



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOCHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

2007- XX ciclo

**CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE E FUNZIONALE  
DELLA TOPOISOMERASI IB UMANA E DEI SUOI  
MUTANTI**

**Alessia Campagna**

Docente Guida: Prof. Alessandro Desideri

Coordinatore: Prof. Alessandro Finazzi-Agrò



## INDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
<b>SOMMARIO.....</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>Topologia del DNA.....</b>	<b>1</b>
<b>Le DNA topoisomerasi.....</b>	<b>9</b>
DNA topoisomerasi di classe IA.....	11
DNA topoisomerasi di classe IB.....	12
DNA topoisomerasi di classi II.....	13
<b>La DNA topoisomerasi IB umana.....</b>	<b>16</b>
Struttura.....	16
Meccanismo d'azione.....	21
Espressione e localizzazione cellulare.....	28
Attività e funzioni biologiche.....	30
Regolazione post-traduzionale e della sua attività.....	34
<b>Inibitori della DNA topoisomerasi I.....</b>	<b>34</b>
L'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA).....	35
La camptotecina.....	36
Meccanismo di morte cellulare e citotossicità.....	38
Interazioni atomiche farmaco-complesso.....	41
Farmaco resistenza.....	42
Aumento della sensibilità alla camptotecina.....	44
<b>Il sistema di lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> per selezionare mutanti sensibili alla camptotecina.....</b>	<b>46</b>
<b>Scopo .del lavoro.....</b>	<b>48</b>
<b>RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>50</b>
<b>CAPITOLO 1. Caratterizzazione del doppio mutante Asp677Gly- Val703Ile della topoisomerasi IB umana ipersensibile alla camptotecina in cellule di lievito.....</b>	<b>50</b>
<b>Ipersensibilità del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile alla CPT in vitro.....</b>	<b>51</b>

<i>Attività di rilassamento in funzione della forza ionica.....</i>	<i>52</i>
<i>Equilibrio di taglio/risaldatura.....</i>	<i>54</i>
<i>Velocità di taglio.....</i>	<i>55</i>
<i>Velocità di risaldatura.....</i>	<i>57</i>

***CAPITOLO 2. L'acido eicosapentaenoico coniugato, un nuovo inibitore della topoisomerasi IB umana con un meccanismo d'azione diverso dalla camptotecina.....61***

<i>Effetto inibitorio dell'attività catalitica della topoisomerasi I da parte dell'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA).....</i>	<i>61</i>
<i>Effetto del cEPA sulla reazione di taglio della topoisomerasi IB...62</i>	
<i>Il saggio di filter-binding per la topoisomerasi IB umana.....65</i>	

***CAPITOLO 3. Studi strutturali preliminari del dominio N-terminale della DNA topoisomerasi IB umana.....67***

<i>Espressione e purificazione del dominio N-terminale.....67</i>	
<i>Analisi di spettrofluorimetria del dominio N-terminale.....68</i>	
<i>Analisi di dicroismo circolare del dominio N-terminale.....69</i>	
<i>Analisi NMR monodimensionale del dominio N-terminale.....71</i>	

***CONCLUSIONI.....73***

***MATERIALI E METODI.....75***

***MATERIALI PER IL SISTEMA DI LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae*.....75***

<i>Ceppi di lievito.....</i>	<i>75</i>
<i>Plasmidi.....</i>	<i>75</i>
<i>Terreni liquidi di crescita.....</i>	<i>75</i>
<i>Terreni solidi di crescita.....</i>	<i>76</i>
<i>Soluzioni utilizzate.....</i>	<i>76</i>

***METODI PER IL SISTEMA DI LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae*.....77***

<i>Trasformazione di lievito (<i>S. cerevisiae</i>).....</i>	<i>77</i>
<i>Spot test.....</i>	<i>78</i>
<i>Espressione della topoisomerasi umana.....</i>	<i>78</i>
<i>Estrazione della proteina.....</i>	<i>78</i>
<i>Purificazione della proteina.....</i>	<i>79</i>

<i>Saggio di rilassamento plasmidico.....</i>	<i>79</i>
<i>Saggio di taglio/risaldatura all'equilibrio.....</i>	<i>80</i>
<i>Cinetica di taglio utilizzando un substrato oligonucleotidico..</i>	<i>80</i>
<i>Cinetica di risaldatura utilizzando un substrato oligonucleotidico.....</i>	<i>81</i>
<b><i>METODI DI ANALISI DELL'ACIDO EICOSAPENTAENOICO CONIUGATO.....</i></b>	<b><i>82</i></b>
<i>Coniugazione dell'acido eicosapentaenoico.....</i>	<i>82</i>
<i>Saggio di rilassamento del DNA plasmidico con cEPA.....</i>	<i>82</i>
<i>Cinetica di taglio in presenza del cEPA.....</i>	<i>83</i>
<i>Saggio di filter-binding in presenza del cEPA.....</i>	<i>83</i>
<b><i>MATERIALE PER IL SISTEMA BATTERICO E.coli.....</i></b>	<b><i>84</i></b>
<i>Ceppi batterici.....</i>	<i>85</i>
<i>Terreni liquidi di crescita.....</i>	<i>84</i>
<i>Terreni solidi di crescita.....</i>	<i>84</i>
<i>Antibiotici.....</i>	<i>84</i>
<i>Soluzioni utilizzate.....</i>	<i>84</i>
<b><i>METODI PER IL SISTEMA BATTERICO E.coli.....</i></b>	<b><i>85</i></b>
<i>Espressione del dominio N-terminale.....</i>	<i>85</i>
<i>Purificazione del dominio N-terminale.....</i>	<i>85</i>
<b><i>METODI SPETTROSCOPICI.....</i></b>	<b><i>87</i></b>
<i>Spettroscopia di fluorescenza.....</i>	<i>87</i>
<i>Dicroismo circolare.....</i>	<i>87</i>
<i>NMR monodimensionale.....</i>	<i>88</i>
<b><i>BIBLIOGRAFIA.....</i></b>	<b><i>90</i></b>
<b><i>CURRICULUM SINTETICO DELLA CANDIDATA....</i></b>	<b><i>110</i></b>
<b><i>LISTA DELLE PUBBLICAZIONI DELLA CANDIDATA.....</i></b>	<b><i>111</i></b>
<b><i>COPIA DELLE PUBBLICAZIONI RILEVANTI DELLA CANDIDATA.....</i></b>	<b><i>112</i></b>



## **RINGRAZIAMENTI**

*Ringrazio il prof. Desideri per avermi offerto l'opportunità di lavorare presso il suo laboratorio in questi tre anni di dottorato.*

*Desidero in particolar modo ringraziare la dott.ssa Paola Fiorani per avermi sapientemente guidato nella mia crescita professionale e non solo dimostrandomi amicizia e simpatia.*

