grafica delle cinetiche di rilassamento in condizioni di eccesso di Proteina .* Le percentuali del DNA rilassato da ciascuna proteina in funzione del tempo sono riportate in grafico e costituiscono la media di tre diversi esperimenti. La banda di errore indica la deviazione standard. (Top1—◆—, P431G—■—, R434A—▲— e R434C—●— / Topo70 ---◆---, P431G-70---■---, R434A-70---▲--- e R434C---●---)

In queste condizioni è evidente che i mutanti top1R434A-70p e top1P431G-70p recuperano i difetti evidenziati nella cinetica in eccesso di DNA. Infatti presentano un andamento che ritorna ad essere esponenziale anche se la curva risulta spostata verso il basso e come tale associata ad una minore efficienza (fig 4.3.6.2).

In un gel monodimensionale di agarosio le molecole di DNA rilassato e niccato comigrano alla stessa altezza risultando indistinguibili (*fig.4.3.6.3A*). Le molecole di DNA sequestrate nel complesso covalente non possono entrare nelle maglie del gel e quindi l'informazione riguardante gli intermedi di taglio viene persa. Normalmente poiché l'equilibrio della reazione risulta spostato verso la riligazione la quota dei complessi di taglio intrappolati durante ciascun prelievo è irrilevante. Nel caso in cui si analizzi il comportamento di mutanti che presentano un equilibrio della reazione spostato verso il taglio il numero delle molecole di DNA intrappolate nei complessi di taglio diventa significativo rispetto al totale (*fig.4.3.6.3.B*).

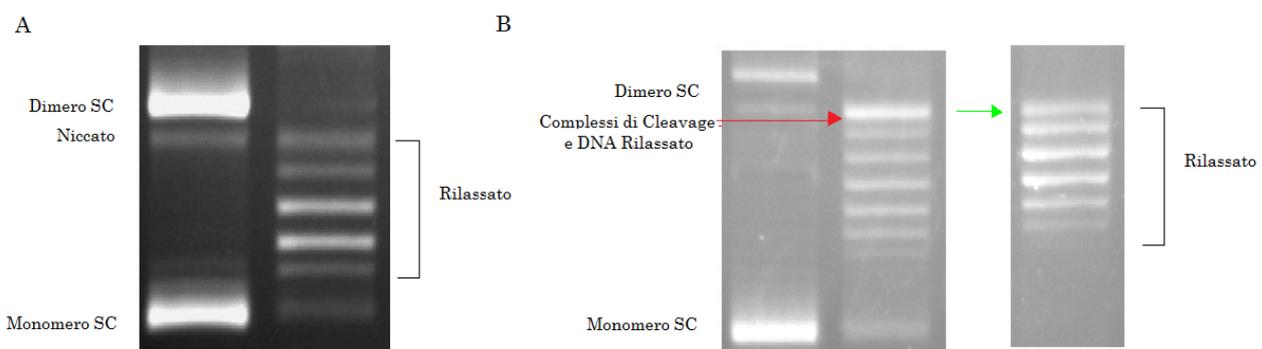


Figura 4.3.6.3 Migrazione delle diverse specie topologiche in un gel monodimensionale di agarosio. (A) In un gel monodimensionale di agarosio le molecole superavvolte migrano più velocemente rispetto al DNA rilassato. Le molecole niccate comigrano con le rilassate. (B) Nel caso in cui i campioni vengano trattati con Proteinasi K anche i complessi di taglio riescono ad entrare nel gel e comigreranno con le molecole di DNA rilassato. Nel corso della cinetica il segnale dalla banda corrispondente ai complessi di taglio diminuisce a favore del DNA rilassato.

Il trattamento dei campioni con proteinasi K consente di frammentare l'enzima lasciando una coppia di amminoacidi legata covalentemente alle molecole di DNA coinvolte nei complessi di taglio. A seguito della digestione enzimatica le molecole di substrato intrappolate nei complessi covalenti potranno entrare nel gel e comigreranno insieme a uno dei topoisomeri corrispondente alle molecole di DNA rilassato. Nel corso della cinetica di rilassamento il segnale della banda corrispondente a queste specie molecolari diminuirà a favore del DNA rilassato.

Al fine di valutare l'eventuale formazione di complesso di taglio e quindi lo spostamento dell'equilibrio della reazione verso il taglio sono stati effettuati delle cinetiche di rilassamento in condizione di eccesso di proteina seguite dalla digestione con proteinasi K (*fig.4.3.6.4*)

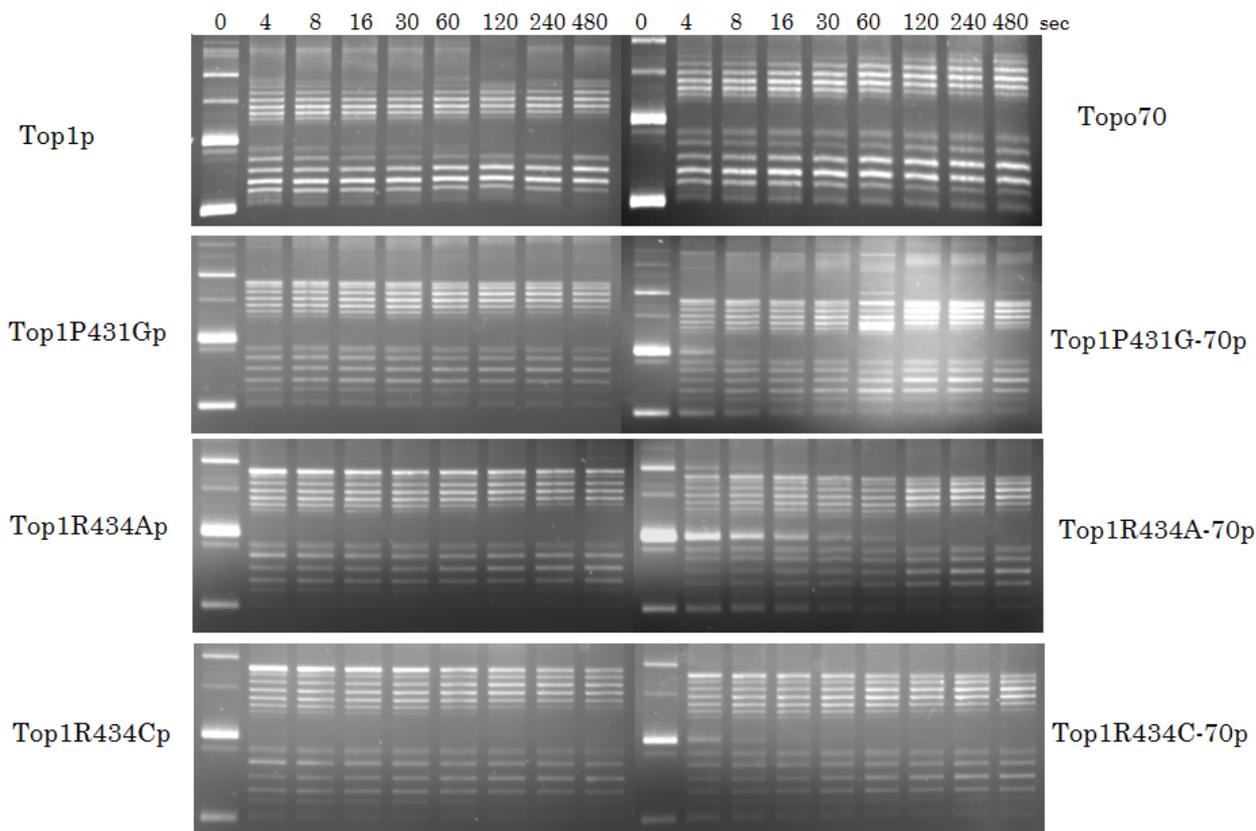


Figura 4.3.6.4 *Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di Proteina.* Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti, trattate con Pk (1mg/ml per 30 min a 37°C) e risolte in un gel di agarosio all' 1%.

In queste condizioni né l'enzima WT né il Topo70 accumulano un quantitativo significativo di complessi di taglio confermando lo spostamento dell'equilibrio di reazione verso la religazione.

I mutanti P431G e P431G-70 pur possedendo un comportamento distributivo non sono caratterizzati da un accumulo degli intermedi di reazione.

Il mutante R434, invece, evidenzia un notevole accumulo di complessi di taglio il cui numero diminuisce nel corso della cinetica. Questo comportamento è riscontrato anche in assenza del dominio N-terminale e si associa ad una maggiore distributività probabilmente dovuta alla minore attività proteica.

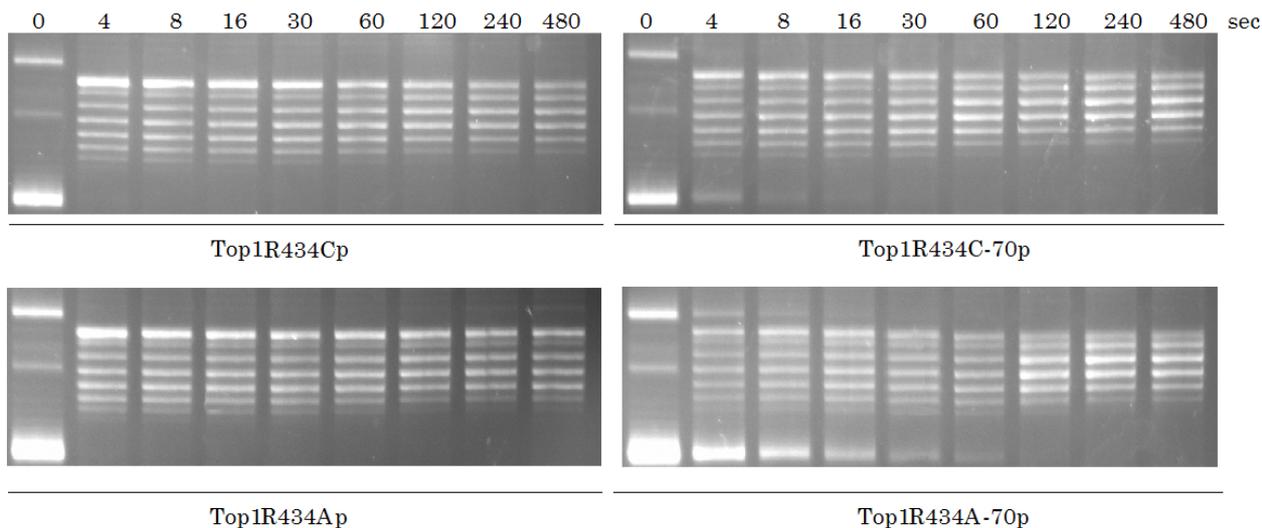


Figura 4.3.6.5 *Cinetica di rilassamento in condizioni di eccesso di Proteina .Analisi del dimero.* Uguali quantità di ciascuna proteina sono incubate con DNA superavvolto negativamente ed incubato a 37°C. Aliquote sono prelevate a tempi definiti , trattate con Pk (1mg/ml per 30 min a 37°C) e risolte in un gel di agarosio all' 1%.

Lo spostamento dell'equilibrio della reazione verso il taglio è presente anche nel caso dei mutanti R434C e R434C-70 (*fig. 4.3.6.5*).

4.3.7 Saggio di taglio

Per valutare la capacità della CPT di intrappolare i complessi covalenti sono stati condotti dei saggi di taglio. Uguali quantità della proteina WT, Topo70, P431G e P431G-70 sono incubate con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in una soluzione 50 mM KCl in presenza o meno della CPT. La reazione è bloccata mediante aggiunta di SDS e i prodotti risolti in un gel di sequenziamento (7M Urea, 8% Acrilamide).