*Ringrazio anche Blasco, Silvia, Paloma, Cinzia, Monica, Ofelia, Elisabetta, Oscar, Serena, Francesca, Melania, Patrizia, Anastasia, Sarah, Alessandra, Francesca e ai bioinformatici per avermi stimolato con le loro discussioni scientifiche e per la loro prorompente allegria .*

*Un ringraziamento speciale ad Anna Maria per avermi reso meno oscuro il mondo della biologia molecolare, nonché a Valentina, Loredana, Martina, Sabrina, Alessandro, Andrea e Marco per avermi ospitato nel loro laboratorio i miei primi mesi di dottorato e non avermi mai fatto mancare consigli ed affetto.*

*Ringrazio affettuosamente i miei genitori e Davide per avermi sempre offerto il loro sostegno.*

*In particolar modo ringrazio mio fratello Alessandro per essermi stato sempre vicino sopportandomi e proteggendomi in qualsiasi momento della mia vita.*

*Desidero, inoltre, dedicare questo lavoro ai miei nonni, perché i loro insegnamenti non mi abbandoneranno mai.*

## ***INTRODUZIONE***

### ***Topologia del DNA.***

Le molecole di acido deossiribonucleico (DNA) sono delle macromolecole organizzate come polimeri di deossiribonucleotidi, contenute in ogni cellula per codificare l'informazione genetica necessaria ad assicurare il normale sviluppo e funzionamento dell'organismo. L'informazione genetica è, infatti, contenuta nella precisa sequenza lineare delle basi dei nucleotidi da cui è costituito il DNA.

Nel 1953 James Watson e Francis Crick dedussero la struttura tridimensionale del DNA analizzando i primi diffrattogrammi, ottenuti da Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, di fibre di DNA, in cui le molecole lunghe e sottili sono orientate parallelamente con il loro asse maggiore. Il modello della struttura di Watson e Crick prevede la presenza di due catene polinucleotidiche che formano una doppia elica destrorsa, con lo scheletro formato da unità alternate di deossiribosio e fosfato (struttura primaria della molecola) nel quale il gruppo ossidrilico 3' di un'unità di deossiribosio è unito da un legame fosfodiesterico all'ossidrile 5' di un'altra unità di deossiribosio e le basi azotate eterocicliche dei due filamenti si trovano al centro della molecola, legate a ciascuna unità di deossiribosio mediante legame  $\beta$ -N-glicosidico. Una caratteristica significativa della doppia elica è che la struttura dipende dalla sequenza di basi di una sola catena, essendo l'altra ad essa complementare. Una purina (adenina e guanina) legata a un residuo di zucchero su una catena forma sempre legami idrogeno con una pirimidina (timina e citosina) legata a un residuo di zucchero sull'altra. Inoltre l'adenina si appaia sempre con la timina tramite due legami idrogeno, mentre la guanina si accoppia sempre con la citosina tramite tre legami idrogeno.

Quando si realizzano tali condizioni, si forma una struttura a doppia elica stabile, nella quale gli scheletri dei due filamenti mantengono mediamente una distanza costante. La sequenza delle basi può essere responsabile di notevoli variazioni locali nella forma della molecola di DNA; tali variazioni sono essenziali affinché si attuino interazioni specifiche tra DNA e varie proteine. In vivo il DNA assume di solito la struttura a doppia elica denominata B, o B-DNA. Esistono anche altri tipi di elica destrorsa in natura, come la A e la C, che differiscono sia nella distanza che nel numero



delle coppie di basi per giro di elica e si formano quando le fibre del DNA sono esposte a diverse umidità relative. In alcune condizioni, invece, quando sono presenti sequenze ripetute o motivi particolari, il DNA può assumere una struttura ad elica sinistrorsa, denominata Z-DNA; questa forma è stata ottenuta in laboratorio e si ritiene che non esista in vivo.

La principale caratteristica del B-DNA (modello proposto da Watson e Crick) è la presenza di 10 coppie di basi per giro di elica, corrispondenti ad un angolo medio di torsione dell'elica tra una coppia di basi e la successiva pari a  $35,9^\circ$ . Il diametro dell'elica è di 20 Å e la distanza, lungo l'asse dell'elica, tra una coppia di basi e quella successiva è di 3,4Å.

Questa particolare struttura secondaria conferisce alla molecola interessanti proprietà meccaniche (Charvin et al., 2005), infatti una *molecola* di DNA quando si converte da lineare a circolare assume una nuova topologia. L'asse della doppia elica può avvolgersi sul proprio asse in uno spazio tridimensionale formando una superelica (Schvartzman et al., 2004) e determinando la struttura terziaria del DNA. Il superavvolgimento è biologicamente importante per due ragioni. In primo luogo, per il compattamento del DNA all'interno della cellula in quanto una molecola di DNA superavvolta ha una forma più compatta ed energeticamente più favorevole della sua forma rilassata (Fig. 1); in secondo luogo, influenza la capacità della doppia elica di svolgersi e quindi modifica le interazioni con altre molecole.

Nelle cellule eucariotiche ci sono vari livelli di impaccamento del DNA all'interno del nucleo che coinvolgono numerose proteine di legame. Il primo livello comporta l'avvolgimento dell'acido ribonucleico attorno ad un nucleo complesso di quattro piccole proteine, chiamate istoni, per formare il nucleosoma. Il nucleosoma compatta il DNA riducendone di sei volte la lunghezza. Inoltre, i nucleosoma sono organizzati in un secondo livello di impaccamento, detto fibra cromatinica, di 30 nm, che riduce ancora la lunghezza del DNA di sette volte. Queste strutture possono essere ulteriormente ripiegate ed avvolte, grazie all'interazione con altre proteine non istoniche, fino a costituire le strutture cromosomiche.

Il DNA cromosomale è strettamente associato con la matrice nucleare creando domini multipli chiusi, o anse, con proprietà topologiche equivalenti alle molecole di DNA circolare tipiche degli organismi procariotici (Postow et al., 2001). Questa affermazione rende possibile considerare il DNA circolare (ad esempio piccoli plasmidi batterici) un modello per studiare le caratteristiche topologiche del DNA superavvolto. In un lavoro svolto da Jerome Vinograd e dai suoi collaboratori, nel 1963, sul genoma del

poliomavirus, è stato per la prima volta dimostrato che il DNA circolare formava due bande quando veniva centrifugato ad alta velocità e dopo essersi accertati che le due frazioni non differivano per il loro peso molecolare, Vinograd propose che la diversa velocità di sedimentazione fosse invece da attribuire al grado di compattamento. Le osservazioni al microscopio elettronico evidenziarono che la frazione che sedimentava più rapidamente era DNA superavvolto, mentre quello più lento era rilassato perché uno dei due filamenti era tagliato. Infatti il superavvolgimento altera notevolmente la forma generale del DNA rendendola più compatta di una molecola di DNA rilassata della stessa lunghezza e conferendole, per questo motivo, una maggiore mobilità in elettroforesi o in centrifugazione.

La topologia ed il livello di superavvolgimento nelle molecole di DNA circolare possono essere descritti dall'equazione (White, 1969):

$$Lk = Tw + Wr$$

*Lk* o “*linking number*” indica il numero totale di volte in cui un filamento della doppia elica di DNA si avvolge intorno all'altro in direzione destrorsa, assumendo ipoteticamente che questo giaccia su un piano. Caratteristica del linking number è di essere un'invariante topologica, ossia non può cambiare qualunque sia la conformazione topoisomerica della molecola, a meno che, la stessa non venga tagliata e risaldata. I topoisomeri sono, infatti, isomeri topologici, ovvero molecole identiche, che differiscono esclusivamente per il loro stato di superavvolgimento. Per convenzione, il numero di legame è considerato positivo per ogni incrocio dei due scheletri fosfodiesterici nella doppia elica destrorsa, inoltre è sempre un numero intero poiché i due filamenti devono passare l'uno intorno all'altro un numero intero di volte, prima della saldatura delle due estremità per formare la molecola circolare.

*Tw* o “*twisting number*”, indica una proprietà della doppia elica ovvero la rotazione di una catena sull'altra; è il numero totale dei giri d'elica del duplex ed è determinato dal rapporto tra il numero di paia di basi di cui è costituita la molecola e il passo dell'elica (10.4 pb/giro). Il twisting è influenzato da due condizioni fisiche quali la temperatura e la concentrazione di sali (Wang, 1979). Aumentando la temperatura il DNA tende a svolgersi di 0.012° per paia di basi per ogni grado centigrado in più. Rispetto ai circa 34.6° di rotazione per paia di basi che si hanno in un'elica di DNA, questo valore può sembrare piccolo ma per un DNA della lunghezza di 10,000 paia di basi corrisponde ad uno svolgimento dell'elica di 120° per ogni grado centigrado, che corrisponde ad un terzo del giro

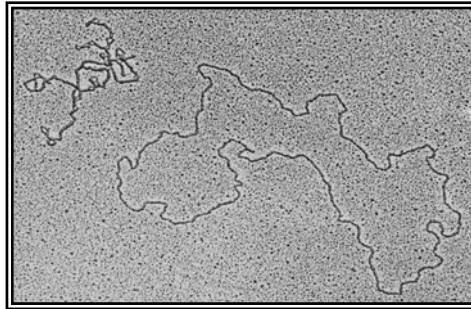
d'elica. Riscaldando una molecola di DNA circolare di 10 kilobasi da 20°C a 35°C si riduce il numero totale di giri d'elica di 5 giri. Si osservano variazioni nel Tw anche all'aumentare della concentrazione dei sali poiché i cationi possono schermare le cariche negative dello scheletro di zuccheri-fosfato del DNA diminuendo la forza repulsiva tra le due eliche e determinando, così, un avvolgimento più stretto tra loro. Ad esempio, se la molarità del sale passa da 0.01 M a 1 M, il diametro dell'elica diminuisce da 15 nm a 3 nm.

*Wr* o "writhing number", o numero di torsione, rappresenta le rivoluzioni dell'asse della doppia elica nello spazio e corrisponde al concetto intuitivo di superavvolgimento ma non ne è l'esatta misura quantitativa. Il superavvolgimento può essere negativo (destrorso) o positivo (sinistrorso), generato rispettivamente da un "underwinding" o dall' "overwinding", ovvero un più stretto avvolgimento della doppia elica.

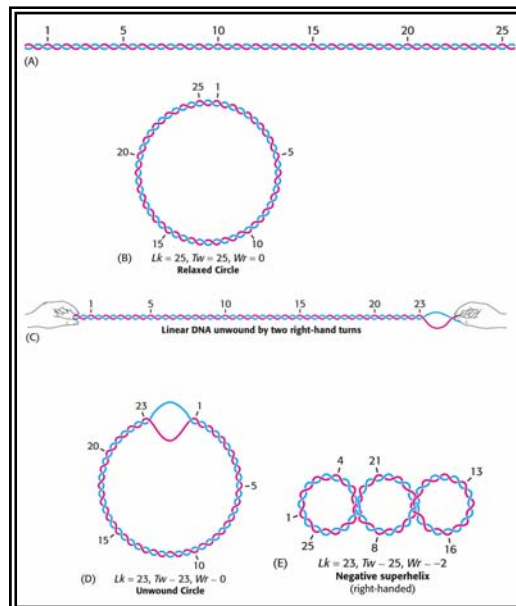
I valori di *Wr* e *Tw* non sono necessariamente dei numeri interi, ma lo è la loro somma, essendo essa il linking number. Per una molecola rilassata  $Wr = 0$  il numero di legame coincide con quello di avvolgimento, cioè sarà uguale al numero di coppie di basi contenute in un giro di elica. Il numero di legame è sempre un numero intero ma può variare e con esso variano il twisting e il writhing. Si ha un dispendio minimo di energia quando il 70% delle variazioni nel *Lk* sono compensate da cambiamenti nel *Wr* e il restante 30% da cambiamenti nel *Tw* (Boles et al., 1990). Una riduzione nel linking number è compensata sia da un superavvolgimento destrorso dell'asse dell'elica che, anche se in minore quantità, da uno svolgimento della doppia elica.

Ogni volta che c'è una variazione del linking number si hanno variazioni anche del *Wr* e del *Tw*. Considerando ad esempio una doppia elica di 260 coppie di basi in forma di DNA B (Fig. 2 A), in cui momento i numeri di residui per giro è 10.4, il numero di giri dell'elica è 25 (260/10.4). Unendo le estremità di questo DNA lineare si ottiene un DNA circolare rilassato (Fig. 2 B) ma si può formare un DNA circolare diverso svolgendo la doppia elica lineare, ad esempio di due giri, prima di unirne le estremità (Fig. 2 C). La conseguenza strutturale di questo svolgimento prima dell'unione delle estremità è che si possono avere due possibili conformazioni limitanti: il DNA circolare si può ripiegare in una struttura avente 23 giri di elica B e un anello non avvolto (Fig. 2 D) oppure il DNA può adottare una struttura superavvolta contenente 25 giri di elica di tipo B e 2 giri di superelica destrorsa (definita negativa) (Fig. 2 E).