Quando la proteina WT è incubata con DMSO non viene bloccato alcun complesso di taglio mentre si registra un drammatico incremento in presenza dell' inibitore. Il mutante P431G presenta bande sia in assenza che in presenza di CPT .Il loro numero aumenta in presenza dell'inibitore determinando un distribuzione dei prodotti paragonabile a quella ottenuta con la Top1. Questi dati indicano che la mutazione dell' ipotetico perno non altera la capacità dell' inibitore di bloccare i complessi di taglio sul DNA. In assenza di inibitore si riscontrano tagli su siti intrappolati dalla CPT ma non corrispondenti al sito preferenziale, inoltre i prodotti della reazione sono collocati nella parte superiore del gel e corrispondenti a frammenti di DNA grandi (*fig. 4.3.7.1*).

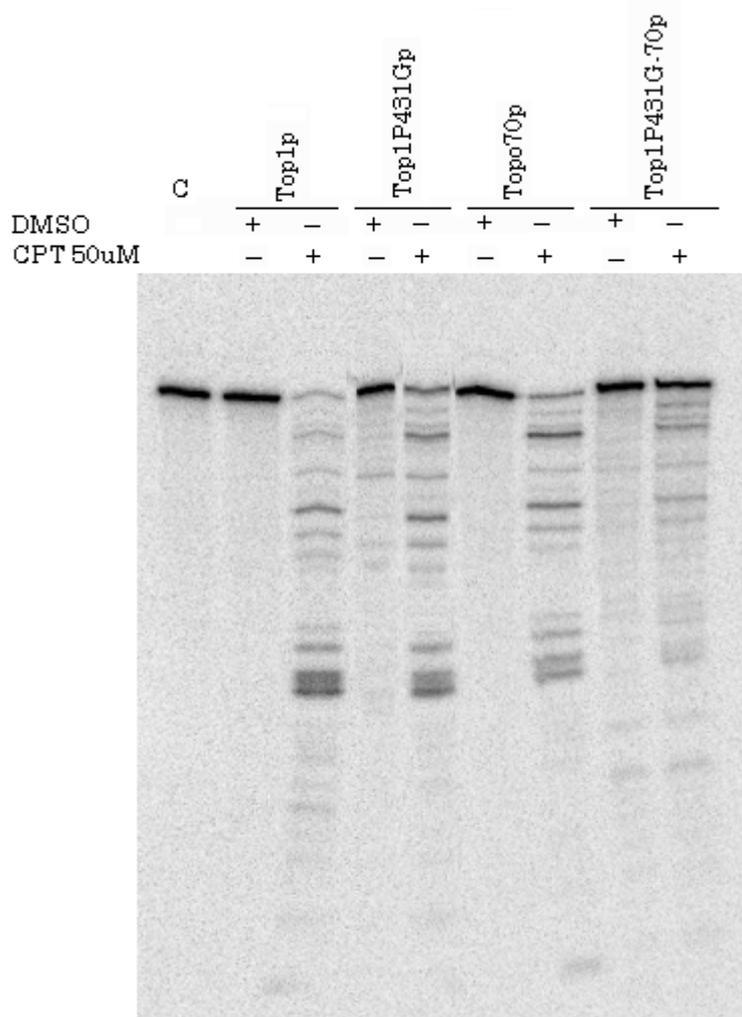


Figura 4.3.7.1 Equilibrio taglio-riligazione.

Uguali concentrazioni delle proteine Top1p, Top1P431Gp, Topo70p, e Top1P431G-70p sono incubati con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in presenza o meno della CPT. Dopo 30 min la reazione è bloccata con SDS 0,5% e i prodotti risolti in un gel denaturante 7M Urea-8% acrilamide. C indica il controllo in cui non è stato inserito alcun enzima.

L'enzima Topo70 presenta un comportamento equivalente a quello della proteina WT confermando che l' assenza del dominio N-terminale non altera la specificità del riconoscimento del complesso binario da parte della CPT. Il mutante topP431G-70 in presenza di CPT evidenzia una distribuzione dei prodotti di reazione equivalente a quella dell' enzima Topo70 anche se l'intensità delle bande risulta inferiore .Al contrario in assenza di inibitore si osserva la presenza di alcuni complessi di taglio che risultano collocati nella parte inferiore del gel e corrispondenti a frammenti di DNA corti , in cui il taglio enzimatico ha avuto luogo in prossimità dell' estremità 3'.

Lo stesso saggio è stato condotto sui mutanti R344A, R434C, R434A-70 e R434C-70, i risultati sono riportati in *fig. 4.3.7.2* e *fig. 4.3.6.3*

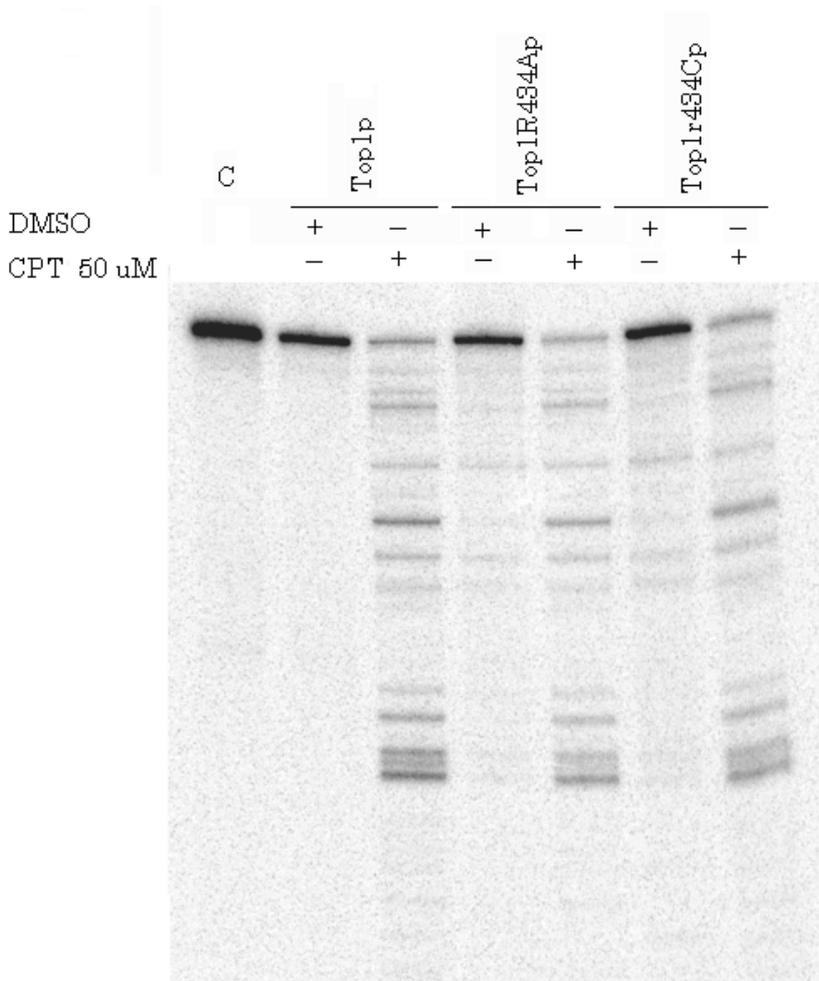


Figura 4.3.7.2 Equilibrio taglio-riligazione.

Uguali concentrazioni delle proteine Top1p, Top1R434Ap, e Top1R434Cp sono incubati con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in presenza o meno della CPT. Dopo 30 min la reazione è bloccata con SDS 0,5% e i prodotti risolti un gel denaturante 7M Urea-8% acrilamide. C indica il controllo in cui non è stato inserito alcun enzima.

Sia il mutante R434A che R434C presentano un drammatico incremento nei prodotti di reazione in presenza di CPT, con una distribuzione che risulta equivalente rispetto a quella ottenuta con l'enzima Top1. Questi risultati confermano che mutazioni a carico dell'arginina 434 non alterano la capacità della CPT di bloccare gli intermedi di taglio. In assenza di inibitore sia nel caso dell'R434A che dell'R434C vengono bloccati alcuni intermedi di reazione che risultano collocati nella metà superiore del gel e corrispondono a frammenti di DNA piuttosto lunghi. Anche in questo caso in assenza di CPT il taglio non ha luogo sul sito preferenziale ma su altri siti che vengono comunque riconosciuti e bloccati dalla CPT (fig.4.3.7.2).

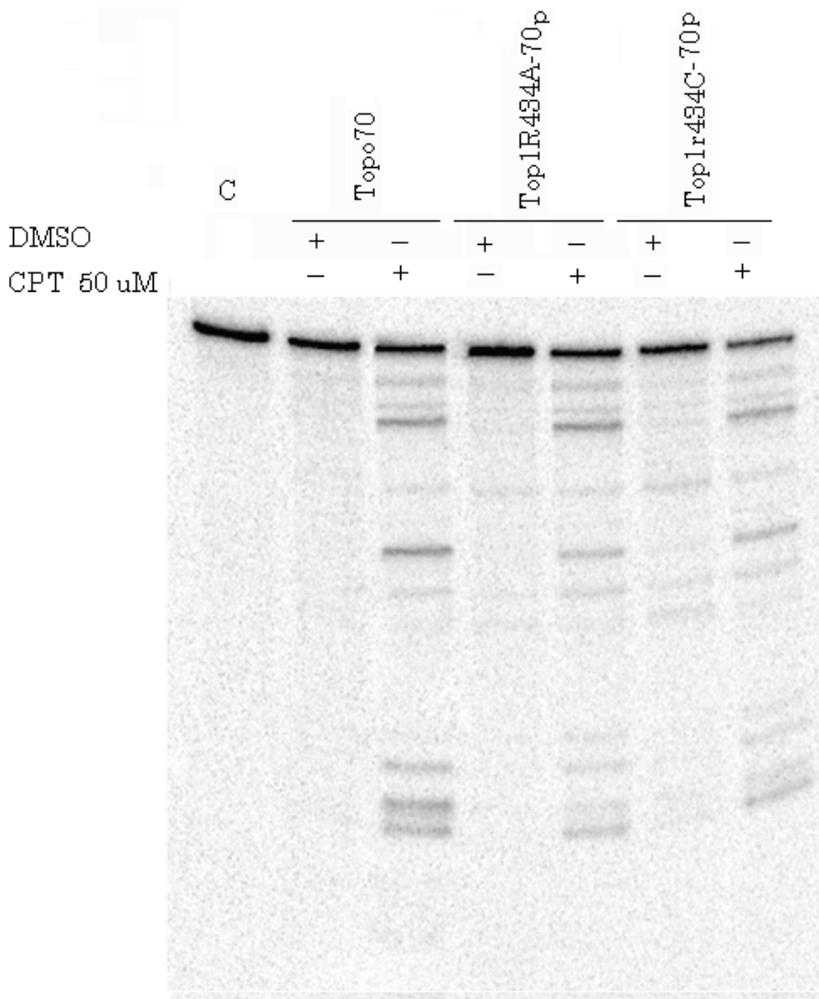


Figura 4.3.7.3 Equilibrio taglio-riligazione.

Uguali concentrazioni delle proteine Topo70p, Top1R434A-70p, e Top1R434C-70p sono incubati con un frammento di DNA lungo 900 coppie di basi marcato ad una delle estremità 3' in presenza o meno della CPT. Dopo 30 min la reazione è bloccata con SDS 0,5% e i prodotti risolti un gel denaturante 7M Urea-8% acrilamide. C indica il controllo in cui non è stato inserito alcun enzima.

Nel caso dei mutanti R434A-70 e R434C-70 si registra un comportamento paragonabile a quello riscontrato per le proteine *full length*. Infatti, in presenza di CPT i tagli sono paragonabili al Topo70, mentre in assenza di inibitore sono presenti dei segnali deboli in corrispondenza della metà superiore del gel. La posizione relativa delle bande è la stessa ottenuta per le proteine R434A e R434C ma la loro intensità è diminuita e come tale corrispondente ad un minor numero di complessi .

Quindi al contrario del mutante P431G la mancanza del dominio N-terminale non altera la specificità di interazione con il substrato né il fenotipo. I dati ottenuti in questi saggi confermano i risultati evidenziati dalle cinetiche di rilassamento seguite da digestione con proteinasi K, cioè uno spostamento dell'equilibrio della reazione verso il taglio, almeno per i mutanti della posizione 434 (*fig. 4.3.7.3*).

5 Discussioni

Numerosi evidenze sperimentali provano che il dominio linker regola la dinamica enzimatica. Studi biochimici su enzimi ricostituiti dimostrano, che alterazioni a carico di questa regione si traducono in una riduzione del legame al DNA e nella presenza di un meccanismo di rilassamento distributivo (Stewart et al., 1997; Ireton et al., 2000). La mutazione A653P, situata nel dominio linker, provoca uno spostamento nell'equilibrio della reazione verso la ricucitura, causato da un incremento nella motilità del dominio linker. L'introduzione della prolina determina l'interruzione di una struttura α -elicoidale, che è contenuta in una sovrastruttura a spirale ritorta, imponendo una riorganizzazione dell'intera regione. La Top1 perde così un dominio che funge da freno nella reazione di topoisomerizzazione, determinando una minimizzazione nel tempo di esistenza dell'intermedio covalente proteina-DNA. Diminuiscono così le possibilità di formazione di un complesso ternario da parte della camptotecina (CPT), che interviene dopo la reazione di taglio. Per questo motivo il mutante A653P dimostra di essere resistente alla CPT (Fiorani et al., 2003). Un certo grado di flessibilità è richiesto sia per il legame dell'enzima al DNA che per la rotazione stessa del DNA entro la cavità enzimatica. Recentemente esperimenti in *single molecule* hanno evidenziato che la rotazione del filamento a valle del sito di taglio determina un forte attrito entro la cavità enzimatica, suggerendo la presenza di interazioni dinamiche tra i vari domini proteici (Koster et al., 2005). In particolare interazioni tra il dominio linker e il DNA potrebbero generare alcune attriti fondamentali per frenare la rotazione del substrato entro la cavità proteica. La catena laterale della treonina 718 (Thr 718) forma un legame idrogeno con il gruppo fosfato della guanina in posizione +2 sul filamento scissile. Stacker et al., ipotizzarono che tale interazione potrebbe essere critica nel posizionamento del gruppo uscente 5'-OH sul filamento scissile per l'attacco nucleofilo contro l'intermedio fosfotirosinico, che ripristina l'integrità della doppia elica (Stacker et al., 2002; Megonigal et al., 1997; Fiorani et al., 1999). Esperimenti di dinamica molecolare supportano l'ipotesi per cui le interazioni tra la Thr718 e la base in +2 siano necessarie per posizionare la base in+1 affinché la reazione di riligazione possa avvenire in modo efficace. La mutazione T718A sopprime le interazioni con la guanina del filamento scissile determinando uno

spostamento dell' equilibrio della reazione verso il taglio e di conseguenza provocando un fenotipo letale (Chillemi et al., 2004). Studi strutturali e biochimici forniscono scarse evidenze sul fatto che la flessibilità del dominio linker possa influenzare la geometria del sito attivo alterandone la catalisi enzimatica e la resistenza alla CPT. Per verificare questa ipotesi le due mutazioni sono state combinate in un doppio mutante al fine di valutare se l'incremento nella flessibilità del dominio linker, (Fiorani et al., 2003) provocato dalla mutazione A653P, possa eliminare i difetti nella riligazione causati dalla mutazione T718A (Chillemi et al., 2005). Il doppio mutante top1A653P-T718A se espresso in lievito, risulta vitale e resistente alla CPT. La capacità di formare colonie in terreni contenenti inibitori selettivi è tipica di enzimi resistenti o inattivi. Il doppio mutante risulta attivo *in vivo* e presenta un'attività *in vitro* che è circa 20 volte inferiore rispetto al WT. L'esistenza di un meccanismo di rilassamento distributivo e di un optimum salino di attività pari a 50 mM KCl, indica la presenza di alterazioni nel legame del substrato. Il tasso di cleavage ridotto, riscontrato nei saggi di taglio, effettuati utilizzando un substrato suicida, dimostra che i residui del sito attivo ed il dominio linker agiscono in modo concertato controllando sia la fase di legame al substrato che quella di taglio. Inoltre il saggio di taglio evidenzia che sia in presenza che in assenza di CPT, nel caso del doppio mutante, i prodotti di reazione sono collocati nella parte superiore del gel e corrispondono a frammenti di DNA lunghi più di 250 coppie di basi. Questi risultati indicano che il doppio mutante necessita di un lungo tratto a doppio filamento a valle del sito di taglio, suggerendo che il suo legame al DNA è profondamente influenzato da alterazioni strutturali comprese le estremità del doppio filamento. L'analisi dei prodotti di reazione rivela che il DM taglia il substrato in siti diversi rispetto all' enzima WT suggerendo che anche la sequenza è in grado di influenzare il legame della proteina al DNA. L'esistenza di un alterata capacità di legame è confermata dall' incapacità del mutante di interagire con *duplex* parziali o con substrati più corti di 100 coppie di basi. Queste osservazioni confermano la necessità di una regione a doppio filamento a valle del sito di taglio. Alterazioni simili nell' interazione con il substrato non sono presenti nei singoli mutanti T718A e A653P. I difetti nel binding potrebbero essere alla base anche della resistenza alla CPT. Infatti sebbene il doppio mutante presenti una capacità di taglio inferiore rispetto al WT, in assenza di inibitore il tasso di riligazione risulta comparabile tra i due enzimi e nel caso della proteina

Top1A653P-T718Ap scarsamente influenzato dalla CPT. Probabilmente le alterazioni a carico dell'interazione proteina-DNA influenzano anche il legame della CPT all'intermedio covalente. La formazione del complesso ternario richiede la presenza di una corretta geometria del complesso binario. Quindi cambiamenti nella flessibilità o nell'orientamento del linker rispetto al sito attivo sono in grado di alterare la catalisi enzimatica e la sensibilità alla CPT (Losasso et al., 2007). La posizione del dominio linker rispetto al sito attivo è controllata da interazioni stabilite tra dominio C-terminale, core e linker stesso (Stacker et al., 2002). In particolare la Thr 729, situata nell' α -elica 21, stabilisce interazioni con la Tyr 619 a Asp 725. Tali interazioni contribuirebbero al corretto posizionamento dell' Asn722 posto all' apice dell' α -elica 21. Questo residuo stabilisce un legame idrogeno mediato dall' acqua con le CPTs coadiuvando il legame del farmaco e la formazione del complesso ternario. Mutazioni del Asn722 e del suo analogo in lievito (Asn726) causano resistenza alle CPT (fig.5.1).

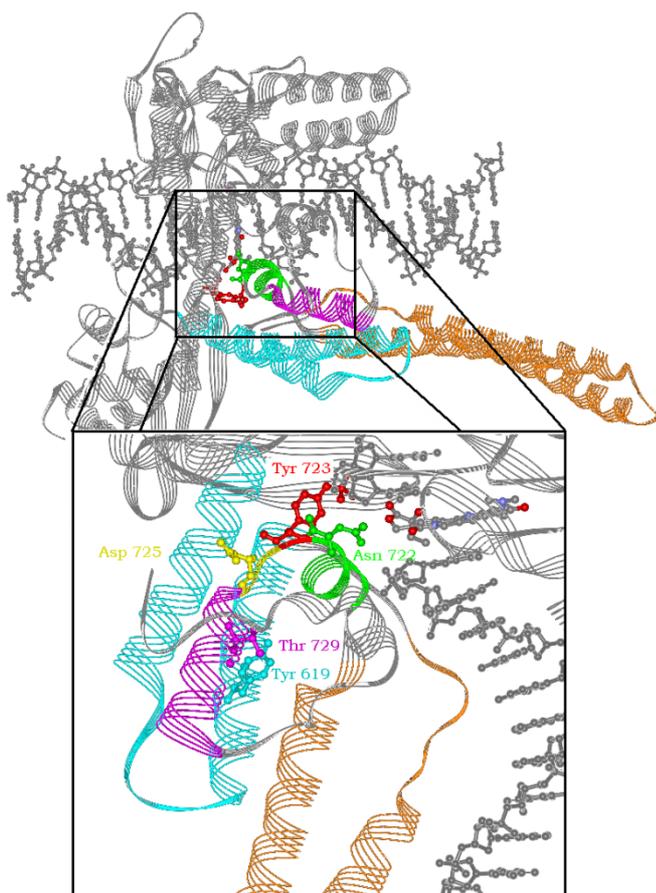


Figura 5.1. Interazioni stabilite dalla Thr729.

Le immagini mostrano le α -eliche 21 (viola), 20 (verde), situate nel dominio C-terminale, le α -eliche 16 e 17 (azzurro) del core, le α -eliche 18 e 19 (arancio) del linker. Sono evidenziate la Thr729 (viola) che stabilisce contatti molecolari con la Tyr619 (azzurro), la Asp725 (giallo). Inoltre sono rappresentate la Tyr723 (rosso) e il residuo Asn722 (verde).

Le interazioni stabilite dalla Thr729 potrebbero contribuire a posizionare correttamente il residuo Asn722 coinvolto in un legame mediato dall'acqua con le CPT. Le α -eliche 16, 17 e 21 formano un cluster idrofobico che controlla la posizione del dominio linker rispetto al sito attivo e alla regione perno.

Mutazioni della Thr729 potrebbero alterare pesantemente la rete di interazioni stabilite da questo residuo influenzando le interazioni stabilite tra i vari domini e quindi la catalisi enzimatica.