I



**Figura 1.** Immagini al microscopio elettronico di un DNA circolare rilassato (destra) e superavvolto (sinistra).



**Figura 2.** Schema illustrativo del numero di legame (Lk), del numero di giri d'elica (numero di twisting, Tw) e del numero di giri di superelica (numero di writhing, Wr) di molecole di DNA B circolare.(Saenger, 1984)

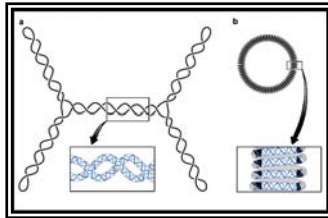
Il superavvolgimento può essere di due forme: plectonemico o solenoidale (Fig. 3). Nella prima, tipica dei genomi circolari come quelli batterici, virali ed episomali, l'asse maggiore si avvolge su se stesso e si ottiene un aumento o una diminuzione del numero di legame che corrisponderà ad un superavvolgimento positivo o negativo. L'altra forma di superavvolgimento è quella solenoidale nella quale l'asse maggiore è avvolto in maniera cilindrica, come spesso accade quando il DNA si avvolge intorno ad un complesso multiproteico come quello degli istoni eucariotici.

I superavvolgimenti possono essere negativi (destrorsi) o positivi (sinistrorsi). Tale segno è assegnato in base ad una convenzione topologica (Fig. 4) che considera le due eliche incrociate nel superavvolgimento come due frecce, una disposta sotto (blu) e l'altra sopra (rossa). Nei superavvolgimenti negativi le due frecce sono disposte in modo che per allineare la freccia rossa su quella blu è necessaria una rotazione in senso orario, di un angolo inferiore a 180° (Wasserman et al., 1986). Nei superavvolgimenti positivi la rotazione richiesta avviene in senso opposto (Schvartzman et al., 2004). In senso stretto il concetto di superavvolgimento può essere applicato solo alle molecole di DNA circolare. Nonostante questo, anche il DNA lineare eucariotico all'interno della cromatina risulta essere superavvolto negativamente.

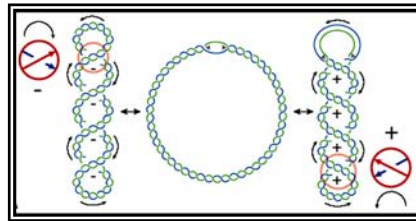
Il parametro più utile nella misurazione della deviazione topologica del DNA dal suo stato rilassato è la "*densità di superavvolgimento*" ( $\sigma$ ) che è indipendente dalla lunghezza della molecola (Postow et al., 2001) in quanto:

$$\sigma = (Lk - Lk_0) / Lk_0$$

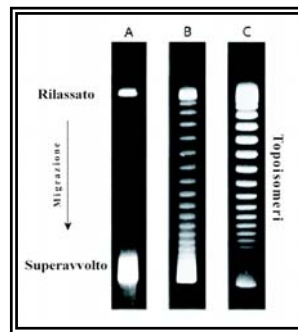
dove  $Lk_0$  è il linking number della molecola circolare rilassata. La densità di superavvolgimento della maggior parte delle molecole naturali di DNA varia da -0.03 a -0.09, assumendo in condizioni fisiologiche un valore pari a -0.06 (Postow et al., 2001). Il segno negativo significa che le supereliche naturali di DNA sono levogire. In altre parole, si formano in seguito ad un minor avvolgimento o ad uno svolgimento. Una conseguenza importante è che molecole di DNA superavvolte negativamente sono predisposte allo svolgimento in quanto il superavvolgimento negativo prepara il DNA ai processi che richiedono la separazione dei filamenti quali replicazione, ricombinazione e trascrizione. Il superavvolgimento positivo, al contrario, compatterebbe il DNA in modo altrettanto efficace, ma renderebbe più difficile separare i due filamenti. La densità di superelica di un DNA circolare, ovvero, il suo grado di superavvolgimento, può essere



**Figura 3.** Forme di superavvolgimento, a plectonemica, b solenoidale



**Figura 4.** Molecola di DNA superavvolta negativamente (sinistra) che diventa per opera di un'elicasi rilassata a causa dello svolgimento dei due filamenti del DNA (centro) e poi superavvolta positivamente (destra) (Schvartzman et al., 2004).



**Figura 5.** Elettroforesi su gel di agarosio di DNA plasmidico. **Linea A:** il DNA si separa in due bande, quella in basso corrisponde ai plasmidi strettamente superavvolti, quella in alto a quelli rilassati. **Linea B:** diverse popolazione di topoisomeri ( $\sigma$ ), maggiormente addensate verso il basso (DNA superavvolto). **Linea C:** diversi topoisomeri maggiormente addensati verso la banda del DNA rilassato (Keller, 1975).

osservata tramite microscopia elettronica, misure di velocità di sedimentazione o attraverso elettroforesi.

Quest'ultima metodologia è la più usata e consiste in una corsa elettroforetica su gel d'agarosio, che permette di separare molecole che differiscono anche di un solo numero di legame (Fig. 5). In un sistema elettroforetico le molecole non si spostano tutte alla stessa velocità, poiché quelle più compatte sono in grado di muoversi più velocemente. Si formano pertanto bande distinte, ognuna delle quali contiene una popolazione di molecole con lo stesso numero di legame. Bande adiacenti differiscono tra loro di una unità di linking number (i topoisomeri), che generalmente, riflettono una differenza nel writhing number (che si deve ad un diverso ripiegamento). Il writhing number è quindi, l'indice dello stato di compattamento della molecola.

L'integrità fisica e l'organizzazione del DNA devono essere mantenute per assicurare la sopravvivenza delle cellule. Molti dei processi cellulari essenziali possono provocare problemi topologici alla struttura del DNA. In particolare, la separazione dei due filamenti dell'elica genera tensioni e altre conseguenze topologiche che devono essere risolte affinché si possano completare i processi metabolici del DNA, come replicazione, trascrizione e ricombinazione (Champoux, 2001; Wang, 1996). Tali problemi possono essere risolti da enzimi ubiquitari che prendono il nome di DNA topoisomerasi.

## ***Le DNA topoisomerasi.***

Nella maggior parte dei processi cellulari è necessario accedere alle informazioni contenute nella doppia elica del DNA. Infatti i due filamenti dell'elica possono essere separati sia temporaneamente, ad esempio durante la trascrizione e ricombinazione, sia permanentemente, come nella replicazione. Inoltre la natura circolare dei cromosomi procariotici e le grandi dimensioni di quelli eucariotici impediscono un semplice srotolamento della doppia elica del DNA a causa dei numerosi problemi topologici che si vengono a creare (Wang et al., 1998).