La mutazione T729A è stata isolata per la prima volta in linee cellulari tumorali (PC-7/CPT) resistenti all' analogo della CPT, irinotecano, di un fattore compreso tra 5 e 10

rispetto alle parentali (Kubota et al., 1992). Il mutante T729A quando espresso in *S. cerevisiae*, risulta vitale e sensibile alle CPT in modo paragonabile alla proteina WT. Questi risultati indicano la presenza di differenze tra il sistema lievito e le linee cellulari. In realtà i meccanismi che inducono resistenza alle CPTs, in linee cellulari, sono estremamente complessi e non sempre riconducibili ad alterazioni strutturali del *target* (Zeshaan et al. 2003). Per chiarire il ruolo svolto del residuo 729 nella catalisi enzimatica e quindi anche nella sensibilità alla CPT sono stati realizzati altri tre mutanti :T729E, T729K e T729P. Le sostituzioni sono state scelte per la loro capacità di modificare il bilancio elettrostatico di una regione marcatamente idrofobica, come nel caso dell' acido glutammico e della lisina, o per la possibilità di alterare la struttura elicoidale, come nel caso della prolina. I risultati indicano che l' introduzione di un residuo acido o basico (T729E e T729K) cambia la qualità del legame al DNA determinando l' instaurarsi di una condizione di resistenza. Infatti la mutazione T729E elimina completamente il legame dell' enzima al substrato mentre la sostituzione T729K determina un calo nell'affinità ma non elimina completamente il legame al DNA. In contrasto l'introduzione di una prolina o dell' alanina non produce gli stessi effetti. Il mutante T729A presenta una sensibilità alla CPT ,una specificità di legame e un'attività catalitica del tutto paragonabile all' enzima WT. Questi dati supportano l' ipotesi che cambiamenti nelle interazioni idrofobiche tra le eliche 16,17 e 21, causati dall'aggiunta di un residuo carico, esercitano effetti drammatici sulla stabilità enzimatica. E' stato già dimostrato che un enzima privato della regione C-terminale , ma contenente il subdominio III,(topo58),è capace di legare il DNA con la stessa affinità posseduta dall' enzima Topo70 (Yang et al., 2002). Quindi è sorprendente che una sola sostituzione idrofilia nella regione C-terminale possa avere questi effetti drammatici sulla capacità di interagire con il substrato. L'introduzione della lisina determina un notevole aumento nelle fluttuazioni tra le eliche 16 e 17, mentre la sostituzione della treonina con un prolina causa una riduzione della motilità in questa regione rispetto all'enzima WT. La CPT non modifica pesantemente il tasso di riligazione sia nel caso del mutante TK che TP, suggerendo che le alterazioni nelle interazione proteina-DNA possono influenzare anche il legame della CPT al complesso binario. Nell' enzima WT la Thr 729 forma un legame idrogeno con la Tyr 619 situata nell'α-elica 17. Esperimenti di dinamica molecolare dimostrano che nel mutante T729P questo legame idrogeno è perso ma la posizione relativa delle due α-eliche risulta

invariata. Al contrario quando viene introdotta una lisina non solo si ha la perdita dell'interazione tra Thr729 e Tyr 619, ma questa si associa ad un allontanamento dell' α -elica 21 dalla 17 con conseguenti modificazioni a carico della tasca di legame della CPT. Le due mutazioni esercitano effetti diversi anche sulla riligazione. (*fig.5.2.A2 e B2-C2-D2*) Infatti il mutante T729K evidenzia un incremento nel tasso di riligazione in assenza di CPT, mentre l'attività del mutante T729P è comparabile a quella dell'enzima WT in assenza dell'inibitore. L'aggiunta di CPT riduce drammaticamente la riligazione per la proteina Top1 mentre non influenza l'attività della proteina T729K ed esercita un effetto moderato sul mutante T729P. Il mutante T729E, invece, è incapace di tagliare qualsiasi substrato suicida confermando l'ipotesi che la resistenza alla CPT sia dovuta ad una pesante riduzione nella capacità di interagire con il DNA. Le cinetiche di rilassamento in condizione di eccesso di substrato evidenziano un meccanismo di rilassamento distributivo sia per il mutante T729E che T729K. Gli stessi risultati non sono osservati in eccesso di proteina. In questa condizione, infatti, solo il mutante T729E continua a presentare un comportamento distributivo mentre nel caso del T729K è ripristinata la processività. Questi dati sono confermati dai saggi di binding, in cui il mutante T729E è incapace di legare il DNA indipendentemente dalla concentrazione proteica. Un'attenta comparazione tra la struttura terziaria del complesso covalente in assenza o meno del topotecano (TPT) evidenzia che l' α -elica 16 è più corta di mezzo giro in assenza dell'inibitore. In presenza del TPT la Thr606 e il Trp732 (posizionati rispettivamente nell' α -elica 16 e 21) formano un legame idrogeno che è perso in assenza del farmaco. Infatti in mancanza dell'inibitore la Thr606 si trova in una parte non foldata dell' α -elica 16 (*fig.5.2.A1 e B1-C1-D1*), (Stacker et al.,2002).

Gli esperimenti di dinamica molecolare evidenziano che tale interazione è persa nel mutante T729K dove si verifica una parziale destrutturazione dell' α -elica 16. Il linker è connesso al cluster idrofobico formato dalle α -eliche 16,17 e 21 da due lunghi *loops* che si estendono da due *coiled-coil* direttamente verso l' α -elica 17 ed attraverso le regioni della tirosina catalitica verso l' α -elica 21. Questa struttura coordinata può essere influenzata profondamente da cambiamenti radicali come l'introduzione di un residuo carico.

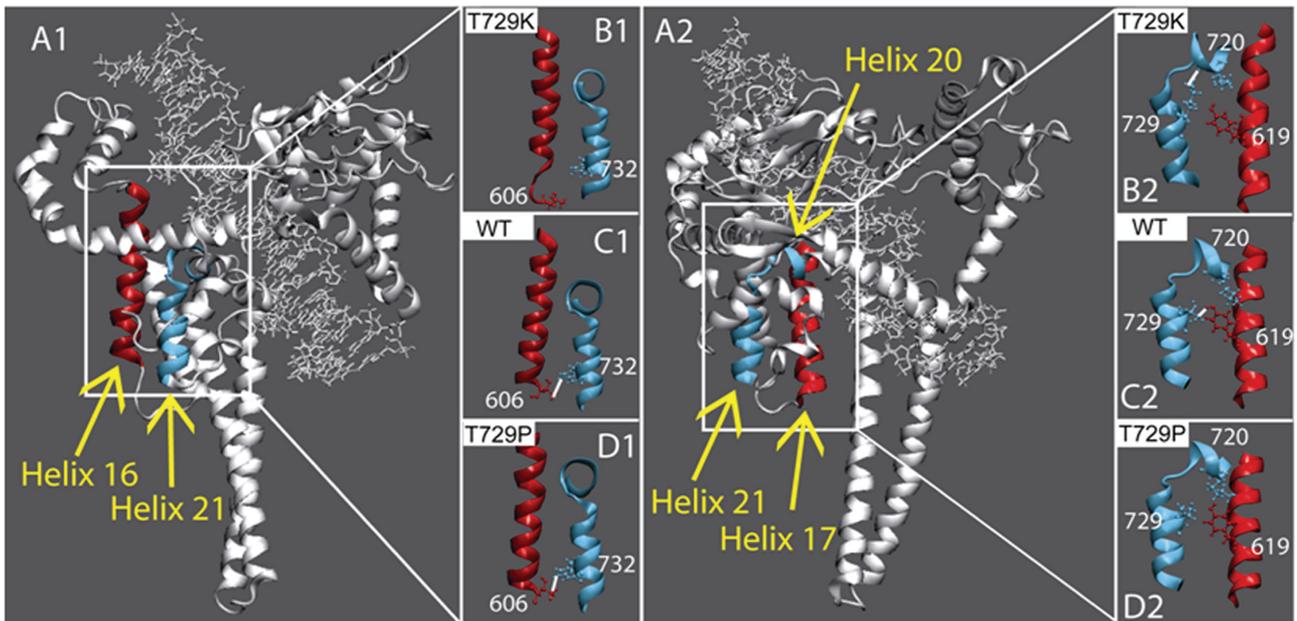


Figura 5.2 *Modificazioni strutturali indotte dalle mutazioni della Thr729. Pannello A1.* L' α -elica 16, nel dominio core, e l' α -elica 21, nel dominio C-terminale, sono colorate rispettivamente in rosso e blu. **Pannello B1-C1-D1.** Sono rappresentate solo le eliche 16 e 21 delle proteine *htopIThr729Lys*, *hTopIp* e *htopIThr729Pro* e i risultati della simulazione. La catene laterali della Thr606 e del Trp 732 sono schematizzate e i legami idrogeno, quando presenti, rappresentati da linee continue bianche. **Pannello A2** l' α -elica 17, nel core e le α -eliche 20 e 21 della regione C-terminale sono rappresentate rispettivamente in rosso e blu. **Pannello B2-C2-D2.** Sono rappresentate solo le eliche 16,17 e 21 delle proteine *htopIThr729Lys*, *hTopIp* e *htopIThr729Pro* e i risultati della simulazione. La catene laterali della Lys720 (α -elica20), della Thr729(α -elica21) e la Tyr 619(α -elica17) sono schematizzate in figura. I legami idrogeno quando presenti sono rappresentati da linee continue bianche

I risultati indicano che mutazioni a carico di residui chiave possono modificare drammaticamente il comportamento della DNA topoisomerasi IB alterando profondamente la sua dinamica d'azione. Le α -eliche 21,16 e 17 formano un cluster idrofobico che unisce il linker al core e alla regione perno. Il ciclo catalitico della DNA topoisomerasi IB umana richiede il passaggio da una conformazione chiusa ad una aperta per consentire l'entrata del substrato e, seguito della sua topoisomerizzazione, il passaggio dallo stato chiuso a quello aperto per permetterne il rilascio. Questo è possibile solo se esiste un perno che supporta il transito da una conformazione all'altra. Stacker et al., identificarono l'ipotetico perno nel residuo Pro 431. In realtà la regione che va dal residuo Leu429 alla Lys 452, definita *hinge*, è probabilmente coinvolta nei movimenti necessari all'apertura e chiusura dell'enzima. Questa regione è in stretto contatto con i residui dell' N-terminale e tramite l' α -elica 16 con il *cluster idrofobico*, posto al C-terminale, le cui interazioni regolano la posizione del linker rispetto al sito attivo e al perno stesso (fig.5.3).

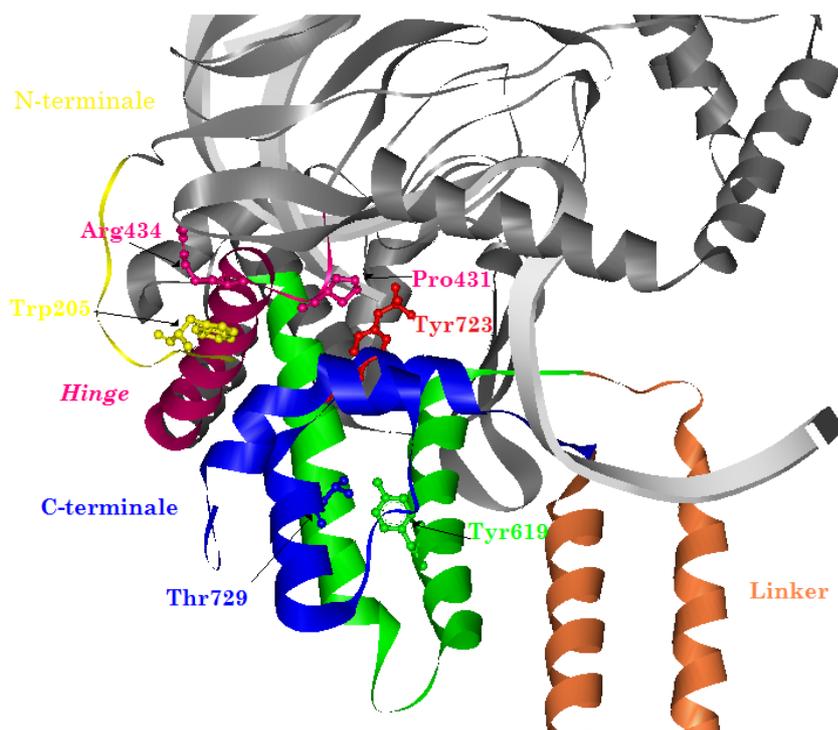


Figura 5.3 *Struttura della Top1* Le immagini mostrano il dominio C-terminale (blu), parte del dominio linker (arancio), le α -eliche 16 e 17 del core (verde), la regione hinge (fucsia) alcuni residui del dominio N-terminale (giallo), il resto della proteina è in grigio chiaro così come il DNA.

Sono rappresentati la Thr729 che stabilisce interazioni con la Tyr619; la Tyr 723; la Pro431 (perno ipotetico), l' Arg434 che si trova in prossimità del Trp 205 posto nel dominio N-terminale. Nella figura si può notare come il cluster idrofobico costituito dalle eliche 21,16,e,17 regoli la posizione del linker. Inoltre l' α -elica 20 e 16 sono in stretto contatto con la regione hinge.