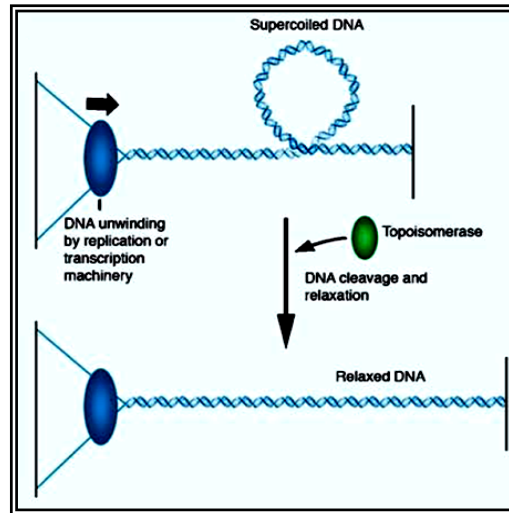
La mancata risoluzione di questi problemi topologici può promuovere una errata regolazione dell'espressione dei geni o una rottura dei cromosomi e può causare serie conseguenze per la vitalità cellulare (Corbett et al., 2004). Questi stress torsionali vengono eliminati dalle DNA topoisomerasi, enzimi ubiquitari, capaci di modificare sia il numero di legame che il grado di superavvolgimento dell'elica e di regolare lo stato topologico del DNA mediante un taglio temporaneo di uno o di entrambi i filamenti della doppia elica, seguito da una risaldata (Fig. 6).

Le DNA topoisomerasi vengono classificate in due categorie in base al loro meccanismo d'azione (Brown et al., 1979; Wang, 1985). Entrambe catalizzano il taglio e la risaldata del DNA con la formazione di un intermedio covalente in cui la tirosina del sito attivo dell'enzima dà luogo ad un legame fosfotirosinico con un gruppo fosfato dello scheletro dell'elica. Gli enzimi di tipo I sono monomerici e fanno passare una regione a singolo filamento del DNA attraverso una rottura sul filamento opposto. Le topoisomerasi di tipo II sono omodimeriche o eterodimeriche e fanno passare una regione di DNA a doppio filamento attraverso un taglio presente su ambedue i filamenti (Champoux, 2001).

Le topoisomerasi di tipo I sono ulteriormente suddivise in due sottofamiglie, gli enzimi di tipo IA si legano covalentemente all'estremità 5' del filamento tagliato, mentre quelli della sottofamiglia IB si legano al 3' durante il ciclo catalitico.

Le topoisomerasi di tipo II formano l'intermedio covalente legandosi generalmente all'estremità 5' (Corbett and Berger, 2004). La scoperta di un nuovo enzima di tipo II dall'archeobatterio ipertermofilo *Sulfolobus shibatae* ha suggerito la suddivisione anche della famiglia di topoisomerasi di tipo II nelle sottofamiglie IIA e IIB, con la topoisomerasi VI di *Sulfolobus shibatae* come prototipo della sottofamiglia IIB (Champoux, 2001).





**Figura 6.** La separazione delle due eliche del DNA genera superavvolgimenti positivi, rilassati dalla topoisomerasi (Leppard et al., 2005).

	IA	IB	IIA	IIB
<b>Enzimi rappresentativi</b>	Topo I e II di <i>E. coli</i> ; girasi inversa	hTopo I;V topo I; topo V	Topo II; topoIV; DNA girasi	topoVI
<b>Dipendenza dai metalli</b>	SI	NO	SI	SI
<b>Dipendenza dall'ATP</b>	NO	NO	SI	SI
<b>DNA cleavage</b>	Singolo filamento	Singolo filamento	Doppio filamento	Doppio filamento
<b>Sito di taglio</b>	5'	3'	5'	5'
<b><math>\Delta Lk</math> per ciclo catalitico</b>	1	+/- 1	+/- 2	+/- 2

**Tabella 1.** Famiglie di Topoisomerasi (Corbett et al., 2004)

Esistono sei topoisomerasi negli esseri umani, due membri per ognuna delle sottofamiglie IA, IB e IIA (il tipo IIB, come spiegato precedentemente, è stato trovato solamente negli Archebatteri). Questi sei enzimi, che includono forme sia nucleari che mitocondriali, risolvono problemi topologici associati alla replicazione, riparazione, trascrizione, ricombinazione del DNA e alla segregazione dei cromosomi (Leppard et al., 2005).

Riassumendo, (tabella 1) le DNA topoisomerasi sono suddivise in quattro sottofamiglie, ognuna delle quali ha una struttura unica e una sua funzionalità.

#### ***DNA topoisomerasi di classe IA.***

La prima topoisomerasi di questa subfamiglia è stata scoperta da Wang nel 1971. Tali enzimi sono tutti monomerici ad eccezione della girasi inversa *Methanopyrus kandleri* (Krah et al., 1996).

Nel rilassamento di DNA negativamente superavvolti da parte delle topoisomerasi IA una breve sequenza di DNA a doppio filamento viene inizialmente separata in due singoli filamenti mediante il legame con l'enzima. Successivamente, in questa regione, si introduce un taglio transiente dovuto al legame covalente tra la tirosina del sito attivo ed il fosfato al 5' del sito di taglio. L'enzima, induce quindi il trasferimento del filamento intatto attraverso il taglio introdotto nel filamento complementare (Fig. 7, box gialla).

Usando questo meccanismo catalitico, le topoisomerasi IA cambiano il linking number di una molecola di DNA a doppio filamento di una unità alla volta. Per l'attività di rilassamento sono richiesti cationi divalenti, quali il magnesio (Wang, 1971), mentre non sono necessari cofattori energetici, essendo l'energia fornita dal rilassamento stesso. Il rilassamento di superavvolgimenti negativi non va a completamento e l'attività di questi enzimi è definita di tipo distributivo (Stewart et al., 1997). Tutti gli enzimi di questa sottofamiglia richiedono una regione all'interno del substrato che esponga una parte a singolo filamento (Kirkegaard et al., 1985).

Oltre ad avere la capacità di rilassare superavvolgimenti negativi, gli enzimi di tipo IA sono in grado di catalizzare reazioni di annodamento e scioglimento tra molecole circolari di DNA a singolo filamento (Champoux et al., 1977; Kirkegaard et al., 1978), come anche la catenazione e

decatenazione di molecole di DNA a doppio filamento, quando in una delle due è presente una incisione (Tse et al., 1980).

Sebbene sia stata osservata una considerevole diversità di sequenza tra i membri della sottofamiglia IA, alcune caratteristiche sembrano identificare l'intera subfamiglia. Ad esempio il prototipo di questa classe, rappresentato dalla topoisomerasi I di *E. coli* (nota come "proteina  $\omega$ "), costituita da 865 amminoacidi è ripartito in tre domini (Fig. 8a). Il dominio N-terminale corrispondente al core è anche detto "cleavage/strand passage domain", contiene la tirosina del sito attivo in posizione 319 e permette il taglio su un filamento e la rotazione dell'altro. Questo dominio fa parte degli elementi conservati, in quanto è presente anche negli altri membri di questa sottofamiglia. Il secondo è un dominio che contiene tre motivi a dita di zinco, che legano il DNA e sono importanti nella fase della reazione in cui avviene il passaggio del filamento (Zhu et al., 1994; Ahumada et al., 1998). Nelle altre classi, questi motivi che legano lo zinco mantengono le stesse funzioni, anche se differiscono nella struttura e nella sequenza. L'ultimo è il dominio C-terminale, che è ricco di residui basici e contribuisce al legame al substrato, conferendo inoltre una maggiore affinità per le molecole di DNA a singolo filamento. Anche gli altri membri della sottofamiglia contengono un dominio C-terminale relativamente basico e non conservato, che, presumibilmente, svolge la stessa funzione.

Fanno parte di questa subfamiglia le topoisomerasi I e III di *E. coli* (Srivenugopal et al., 1984), la topoisomerasi III di *S. cerevisiae* (Wallis et al., 1989) e le topoisomerasi III $\alpha$  e III $\beta$  umane.

#### ***Le DNA topoisomerasi di classe IB.***

Le topoisomerasi IB, identificate da Champoux e Dulbecco nel 1972, possono essere divise in due categorie altamente correlate tra di loro, ma al tempo stesso strutturalmente separate. La prima categoria include le topoisomerasi poxvirali (ad esempio *Vaccinia virus*); la seconda comprende enzimi eucariotici, dei quali il rappresentante più studiato è la topoisomerasi I umana (Corbett and Berger, 2004). A queste viene aggiunta una terza categoria costituita dalla topoisomerasi procariotica V di *Methanopyrus kandleri* (Slesarev et al., 1993 e 1994). Queste topoisomerasi condividono proprietà strutturali e funzionali con le ricombinasi tirosiniche ed alcuna integrasi fagiche (Sherratt et al., 1998).

I membri di questa sottofamiglia non hanno omologia strutturale o di sequenza con le altre topoisomerasi note e sono funzionalmente distinte

anche dai membri della sottofamiglia IA. Diversamente da queste ultime, le IB sono capaci di rilassare sia superavvolgimenti positivi che negativi e portano a completamento il rilassamento (enzimi processivi) (Stewart et al., 1997); infine non è richiesto che il DNA sia parzialmente a singolo filamento (Champoux et al., 1972). Inoltre non richiedono cofattori energetici, non contengono ioni metallici legati ed il rilassamento del DNA non richiede  $Mg^{2+}$ , ma piccole quantità ne stimolano l'attività (Goto et al., 1985).

Il meccanismo catalitico delle topoisomerasi IB (Fig. 7, box blu) vede la formazione di un intermedio covalente tra l'enzima ed una molecola di DNA a doppio filamento, in cui la tirosina del sito attivo si lega al fosfato dell'estremità 3' del filamento tagliato, permettendo una o più rotazioni dell'intero duplex di DNA intorno al legame fosfodiesterico intatto sul filamento complementare. In questo modo viene alterato il linking number della doppia elica fino a cinque giri per ogni ciclo di reazione (Stewart et al., 1998; Stivers et al., 1997).

Le topoisomerasi I risultano essere l'unico bersaglio cellulare di una classe di molecole chiamate camptotecine, droghe antitumorali, usate nel trattamento di molti tipi di cancro, compresi quello colon-rettale e ovarico (Garcia-Carbonero et al., 2002).

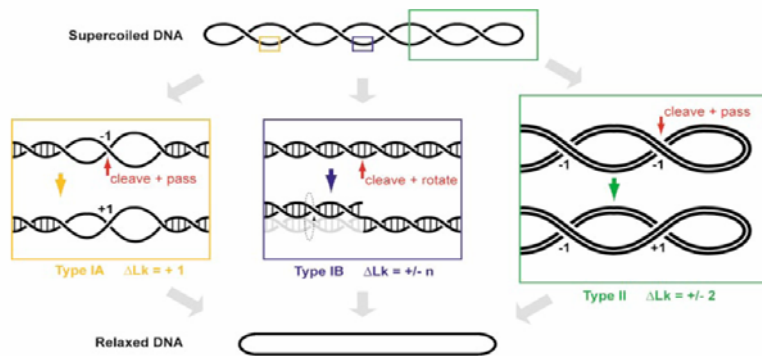
### ***Le DNA topoisomerasi di classe II.***

Prima che la topoisomerasi di tipo IIB venisse recentemente identificata nell'archeobatterio *Sulfolobus shibatae* da Bergerat ed i suoi collaboratori (Bergerat et al, 1997) si pensava che tutte le topoisomerasi II appartenessero ad una singola sottofamiglia, di cui il capostipite era la topoisomerasi di tipo IIA scoperta da Gelleret (Gelleret et al., 1976). Ora è invece chiaro che entrambe le due sottofamiglie, IIA e IIB, sono ampiamente distribuite e mostrano caratteristiche meccanicistiche comuni nonostante si distinguono strutturalmente. Tutti gli enzimi di classe II presentano due differenti subunità che rendono le topoisomerasi procariotiche eterotetrameriche a differenza di quelle eucariotiche omodimeriche. Queste ultime legano la doppia elica di DNA e tagliano i filamenti opposti in un intervallo di quattro basi (Nichols et al., 1999).

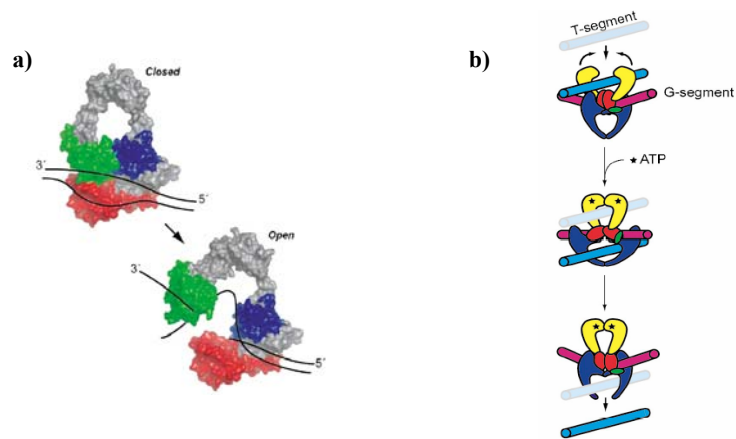
Secondo studi biochimici e strutture cristallografiche della topoisomerasi di lievito di tipo II è stato proposto il seguente meccanismo (Fig. 7, box verde): 1) l'enzima forma un taglio del doppio filamento su un segmento di DNA, definito cancello ("gate") o segmento-G, mediante un attacco

covalente di ognuna delle subunità del dimero all'estremità 5' del DNA attraverso un legame fosfotirosinico; 2) una seconda regione a doppio filamento di DNA della stessa molecola (rilassamento, annodamento o scioglimento di nodi) o di una diversa molecola (formazione o eliminazione di concatenati), definita segmento-T, viene trasportata attraverso la precedente apertura che viene successivamente risaldata. In questo modo l'enzima riesce a cambiare il linking number di un DNA circolare superavvolto di due unità alla volta (Brown et al., 1979; Mizuuchi et al., 1980) (Fig. 8b).