Recentemente alcuni studi di dinamica molecolare hanno ipotizzato l'esistenza di un diverso meccanismo di rilassamento dei superavvolgimenti negativi e positivi. Il rilassamento dei superavvolgimenti positivi coinvolgerebbe la regione delle "Lips", che si allontanerebbero di circa 10-14 Å passando da una conformazione chiusa ad una parzialmente aperta. Il rilassamento dei superavvolgimenti negativi, invece, interesserebbe l' α -elica dell' *hinge* che si allungherebbe di circa 12 Å per consentire la rotazione del DNA entro una cavità enzimatica che rimane comunque chiusa (Sari L et al., 2005). La prossimità dei residui del dominio N-terminale all' α -elica del perno consente di ipotizzare un coinvolgimento di questa regione nel rilassamento dei superavvolgimenti negativi. I dati a disposizione non consentono di escludere un ruolo del dominio N-terminale anche nel rilassamento dei superavvolgimenti positivi. Un'attenta analisi strutturale rivela che il *loop* all'apice della regione perno, contenente la Pro431, si piega formando una struttura alquanto insolita. Il ripiegamento potrebbe essere dovuto alla presenza di questo residuo che forza il *loop* ad assumere una conformazione strutturalmente anomala ma funzionale all'attività svolta dalla prolina all'interno della regione.

Per chiarire il ruolo della Pro431 nella catalisi enzimatica, questo residuo è stato sostituito con una glicina, cioè un amminoacido privo di catena laterale (fig. 5.4).

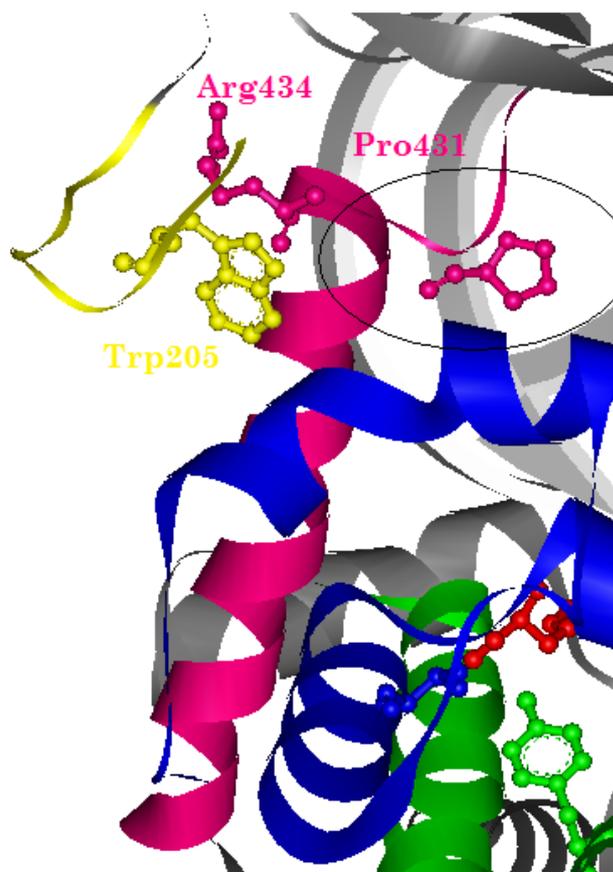


Figura 5.4 Struttura della Top1

Le immagini mostrano il dominio C-terminale (blu), le α -eliche 16 e 17 del core (verde), la regione hinge (fucsia) alcuni residui del dominio N-terminale (giallo), il resto della proteina è in grigio chiaro così come il DNA.

In figura sono rappresentati la Pro431, Arg434, il Trp205, la Tyr619, la Thr729 e la Tyr723.

Come si può notare nella figura la regione del perno all' apice prima dell' α -elica forma un loop che si inginocchia assumendo una conformazione anomala. Questa regione si incurva in prossimità della Pro431 e probabilmente proprio la presenza di questo residuo forza la struttura ad assumere una conformazione anomala che potrebbe essere funzionale all' attività svolta dall' aminoacido nella regione.

La prossimità dei residui del dominio N-terminale all' α -elica del perno consente di ipotizzare un coinvolgimento di questa regione nel rilassamento dei superavvolgimenti. In particolare l' Arg434 si trova vicino al Trp205 e tale contiguità potrebbe suggerire la presenza di interazioni tra le due regioni importanti nella regolazione dell' attività catalitica .

La mutazione P431G conferisce notevole flessibilità alla regione e potrebbe sopprimere la forzatura strutturale imposta dalla prolina. Se questa caratteristica strutturale riveste un ruolo funzionale l'introduzione della glicina dovrebbe alterare pesantemente il comportamento della proteina. La prossimità dei residui del dominio N-terminale all' α -elica del perno consente di ipotizzare un coinvolgimento di questa regione nel rilassamento dei superavvolgimenti. In particolare il residuo Arg434 si trova in prossimità del Trp205 e tale contiguità potrebbe suggerire la presenza di interazioni tra le due regioni importanti nella regolazione dell' attività catalitica. Per verificare queste ipotesi abbiamo mutato l'Arg434 in alanina in modo da modificare l'intorno chimico sia dal punto di vista conformazionale che elettrostatico. Il residuo 434 è stato mutato anche in cisteina con lo scopo di creare un doppio mutante in cui sia possibile legare covalentemente il dominio N-terminale alla regione *hinge*. Per valutare il ruolo svolto dal dominio N-terminale i mutanti sono stati realizzati sia nella versione *full lenght* che Topo70 (fig. 5.4).

Se espressi in lievito tutti i mutanti del perno risultano letali, tale letalità non è dipendente dalla presenza di CPT anche se non si può escludere che l'inibitore sia attivo sui mutanti. La letalità non è influenzata dalla presenza del dominio N-terminale infatti tutti i mutanti sono incapaci di formare colonie su terreni selettivi in

condizioni di espressione. Le proteine presentano un'attività inferiore rispetto alla Top1, tuttavia questo calo nell'attività specifica non è associato ad una marcata riduzione nell'affinità per il substrato. Infatti i mutanti P431G, R434A e R434C presentano un optimum salino collocato a 100 mM KCl contro i 150 mM della proteina Top1p. I mutanti P431G-70, R434A-70 e R434C-70 presentano un'affinità per il DNA del tutto paragonabile a quella della proteina Topo70 anche se sono caratterizzati da una finestra di interazione con il substrato ridotta. Infatti sono incapaci di interagire efficacemente con il DNA oltre i 200 mM KCl mentre la proteina Topo70 riesce a rilassare il substrato con bassa efficienza anche a 300 mM KCl.

Nelle cinetiche di rilassamento in eccesso di DNA tutti i mutanti evidenziano un comportamento distributivo rispetto al WT. Tale distributività risulta massima nel caso della proteina Top1Pro431Glyp. I mutanti *full length* evidenziano un andamento della cinetica paragonabile a quella dell'enzima WT, infatti la curva presenta lo stesso andamento ma è traslata in basso a conferma di una riduzione nell'attività. Gli enzimi privati del dominio N-terminale, invece evidenziano un comportamento diverso. In particolare il mutante R434C-70 presenta una cinetica della reazione paragonabile a quello dell'enzima Topo70 mentre i mutanti R434A-70 e P431G-70 mostrano un andamento della reazione lineare che si associa ad una incapacità di portare a compimento la topoisomerizzazione del substrato. Gli stessi risultati non sono osservati in eccesso di proteina. In questa condizione, infatti, il mutante P431G-70 pur recuperando continua a presentare un comportamento distributivo mentre nel caso dell'R434A-70 e R434C-70 è ripristinata la processività. Gli stessi saggi seguiti dal trattamento con proteinasi K evidenziano che i mutanti della posizione 434, indipendentemente dalla presenza della regione N-terminale, sono caratterizzati da un accumulo dei complessi covalenti, indice di uno spostamento nell'equilibrio della reazione verso il taglio. Tale alterazione nella cinetica di rilassamento è confermata anche dai saggi di cleavage. In assenza di inibitore sono presenti dei tagli collocati nella metà superiore del gel e non corrispondenti al solo sito preferenziale. In realtà il loro quantitativo, in assenza di CPT, è inferiore rispetto a quello prodotto dall'azione del mutante T718A, tuttavia il loro numero potrebbe essere sufficiente ad indurre un fenotipo letale.

I mutanti P431G e P431G-70, invece, non presentano, in cinetica, un accumulo di complessi di taglio pur evidenziando un comportamento distributivo probabilmente legato ad alterazione nella rotazione del filamento a valle del sito di taglio.

Nei saggi di cleavage è evidente che anche per i mutanti della posizione 431 si registra un lieve accumulo degli intermedi di taglio in assenza di inibitore. Mentre per il mutante P431G questi sono collocati nella parte superiore del gel e quindi corrispondenti a molecole di DNA più lunghe di 100 coppie di basi, nel caso del mutante P431G-70 questi sono collocati nella parte inferiore del gel e quindi in prossimità dell'estremità 3'. Questo diverso comportamento indica che il dominio N-terminale altera la capacità di interagire con il substrato modificando il legame dell'enzima al DNA. I risultati fin qui ottenuti confermano il ruolo critico svolto dalla regione perno e forniscono importanti indicazioni sulla presenza di interazioni tra il dominio N-terminale e *hinge*. I dati consentono di ipotizzare che i residui del perno più che essere coinvolti nel riconoscimento del substrato sono implicati nella regolazione della rotazione del filamento a valle del sito di taglio. Questi risultati suggeriscono che la regione N-terminale possa controllare la specificità del riconoscimento modulando la qualità e il tipo d'interazione tra enzima e DNA.

6 Bibliografia

- Abraham R.T. et al. (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Gene & Development* 15, 2177-2196.
- Alsner, J., Svejstrup, J. Q., Kjeldsen, E., Sorensen, B. S. & Westergaard, O. (1992). Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem*, 267(18), 12408-11.
- Andersen, A. H., Gocke, E., Bonven, B. J., Nielsen, O. F. & Westergaard, O. (1985). Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promoter region of the rRNA gene from *Tetrahymena pyriformis*. *Nucleic Acids Res*, 13(5), 1543-57.
- Anderson, R. D. & Berger, N. A. (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat Res*, 309(1), 109-42.
- Ayaydin, F. & Dasso, M. (2004). Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues. *Mol Biol Cell*, 15(12), 5208-18.
- Bailly, C. (2003). Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs. *Crit Rev Oncol Hematol*, 45(1), 91-108.
- Baker, S. D., Wadkins, R. M., Stewart, C. F., Beck, W. T. & Danks, M. K. (1995). Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry*, 19(2), 134-45.
- Balestrazzi, A., Toscano, I., Bernacchia, G., Luo, M., Otte, S. & Carbonera, D. (1996). Cloning of a cDNA encoding DNA topoisomerase I in *Daucus carota* and expression analysis in relation to cell proliferation. *Gene*, 183(1-2), 183-90.
- Bastin-Shanower, S. A., Fricke, W. M., Mullen, J. R. & Brill, S. J. (2003). The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10. *Mol Cell Biol*, 23(10), 3487-96.
- Bauer, W. & Vinograd, J. (1968). The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *J Mol Biol*, 33(1), 141-71.
- Been, M. D. & Champoux, J. J. (1984). Breakage of single-stranded DNA by eukaryotic type I topoisomerase occurs only at regions with the potential for base-pairing. *J Mol Biol*, 180(3), 515-31.
- Bendixen, C., Thomsen, B., Alsner, J. & Westergaard, O. (1990). Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription. *Biochemistry*, 29(23), 5613-9.
- Benedetti P. et al. Analysis of camptothecin resistance in yeast: relevance for cancer therapy. *Drug Res. Updates* (1998).
- Bergerat, A., Gadelle, D. & Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *J Biol Chem*, 269(44), 27663-9.
- Bharti, A. K., Olson, M. O., Kufe, D. W. & Rubin, E. H. (1996). Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *J Biol Chem*, 271(4), 1993-7.
- Bjornsti, M. A., Benedetti, P., Viglianti, G. A. & Wang, J. C. (1989). Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I:

- restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin. *Cancer Res*, **49**(22), 6318-23.
- Bjornsti, M. A., Knab, A. M. & Benedetti, P. (1994). Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the cytotoxic activity of the antitumor drug camptothecin. *Cancer Chemother Pharmacol*, **34 Suppl**, S1-5.114
- Bjornsti, M. A. & Wang, J. C. (1987). Expression of yeast DNA topoisomerase I can complement a conditional-lethal DNA topoisomerase I mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(24), 8971-5.
- Bonven, B. J., Gocke, E. & Westergaard, O. (1985). A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in *Tetrahymena* R-chromatin. *Cell*, **41**(2), 541-51.
- Borovitskaya, A. E. & D'Arpa, P. (1998). Replication-dependent and -independent camptothecin cytotoxicity of seven human colon tumor cell lines. *Oncol Res*, **10**(5), 271-6.
- Bronstein, I. B., Vorobyev, S., Timofeev, A., Jolles, C. J., Alder, S. L. & Holden, J. A. (1996). Elevations of DNA topoisomerase I catalytic activity and immunoprotein in human malignancies. *Oncol Res*, **8**(1), 17-25.
- Bullock, P., Champoux, J. J. & Botchan, M. (1985). Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. *Science*, **230**(4728), 954-8.
- Camilloni, G., Di Martino, E., Caserta, M. & di Mauro, E. (1988). Eukaryotic DNA topoisomerase I reaction is topology dependent. *Nucleic Acids Res*, **16**(14B), 7071-85.
- Capranico, G. & Binaschi, M. (1998). DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta*, **1400**(1-3), 185-94.
- Carey, J. F., Schultz, S. J., Sisson, L., Fazio, T. G. & Champoux, J. J. (2003). DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(10), 5640-5.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Champoux, J. J. & Dulbecco, R. (1972). An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyomathidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**(1), 143-6.
- Chang J.Y. (2002) Novel mutation of Topoisomerase I in rendering cells resistant to camptothecin. *Canc.Reser***62** , 3716-3721
- Chao-Po Lin, Yi Ban, Yi Lisa Lyu, Shyamal D. Desai & Leroy F. Liu (2008).A Ubiquitin-Proteasome Pathway for Repair of Topoisomerase I-DNA Covalente Complexes. *J Biol Chem*, **283**(30); 21074-21083.
- Cheng C. et al. (1998) Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell* **92**, 841-850
- Chillemi G., D'Annessa I., Fiorani P., Losasso C., Benedetti P. & Desideri A. (2008) .Thr729 in human topoisomerase I modulates anti-cancer drug resistance by altering protein domain communications as suggested by molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res*. **36** (17); 5645-5651.
- Chillemi G., Fiorani P., Castelli S., Bruselles A. Benedetti P. and Desideri A.(2005) Effect on Dna relaxation of the single Thr718Ala mutation in human topoisomerase I: a functional and molecular dynamics study. *Nucleic.Acids Res* **33** 3339-33350.

- Chillemi G., Redinbo M., Bruselles A., and Desideri A. (2004) Role of the linker domain and the 203-214 N-terminal residues in the human topoisomerase I DNA complex dynamics *Biophys J.*, **87** 4087-4097.
- Chillemi, G., Castrignano, T. & Desideri, A. (2001). Structure and hydration of the DNA human topoisomerase I covalent complex. *Biophys J*, **81**(1), 490-500.
- Chrencik, J. E., Staker, B. L., Burgin, A. B., Pourquier, P., Pommier, Y., Stewart, L. & Redinbo, M. R. (2004). Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations. *J Mol Biol*, **339**(4), 773-84.
- Christensen, M. O., Barthelmes, H. U., Boege, F. & Mielke, C. (2002). The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes. *J Biol Chem*, **277**(39), 35932-8.
- Christensen, M. O., Barthelmes, H. U., Feineis, S., Knudsen, B. R., Andersen, A. H., Boege, F. & Mielke, C. (2002). Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I. *J Biol Chem*, **277**(18), 15661-5.
- Christensen, M. O., Krokowski, R. M., Barthelmes, H. U., Hock, R., Boege, F. & Mielke, C. (2004). Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem*, **279**(21), 21873-82.
- Christman, M. F., Dietrich, F. S. & Fink, G. R. (1988). Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell*, **55**(3), 413-25.
- Colley W.C. et al. Substitution of conserved residues within the active site alters the cleavage relegation equilibrium of DNA topoisomerase I. *J.Biol.Chem.*(2004) **24**, 54069-54078
- Covey, J. M., Jaxel, C., Kohn, K. W. & Pommier, Y. (1989). Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Res*, **49**(18), 5016-22.
- Cretai E., Pattarello L., Fontebasso Y., Benedetti P. & Losasso C. (2007) Human DNA Topoisomerase IB: structure and functions. *Italian Journal Biochemistry* **56**(2); 91-102
- D'Anours D. et al. (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat.Rev.Cell.Biol.* **3**, 317-327.
- D'Arpa, P., Beardmore, C. & Liu, L. F. (1990). Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res*, **50**(21), 6919-24.
- Davies D.R. et al. (2003) Crystal structure of transition state mimic for Tdp1 assembled from vanadate, DNA and topoisomerase I-derived peptide. *Chem. Biol.* **10**, 139-147.
- Davies D.R. et al. (2002) The crystal structure of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, Tdp1. *Structure (Camb)* **10**, 237-248
- Debethune L. et al. (2002) Processing of nucleopeptides mimicking the Topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase. *Nucleic.Acids Res.* **30**, 1198-1204.
- Desai, S. D., Liu, L. F., Vazquez-Abad, D. & D'Arpa, P. (1997). Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem*, **272**(39), 24159-64.
- Di Mauro, E., Camilloni, G., Verdone, L. & Caserta, M. (1993). DNA topoisomerase I controls the kinetics of promoter activation and DNA topology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**(11), 6702-10.

- Doe, C. L., Ahn, J. S., Dixon, J. & Whitby, M. C. (2002). Mus81-Eme1 and Rqh1 involvement in processing stalled and collapsed replication forks. *J Biol Chem*, **277**(36), 32753-9.
- Durban, E., Goodenough, M., Mills, J. & Busch, H. (1985). Topoisomerase I phosphorylation in vitro and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *Embo J*, **4**(11), 2921-6.
- Eng, W. K., Pandit, S. D. & Sternglanz, R. (1989). Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **264**(23), 13373-6.
- Ferro, A. M. & Olivera, B. M. (1984). Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J Biol Chem*, **259**(1), 547-54.
- Fertala J., Vance J.R., Pourquier P.,Pommier J.and Bjornsti M.A. (2000) Substitution of Asn 726 in the active site of yeast DNA topoisomerase I define a novel mechanism of stabilizing the covalent enzyme-DNA intermediate . *J Biol Chem* **275** 15246-15253
- Fiorani, P., Amatruda, J. F., Silvestri, A., Butler, R. H., Bjornsti, M. A. & Benedetti, P. (1999). Domain interactions affecting human DNA topoisomerase I catalysis and camptothecin sensitivity. *Mol Pharmacol*, **56**(6), 1105-15.
- Fiorani, P., Bruselles, A., Falconi, M., Chillemi, G., Desideri, A. & Benedetti, P. (2003). Single mutation in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **278**(44), 43268-75.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H. & Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*, **2**(5), 574-7.
- Frohlich, R. F, Juul S., Nielsen M.B., Veigaard C., Hede M.S. & Andersen F.F. (2008) Identification of a minimal Functional Linker in Human Topoisomerase I by domain swapping with Cre recombinase . *Biochemistry* **47** ; 7127-7136
- Frohlich RF,Veigaard C,Andersen FF,McClendon AK,Gentry AC,Andersen AH,Osheroff N,Stevnsner T,Knudsen BR(2007)Tryptophane-205 of human topoisomerase I is essential for camptothecin inhibition of negative but not positive supercoil removal *Nucleic Acids Res* **35**; 6170-6180.
- Frohlich, R. F., Andersen, F. F., Westergaard, O., Andersen, A. H. & Knudsen, B. R. (2004). Regions within the N-terminal domain of human topoisomerase I exert important functions during strand rotation and DNA binding. *J Mol Biol*, **336**(1), 93-103.
- Frohlich, R. F., Hansen, S. G., Lisby, M., Grainge, I., Westergaard, O., Jayaram, M. & Knudsen, B. R. (2001). Inhibition of F1p recombinase by the topoisomerase I-targeting drugs, camptothecin and NSC-314622. *J Biol Chem*, **276**(10), 6993-7.
- Gaymes T.J. et al. (2002) Increased error-prone non homologous DNA end-joining—a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene* **21**, 2525-2533.
- Garg, L. C., DiAngelo, S. & Jacob, S. T. (1987). Role of DNA topoisomerase I in the transcription of supercoiled rRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(10), 3185-8.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**(11), 3872-6.
- Giaever, G. N., Snyder, L. & Wang, J. C. (1988). DNA supercoiling in vivo. *Biophys Chem*, **29**(1-2), 7-15.
- Gilmour, D. S., Pflugfelder, G., Wang, J. C. & Lis, J. T. (1986). Topoisomerase I interacts with transcribed regions in Drosophila cells. *Cell*, **44**(3), 401-7.

- Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A. K. & Riou, J. F. (1996). Modulation of DNA topoisomerase I activity by p53. *Biochemistry*, **35**(18), 5778-86.
- Goldwasser, F., Bae, I., Valenti, M., Torres, K. & Pommier, Y. (1995). Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res*, **55**(10), 2116-21.
- Gonzalez, I. L. & Sylvester, J. E. (1995). Complete sequence of the 43-kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics*, **27**(2), 320-8.
- Goto, T. & Wang, J. C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(21), 7178-82.
- Gottlieb, J. A. & Luce, J. K. (1972). Treatment of malignant melanoma with camptothecin(NSC-100880). *Cancer Chemother Rep*, **56**(1), 103-5.
- Guo F. et al. (1997) Structure of Cre recombinase complexed with DNA in site-specific recombination synapse. *Nature* **389**, 40-46.
- Haber J.E.(2000) Lucky breaks: analysis of recombination in Saccharomyces. *Mutat.Res.* **451**, 53-69.
- Haluska, P., Jr., Saleem, A., Edwards, T. K. & Rubin, E. H. (1998). Interaction between the N-terminus of human topoisomerase I and SV40 large T antigen. *Nucleic Acids Res*, **26**(7), 1841-7.
- Hannan, K. M., Hannan, R. D. & Rothblum, L. I. (1998). Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci*, **3**, d376-98.
- Heiland, S., Knippers, R. & Kunze, N. (1993). The promoter region of the human type-IDNA- topoisomerase gene. Protein-binding sites and sequences involved in transcriptional regulation. *Eur J Biochem*, **217**(3), 813-22.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J. & Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, **28**(11), 4629-38.
- Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., Holden, K. G., Jakas, D. R., Gallagher, G., Mattern, M. R., Mong, S. M., Bartus, J. O., Johnson, R. K. & Kingsbury, W. D. (1989). Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem*, **32**(3), 715-20.
- Holm, C., Covey, J. M., Kerrigan, D. & Pommier, Y. (1989). Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res*, **49**(22), 6365-8.
- Horwitz, S. B., Chang, C. K. & Grollman, A. P. (1971). Studies on camptothecin. I. Effects of nucleic acid and protein synthesis. *Mol Pharmacol*, **7**(6), 632-44.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. & Liu, L. F. (1985). Camptothecin induces proteinlinked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **260**(27), 14873-8.
- Hsiang, Y. H., Lihou, M. G. & Liu, L. F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res*, **49**(18), 5077-82.
- Hsieh, T. S., Brown, S. D., Huang, P. & Fostel, J. (1992). Isolation and characterization of a gene encoding DNA topoisomerase I in Drosophila melanogaster. *Nucleic Acids Res*, **20**(23), 6177-82.
- Husain, I., Mohler, J. L., Seigler, H. F. & Besterman, J. M. (1994). Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors:

- demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res*, **54**(2), 539-46.
- Hwong, C. L., Chen, C. Y., Shang, H. F. & Hwang, J. (1993). Increased synthesis and degradation of DNA topoisomerase I during the initial phase of human T lymphocyte proliferation. *J Biol Chem*, **268**(25), 18982-6.
- Ibrado, A. M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L. & Bhalla, K. (1996). Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*, **56**(20), 4743-8.
- Interthal, H., Quigley, P. M., Hol, W. G. & Champoux, J. J. (2004). The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **279**(4), 2984-92.
- Ireton, G. C., Stewart, L., Parker, L. H. & Champoux, J. J. (2000). Expression of human topoisomerase I with a partial deletion of the linker region yields monomeric and dimeric enzymes that respond differently to camptothecin. *J Biol Chem*, **275**(33), 25820-30.
- Jaxel, C., Kohn, K. W., Wani, M. C., Wall, M. E. & Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Res*, **49**(6), 1465-9.
- Jill E. et al. (2004) Mechanism of Camptothecin resistance by Human Topoisomerase I Mutations. *J.Mol.Biol.* **339**, 773-784
- Juan, C. C., Hwang, J. L., Liu, A. A., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Huebner, K., Croce, C. M., Zhang, H., Wang, J. C. & Liu, L. F. (1988). Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(23), 8910-3.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**(3 Pt 2), 499-509.
- Kanzawa F. et al (1990). Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: characterization and mechanism of resistance. *Canc.Reser.* **50**, 5919-5924.
- Kasid, U. N., Halligan, B., Liu, L. F., Dritschilo, A. & Smulson, M. (1989). Poly(ADPribose)-mediated post-translational modification of chromatin-associated human topoisomerase I. Inhibitory effects on catalytic activity. *J Biol Chem*, **264**(31), 18687-92.
- Kaufmann, S. H. (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta*, **1400**(1-3), 195-211.
- Kaufmann, S. H. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res*, **49**(21), 5870-8.
- Kaufmann, S. H., Charron, M., Burke, P. J. & Karp, J. E. (1995). Changes in topoisomerase I levels and localization during myeloid maturation in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **55**(6), 1255-60.
- Keck, J. L. & Berger, J. M. (1999). Enzymes that push DNA around. *Nat Struct Biol*, **6**(10), 900-2.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T. D., Feller, S. M., Weichselbaum, R. R. & Kufe, D. W. (1995). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*, **376**(6543), 785-8.
- Kingma P.S. et al. (1998) The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *BBA* **1400**, 223-232

- Kingsbury, W. D., Boehm, J. C., Jakas, D. R., Holden, K. G., Hecht, S. M., Gallagher, G., Caranfa, M. J., McCabe, F. L., Faucette, L. F., Johnson, R. K. & et al. (1991). Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J Med Chem*, **34**(1), 98-107.
- Klein H.L. et al. (2002) Replication, recombination and repair : going for the gold. *Mol.Cell* **9**, 471-481
- Knab, A. M., Fertala, J. & Bjornsti, M. A. (1995). A camptothecin-resistant DNA topoisomerase I mutant exhibits altered sensitivities to other DNA topoisomerase poisons. *J Biol Chem*, **270**(11), 6141-8.
- Knab, A. M., Fertala, J. & Bjornsti, M. A. (1993). Mechanisms of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J Biol Chem*, **268**(30), 22322-30.
- Koiwai, O., Yasui, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Ishii, K., Yanagihara, S. & Andoh, T. (1993). Cloning of the mouse cDNA encoding DNA topoisomerase I and chromosomal location of the gene. *Gene*, **125**(2), 211-6.
- Koster, D. A., Komaraiah Palle, Elisa S. M. Bot., Mary-Ann Bjornsti & Nynke H. Dekker. (2007). Antitumor drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* **448**; 213-217
- Koster, D. A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S. & Dekker, N. H. (2005). Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*, **434**(7033), 671-4.
- Kraus E. et al(2001). Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **98**, 8255-8262
- Kretzschmar, M., Meisterernst, M. & Roeder, R. G. (1993). Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(24), 11508-12.
- Krogstad, P. A. & Champoux, J. J. (1990). Sequence-specific binding of DNA by the Moloney murine leukemia virus integrase protein. *J Virol*, **64**(6), 2796-801.
- Kubota N. et al. (1992) Detection of topoisomerase I gene point mutation in CPT-11 resistant lung cancer cell line. *Bioc.Bioph.Reser.Comm.* **2**, 571-577
- Kunze, N., Klein, M., Richter, A. & Knippers, R. (1990). Structural characterization of the human DNA topoisomerase I gene promoter. *Eur J Biochem*, **194**(2), 323-30.
- Labourier, E., Rossi, F., Gallouzi, I. E., Allemand, E., Divita, G. & Tazi, J. (1998). Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginineserine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res*, **26**(12), 2955-62.
- Larsen, A. K. & Skladanowski, A. (1998). Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta*, **1400**(1-3), 257-74.
- Lee, M. P. & Hsieh, T. (1992). Incomplete reversion of double stranded DNA cleavage mediated by Drosophila topoisomerase II: formation of single stranded DNA cleavage complex in the presence of an anti-tumor drug VM26. *Nucleic Acids Res*, **20**(19),5027-33.
- Leppard, J. B. & Champoux, J. J. (2005). Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*, **114**(2), 75-85.
- Lima, C. D., Wang, J. C. & Mondragon, A. (1994). Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I. *Nature*, **367**(6459), 138-46.
- Lisby, M., Olesen, J. R., Skouboe, C., Krogh, B. O., Straub, T., Boege, F., Velmurugan, S., Martensen, P. M., Andersen, A. H., Jayaram, M., Westergaard, O. & Knudsen,

- B. R. (2001). Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation. *J Biol Chem*, **276**(23), 20220-7.
- Liu, L. F. & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(20), 7024-7.
- Liu C. et al. (2002) Repair of Topoisomerase I covalent complexes in the absence of tyrosyl DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **99**, 14970-14975
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachet, A., Philippsen, P. & Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**(10), 953-61.
- Losasso C. Cretaio E., Fiorani P., D' Anessa I., Chillemi G., Benedetti P., A (2008) A single mutation in the 729 residue modulates human DNA topoisomerase IB DNA binding and drug resistance. *Nucleic Acids Res* **36** (17); 5635-5644
- Losasso C., Cretaio E.,Palle K., Pattarello L.,Bjornsti M.A: & Bnedetti P. (2007) Alterations in Linker Flexibility Suppress DNA Topoisomerase I Mutant-induced Cell Lethality. *J Biol Chem*, **282** (13); 9855-9864.
- Lupi M. et al. (2004)Cytostatic and cytotoxic effects of topotecan decoded by a novel mathematical simulation approach. *Canc. Reser.* **64**, 2825-2832.
- Lynn, R. M., Bjornsti, M. A., Caron, P. R. & Wang, J. C. (1989). Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(10), 3559-63.
- Lynn, R. M. & Wang, J. C. (1989). Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-319 as the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proteins*, **6**(3), 231-9.
- Lysby M. et al. (1998) Camptothecin inhibit the utilization of hydrogen peroxide in the ligation step of human topoisomerase I catalysis. *Biochemistry* **37**, 10815-10827.
- Ma, J., Maliepaard, M., Nooter, K., Boersma, A. W., Verweij, J., Stoter, G. & Schellens, J. H. (1998). Synergistic cytotoxicity of cisplatin and topotecan or SN-38 in a panel of eight solid-tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, **41**(4), 307-16.
- Ma, J., Maliepaard, M., Nooter, K., Loos, W. J., Kolker, H. J., Verweij, J., Stoter, G. & Schellens, J. H. (1998). Reduced cellular accumulation of topotecan: a novel mechanism of resistance in a human ovarian cancer cell line. *Br J Cancer*, **77**(10),1645-52.
- Madden, K. R., Stewart, L. & Champoux, J. J. (1995). Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *Embo J*, **14**(21), 5399-409.
- Malanga M., Czubyaty A., Girstum A., staron K. & Althaus F.R. (2008) Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA Topoisomerase I . *J Biol Chem*, **283** (30); 19991-19998.
- Mao, Y., Mehl, I. R. & Muller, M. T. (2002). Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(3), 1235- 40.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D. & Liu, L. F. (2000). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(8), 4046-51.
- Megonigal, M. D., Fertala, J. & Bjornsti, M. A. (1997). Alterations in the catalytic activity of yeast DNA topoisomerase I result in cell cycle arrest and cell death. *J Biol Chem*, **272**(19), 12801-8.

- Merino, A., Madden, K. R., Lane, W. S., Champoux, J. J. & Reinberg, D. (1993). DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*, **365**(6443), 227-32.
- Mesner, P. W., Jr., Budihardjo, II & Kaufmann, S. H. (1997). Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol*, **41**, 461-99.
- Michel B. et al(2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **98**, 8181-8188
- Mo, Y. Y., Wang, C. & Beck, W. T. (2000). A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **275**(52), 41107-13.
- Morham, S. G., Kluckman, K. D., Voulomanos, N. & Smithies, O. (1996). Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol*, **16**(12), 6804-9.
- Muggia, F. M., Creaven, P. J., Hansen, H. H., Cohen, M. H. & Selawry, O. S. (1972). Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep*, **56**(4), 515-21.
- Muller, M. T. (1985). Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. Preferential cleavage of supercoiled DNA. *Biochim Biophys Acta*, **824**(3), 263-7.
- Muller, M. T., Pfund, W. P., Mehta, V. B. & Trask, D. K. (1985). Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *Embo J*, **4**(5), 1237-43.
- Muscarella, D. E., Rachlinski, M. K., Sotiriadis, J. & Bloom, S. E. (1998). Contribution of gene-specific lesions, DNA-replication-associated damage, and subsequent transcriptional inhibition in topoisomerase inhibitor-mediated apoptosis in lymphoma cells. *Exp Cell Res*, **238**(1), 155-67.
- Nitiss, J. & Wang, J. C. (1988). DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(20), 7501-5.
- Nitiss, J. L. & Wang, J. C. (1996). Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA. *Mol Pharmacol*, **50**(5), 1095-102.
- Norris, V. (1995). Hypothesis: chromosome separation in Escherichia coli involves autocatalytic gene expression, transertion and membrane-domain formation. *Mol Microbiol*, **16**(6), 1051-7.
- Palle K., Pattarello L., Van der Merwe M., Losasso C., Benedetti P, & Bjornsti M.A. (2008) Disulfide cross-links reveal conserved features of DNA Topoisomerase I architecture and a role for N-terminus in clamp closure. *J Biol Chem*,**283**(41); 27767-27775.
- Pandit, S. D., Richard, R. E., Sternglanz, R. & Bogenhagen, D. F. (1996). Cloning and characterization of the gene for the somatic form of DNA topoisomerase I from *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res*, **24**(18), 3593-600.
- Papa, F. R., Amerik, A. Y. & Hochstrasser, M. (1999). Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, **10**(3), 741-56.
- Pizzolato J.F. et. (2003) al. The camptothecins. *New Drug Classes* **361**, 2235-2242
- Pommier, Y., Kerrigan, D., Hartman, K. D. & Glazer, R. I. (1990). Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J Biol Chem*, **265**(16), 9418-22.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Wu, C. & Simmons, D. T. (1998). Mammalian DNA topoisomerase I activity and poisoning by camptothecin are inhibited by simian virus 40 large T antigen. *Biochemistry*, **37**(11), 3818-23.

- Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y. & Strumberg, D. (1998). Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta*, **1400**(1-3), 83-105.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H. & Kohn, K. W. (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res*, **532**(1-2), 173-203.
- Pond, C. D., Li, X. G., Rubin, E. H. & Barrows, L. R. (1999). Effects of mutations in the F361to R364 region of topoisomerase I (Topo I), in the presence and absence of 9-aminocamptothecin, on the Topo I-DNA interaction. *Anticancer Drugs*, **10**(7), 647-53.
- Postow, L., Crisona, N. J., Peter, B. J., Hardy, C. D. & Cozzarelli, N. R. (2001). Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(15), 8219-26.
- Pouliot, J. J., Yao, K. C., Robertson, C. A. & Nash, H. A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science*, **286**(5439), 552-5.
- Pouliot J.J. et al. (2001) Pathways for repair of Topoisomerase I covalent complexes in *S. Cerevisiae*. *Genes Cells* **6**, 677-687.
- Pourquier, P., Pilon, A. A., Kohlhagen, G., Mazumder, A., Sharma, A. & Pommier, Y. (1997). Trapping of mammalian topoisomerase I and recombinations induced by damaged DNA containing nicks or gaps. Importance of DNA end phosphorylation and camptothecin effects. *J Biol Chem*, **272**(42), 26441-7.
- Pourquier, P. & Pommier, Y. (2001). Topoisomerase I-mediated DNA damage. *Adv Cancer Res*, **80**, 189-216.
- Redinbo, M. R., Champoux, J. J. & Hol, W. G. (2000). Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry*, **39**(23), 6832-40.
- Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J. & Hol, W. G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, **279**(5356), 1504-13.
- Resnick, M. A. & Martin, P. (1976). The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control. *Mol Gen Genet*, **143**(2), 119-29.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, **311**(5986), 532-7.
- Roca, J., Ishida, R., Berger, J. M., Andoh, T. & Wang, J. C. (1994). Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(5), 1781-5.
- Romig, H. & Richter, A. (1990). Expression of the topoisomerase I gene in serum stimulated human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1048**(2-3), 274-80.
- Rosenstein, B. S., Subramanian, D. & Muller, M. T. (1997). The involvement of topoisomerase I in the induction of DNA-protein crosslinks and DNA single-strand breaks in cells of ultraviolet-irradiated human and frog cell lines. *Radiat Res*, **148**(6), 575-9.
- Rossi F. et al. (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* **381**, 80-82
- Rossi, F., Labourier, E., Gallouzi, I. E., Derancourt, J., Allemand, E., Divita, G. & Tazi, J. (1998). The C-terminal domain but not the tyrosine 723 of human DNA

- topoisomerase I active site contributes to kinase activity. *Nucleic Acids Res*, **26**(12), 2963-70.
- Rubin, E., Kharbanda, S., Gunji, H. & Kufe, D. (1991). Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol Pharmacol*, **39**(6), 697-701.
- Rubin, E. H., Li, T. K., Duann, P. & Liu, L. F. (1996). Cellular resistance to topoisomerase poisons. *Cancer Treat Res*, **87**, 243-60.
- Ryan, A. J., Squires, S., Strutt, H. L. & Johnson, R. T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res*, **19**(12), 3295-300.
- Samuels, D. S. & Shimizu, N. (1992). DNA topoisomerase I phosphorylation in murine fibroblasts treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and in vitro by protein kinase. *J Biol Chem*, **267**(16), 11156-62.
- Sane, A. T. & Bertrand, R. (1999). Caspase inhibition in camptothecin-treated U-937 cells is coupled with a shift from apoptosis to transient G1 arrest followed by necrotic cell death. *Cancer Res*, **59**(15), 3565-9.
- Sari, L. & Andricioaei, I. (2005). Rotation of DNA around intact strand in human topoisomerase I implies distinct mechanisms for positive and negative supercoil relaxation. *Nucleic Acids Res*, **33**(20), 6621-34.
- Seeler, J. S. & Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(9), 690-9.
- Shuman, S. (1989). Vaccinia DNA topoisomerase I promotes illegitimate recombination in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(10), 3489-93.
- Shuman, S. & Moss, B. (1987). Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(21), 7478-82.
- Shykind, B. M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J. J. & Sharp, P. A. (1997). Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev*, **11**(3), 397-407.
- Simmons, D. T., Melendy, T., Usher, D. & Stillman, B. (1996). Simian virus 40 large T antigen binds to topoisomerase I. *Virology*, **222**(2), 365-74.
- Soe, K., Dianov, G., Nasheuer, H. P., Bohr, V. A., Grosse, F. & Stevensner, T. (2001). A human topoisomerase I cleavage complex is recognized by an additional human topoisomerase I molecule in vitro. *Nucleic Acids Res*, **29**(15), 3195-203.
- Søe K. et al. (2003) p53 stimulates human topoisomerase I activity by modulating its DNA binding. *Nucleic Acids Reser.* **22**, 6585-6592
- Soe, K., Hartmann, H., Schlott, B., Stevensner, T. & Grosse, F. (2002). The tumor suppressor protein p53 stimulates the formation of the human topoisomerase I double cleavage complex in vitro. *Oncogene*, **21**(43), 6614-23.
- Sordet, O., Khan, Q. A., Kohn, K. W. & Pommier, Y. (2003). Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **3**(4), 271-90.
- Staker, B. L., Feese, M. D., Cushman, M., Pommier, Y., Zembower, D., Stewart, L. & Burgin, A. B. (2005). Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J Med Chem*, **48**(7), 2336-45.
- Staker, B. L., Hjerrild, K., Feese, M. D., Behnke, C. A., Burgin, A. B., Jr. & Stewart, L. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(24), 15387-92.
- Stephan H. et al. (2002) Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by p53-stimulated recombination-like reaction in vitro. *Nucleic Acids Reser* **30**, 5087-5093

- Stevnsner, T., Mortensen, U. H., Westergaard, O. & Bonven, B. J. (1989). Interactions between eukaryotic DNA topoisomerase I and a specific binding sequence. *J Biol Chem*, **264**(17), 10110-3.
- Stewart, L., Ireton, G. C. & Champoux, J. J. (1996). The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **271**(13), 7602-8.
- Stewart, L., Ireton, G. C. & Champoux, J. J. (1997). Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J Mol Biol*, **269**(3), 355-72.
- Stewart, L., Ireton, G. C., Parker, L. H., Madden, K. R. & Champoux, J. J. (1996). Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I. *J Biol Chem*, **271**(13), 7593-601.
- Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G. & Champoux, J. J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**(5356), 1534-41.
- Stivers, J. T., Harris, T. K. & Mildvan, A. S. (1997). Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry*, **36**(17), 5212-22.
- Struckey J.A. et al.(1999). Crystal structure of phospholipase D family member. *Nat.Struct.Biol* **6**, 278-281.
- Subramanian, D., Rosenstein, B. S. & Muller, M. T. (1998). Ultraviolet-induced DNA damage stimulates topoisomerase I-DNA complex formation in vivo: possible relationship with DNA repair. *Cancer Res*, **58**(5), 976-84.
- Tanizawa, A., Beirand, R., Kohlhagen, G., Tabuchi, A., Jenkins, J. & Pommier, Y. (1993). Cloning of Chinese hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. *J Biol Chem*, **268**(34), 25463-8.
- Tanizawa, A., Kohn, K. W. & Pommier, Y. (1993). Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res*, **21**(22), 5157-66.
- Thrash, C., Bankier, A. T., Barrell, B. G. & Sternglanz, R. (1985). Cloning, characterization, and sequence of the yeast DNA topoisomerase I gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(13), 4374-8.
- Tosh, K. & Kilbey, B. (1995). The gene encoding topoisomerase I from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Gene*, **163**(1), 151-4.
- Trotter, E. W. & Grant, C. M. (2003). Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Rep*, **4**(2), 184-8.
- Tsuji, T., Kaneda, N., Kado, K., Yokokura, T., Yoshimoto, T. & Tsuru, D. (1991). CPT-11 converting enzyme from rat serum: purification and some properties. *J Pharmacobiodyn*, **14**(6), 341-9.
- Tsuruo, T., Matsuzaki, T., Matsushita, M., Saito, H. & Yokokura, T. (1988). Antitumor effect of CPT-11, a new derivative of camptothecin, against pleiotropic drug-resistant tumors in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*, **21**(1), 71-4.
- Vance J.R. et al.(2002) al.Vance et al.Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **99**, 13669-13674.
- Verger, A., Perdomo, J. & Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*, **4**(2), 137-42.
- Vosberg, H. P. (1985). DNA topoisomerases: enzymes that control DNA conformation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **114**, 19-102.

- Walker, P. R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J. F. & Sikorska, M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res*, **51**(4), 1078-85.
- Wang, H. K., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K. H. (1997). Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Med Res Rev*, **17**(4), 367-425.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**(6), 430-40.
- Wang, J. C. (1971). Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol*, **55**(3), 523-33.
- Wilson D.M.. et al. (2003) 3rd Proprieties of and substrate determinants for the exonuclease activity of human apurinic endonuclease Ape1. *J.Mol.Biol.* **330**, 1027-1037
- Woo, M. H., Losasso, C., Guo, H., Pattarello, L., Benedetti, P. & Bjornsti, M. A. (2003). Locking the DNA topoisomerase I protein clamp inhibits DNA rotation and induces cell lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(24), 13767-72.
- Yang Z., And Champoux J.J. (2002) Recostitution of enzymatic activity by the association of the cap and catalytic domain of human topoisomerase I . *J Biol Chem*, **277** 30815-30823
- Yang S.-W. et al(1996).A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 11534-11539.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. & Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, **275**(5303), 1129-32.
- Yu D. et al(2004).Phosphorilation of DNA Topoisomerase I by the c-Abl tyrosine kinase confers camptothecin sensitivity. *JBC*
- Zakian, V. A. (1995). ATM-related genes: what do they tell us about functions of the human gene? *Cell*, **82**(5), 685-7.
- Zeshaan A. et al. (2003) Mechanism of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. *Oncogene* **22**, 7296-7304.
- Zhang, C. X., Chen, A. D., Gettel, N. J. & Hsieh, T. S. (2000). Essential functions of DNA topoisomerase I in Drosophila melanogaster. *Dev Biol*, **222**(1), 27-40.
- Zhang, H., Wang, J. C. & Liu, L. F. (1988). Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**(4), 1060-4.
- Zhu, J. & Schiestl, R. H. (2004). Human topoisomerase I mediates illegitimate recombination leading to DNA insertion into the ribosomal DNA locus in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Genet Genomics*, **271**(3), 347-58.

Ringrazio il Prof Benedetti per avermi dato l'opportunità di realizzare questo progetto di dottorato nel suo laboratorio. Un grazie particolare va a Carmen per avermi guidato, supportato ed incoraggiato nel mio vaggio nel mondo della scienza. Grazie a mia mamma e mio fratello per il sostegno e l'affetto che mi hanno dato. Un ringraziamento speciale va a mio marito per la sua presenza ed il suo appoggio. Ed infine l'ultimo grazie va alla persona a cui dedico questo lavoro ... mio padre

Erica