La reazione richiede magnesio e ATP per il turnover dell'enzima, sebbene un ciclo di rilassamento o di decatenazione può avvenire in presenza dell'analogo non idrolizzabile dell'ATP, l'ADPNP (5'-adenil- $\beta,\gamma$ -immidodifosfato) (Roca et al., 1994; Osheroff et al. 1983). La DNA girasi è l'unico enzima, appartenente a questa classe, capace di usare l'energia dell'ATP per introdurre superavvolgimenti negativi (Champoux, 2001). La struttura cristallografica di diversi membri, inclusa la strutturalmente distinta topoisomerasi VI, rivela che la tirosina del sito attivo è situata in un motivo elica-giro-elica (HTH), trovato all'interno di un dominio che assomiglia fortemente alla regione legante il DNA della proteina attivatrice del catabolita (CAP) di *E. coli* (Nichols et al., 1999).



**Figura 7.** Attività delle topoisomerasi. La superelica del DNA può essere alterata dalle topoisomerasi attraverso tre differenti meccanismi. Classe IA (box gialla, a sinistra) passaggio di un filamento di DNA attraverso l'altro, aumentando il numero di legame di una unità alla volta; classe IB (box blu, al centro): rotazione di un DNA duplex intorno ad una rottura in uno dei filamenti, cambiando il numero di legame mediante un numero di giri positivo o negativo; classe II (box verde, a destra): passaggio di un DNA duplex attraverso l'altro, cambiando il linking number di +/- 2 alla volta (Corbett et al., 2004).



**Figura 8. a)** Due stati della topoisomerasi IA di *E. coli* illustranti l'apertura del "gate" del filamento di DNA e l'entrata del singolo filamento attraverso l'apertura. **b)** Sequenza degli eventi catalizzati dalle topoisomerasi di classe II dove il segmento-G è in Magenta ed il segmento-T è in ciano

## ***La DNA topoisomerasi IB umana.***

### ***Struttura.***

La DNA topoisomerasi I umana (topo I), enzima monomero di 765 amminoacidi con un peso molecolare di 91 kDa, rappresenta la topoisomerasi cellulare di classe IB più studiata. La caratterizzazione strutturale basata su conservazione della sequenza amminoacidica tra i diversi eucarioti, sensibilità alla proteolisi limitata con subtilisina e tripsina, proprietà idrodinamiche, esperimenti di ricostituzione dei frammenti (Stewart et al., 1996) ed analisi cristallografiche (Redinbo et al., 1998; Stewart et al., 1998) consente di suddividere la topo I umana in quattro distinti domini (Fig. 9).

Il **dominio N-terminale** (Met1-Gly214) pesa circa 24 kDa, ed è una regione idrofila altamente carica, composta per il 72% da residui amminoacidici carichi e per il 90% da residui polari, non strutturata nella conformazione finale dell'enzima (Redinbo et al., 1999), poco conservata e sensibile all'azione delle proteasi. Per anni questo dominio è stato considerato non essenziale per l'attività, infatti le prime forme dell'enzima mancanti della regione N-terminale a causa della degradazione proteolitica risultavano comunque attive (Liu et al., 1981; D'Arpa et al., 1988). L'apparente non essenzialità del dominio è risultata anche da studi di delezione, in cui le forme enzimatiche mancanti dei primi 175 o 190 amminoacidi dell'N-terminale non mostrano un diverso grado di capacità di rilassamento di un DNA superavvolto *in vitro* rispetto all'enzima selvatico (Bronstein et al., 1999; Stewart et al., 1996). In studi recenti, invece, per un numero ristretto di residui viene suggerito un ruolo centrale nella catalisi, in quanto regolano le dinamiche DNA-enzima che si instaurano durante il processo di rilassamento attraverso un controllo del legame non covalente con il DNA a valle del sito di taglio, eseguito in maniera diretta o mediata da altre regioni della proteina (Lisby et al., 2001). Questo dominio è comunque fondamentale *in vivo* in quanto contiene cinque segnali per la localizzazione nucleare (NLS) presumibilmente responsabili della localizzazione subcellulare dell'enzima (Alsner et al., 1992; Mo et al., 2000), inoltre possiede siti per l'interazione con altre proteine cellulari, come la nucleolina, istoni, l'antigene T di SV40, p53, alcuni fattori di trascrizione e la proteina WRN (Bharti et al., 1996; Wang et al., 1998). Quando l'enzima si concentra in regioni di cromatina altamente trascritte, quali ad esempio quelle

dell'rDNA e dei geni attivati da shock termico, la sua solubilità è incrementata dall'alta idrofilicità dell' N-terminale come precedentemente descritto (Alsner et al., 1992; Stewart et al., 1996).

Il **dominio core** (Ile215-Ala635) è altamente conservato ed ha un peso di 54 kDa. Studi cristallografici hanno messo in evidenza una compatta struttura globulare del dominio (Stewart et al., 1996; Stewart et al., 1996) resistente all'azione digestiva delle proteasi. La sua stretta interazione con il dominio C-terminale (che verrà successivamente descritto) determina la formazione del corpo centrale dell'enzima, ovvero, una struttura a due lobi che avvolge completamente il DNA (Stewart et al., 1998; Redinbo et al., 1998). Questo dominio viene ulteriormente diviso in tre regioni denominate subdominio I (215-232 e 320-433) II (233-319) e III (434-635). I subdomini I e II costituiscono il lobo superiore della molecola, definito "CAP" e caratterizzato dalla presenza di elementi secondari di struttura  $\alpha$  e  $\beta$ , tra cui due lunghe  $\alpha$ -eliche o eliche "nose cone" ( $\alpha 5$  del core subdominio II e  $\alpha 6$  del core subdominio I) che si estendono di 25 Å dal corpo della molecola. La superficie di queste eliche, prossime al DNA, è carica positivamente e tra questi numerosi residui solamente l'Arg316 contatta lo scheletro zucchero-fosfato del DNA substrato (Redinbo et al., 1999; Stewart et al., 1998). Il subdominio III del core insieme al dominio C-terminale costituiscono il lobo inferiore dell'enzima, definito "CAT" e composto per la maggior parte da  $\alpha$ -eliche (ad eccezione di un foglietto  $\beta$ ), il quale contiene i cinque residui catalitici (Arg488, Lys532, Arg590, His632 del subdominio III e la Tyr723 del sito attivo, localizzata nel dominio C-terminale) implicati nelle reazioni di taglio e risaldatura del filamento della doppia elica (Redinbo et al., 1999). Questi due lobi sono covalentemente legati dalla lunga  $\alpha$ -elica 8 del subdominio III, nella cui porzione superiore si trova il "putative hinge" o cerniera; diametralmente opposti due loop ("lips"), appartenenti uno al subdominio I e l'altro al subdominio III, chiudono l'anello enzimatico mediante interazioni elettrostatiche (Champoux, 2001; Carey et al., 2003).

Il **dominio linker** (Pro636-Lys712) di circa 5kDa si compone di 77 amminoacidi, è poco conservato tra le diverse specie ed è molto sensibile alle proteasi. Collega il dominio core con il dominio C-terminale attraverso le due lunghe  $\alpha$ -eliche antiparallele ( $\alpha$ -18 e  $\alpha$ -19), che protrudono cospicuamente dalla base della proteina (circa 55Å) (Stewart et al., 1998; Redinbo et al., 1999). Le due  $\alpha$ -eliche sono stabilizzate da tre ponti salini inter-elica e da nove interazioni idrofobe coinvolgenti sia le catene laterali di leucina che la porzione alifatica di lunghe catene laterali di residui carichi



(Stewart et al.,1998). Gli unici contatti che si vengono a creare tra questo dominio ed il resto dell'enzima sono tra l'ultima elica del sottodominio III ( $\alpha$ -17) e l'estremità C-terminale della seconda elica del dominio linker ( $\alpha$ -19). L'assenza di ulteriori contatti fa sì che il linker mantenga un'elevata flessibilità di struttura (Redinbo et al.,1999; Fiorani et al.,2003) che esibisce un variabile grado di disordine, nella struttura cristallina, a seconda della natura del substrato (Leshner et al., 2002; Redinbo et al.,1999). La superficie di questo dominio esposta al solvente è generalmente idrofila; in particolare la regione che s'interfaccia con il DNA, durante l'evento catalitico, mostra un'elevata densità di carica positiva, benché siano stati evidenziati solamente due contatti (coinvolgenti Lys650 e Arg708) con lo scheletro zuccherofosfato. L'apparente flessibilità, la sua vicinanza al DNA, la presenza di amminoacidi carichi positivamente e l'osservazione che la delezione del linker risulti in un aumento della velocità di rotazione *in vitro* (Stewart et al., 1999) sono compatibili con un ruolo del linker nell'influenzare il processo di rotazione all'interno del meccanismo di catalisi.

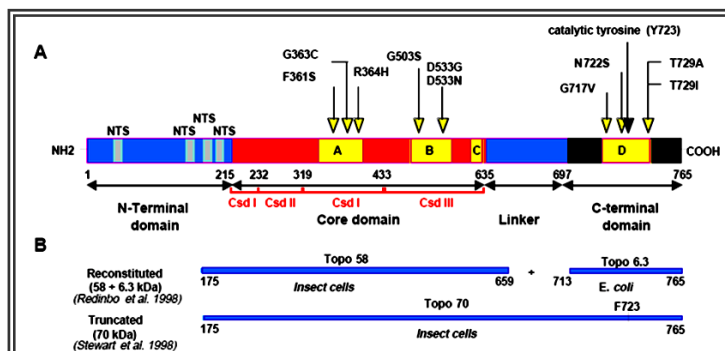
Il **dominio C-terminale** (Gln713-Phe765) di circa 8 kDa è composto di cinque corte  $\alpha$  eliche, è altamente conservato e contiene la tirosina 723 del sito attivo. Insieme al core forma una cavità di circa 20 Å in cui si posiziona il DNA. Per questo motivo il dominio è costituito prevalentemente da residui di carica positiva che ne facilitano l'interazione col DNA. All'interno di questa cavità sono contenuti i residui catalitici. Quest'ultimo dominio insieme al dominio core rappresentano il requisito minimo per l'attività di rilassamento del DNA *in vitro*, poiché la combinazione di due frammenti corrispondenti a questi domini possono ricostituire l'attività enzimatica (Stewart et al., 1997).

Sono state ottenute numerose strutture cristallografiche della topoisomerasi umana IB sia con il DNA legato covalentemente sia non covalentemente (in questo caso la tirosina 723 è stata sostituita con una fenilalanina) (Redinbo et al., 1998; Redinbo et al., 1999; Redinbo et al., 2000; Chrencik et al., 2004). I cristalli sono stati fatti crescere utilizzando una proteina delevata dei primi 174 amminoacidi dell'estremità N-terminale (Topo 70), ma forniscono una densità ai raggi X interpretabile solamente dal residuo 203, causando la perdita dell'informazione strutturale dei residui precedenti (Leshner et al., 2002; Staker et al., 2002).

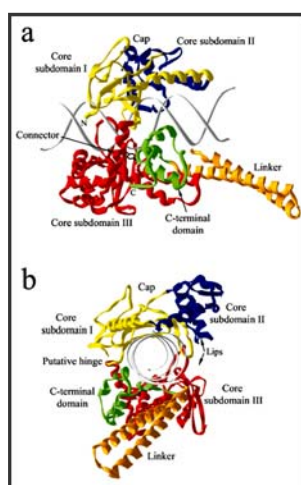
La conformazione tridimensionale ottenuta da studi diffrattometrici dei cristalli mostra che la proteina ha una forma bilobata e si avvolge strettamente intorno al DNA durante l'evento catalitico (Fig. 10). Il DNA è alloggiato all'interno di una cavità centrale, con un diametro di 20Å,

all'interno della quale quindici lisine e otto arginine sono responsabili di un potenziale elettrostatico altamente positivo (Redinbo et al., 1998). Nella stessa sono localizzati tutti i residui catalitici dell'enzima (Tyr723, Arg488 e 590, His632 e Lys532), altamente conservati nelle topoisomerasi di tipo IB, i quali si raggruppano intorno al fosfato scissile. L'Arg590 e l'His632 formano legami idrogeno con i due ossigeni del fosfato e sembrano stabilizzare, durante la fase di taglio, lo stato pentavalente di transizione (Krogh et al., 2000; Redinbo et al., 1998; Tian et al., 2003; Yang et al., 2001). Invece l'Arg488 e la Lys532 sono state recentemente implicate in un meccanismo di "rete protonica" della catalisi, cooperando sia per la deprotonazione della Tyr723 durante l'attacco nucleofilo, che per la protonazione del gruppo idrossile 5' (Krogh et al., 2002; Redinbo et al., 2000). I contatti tra la molecola e lo scheletro zucchero-fosfato del DNA si estendono per più di 14 paia di basi, ma la maggior parte di essi sono localizzati intorno alle cinque paia di basi (da -5 a -1) a monte del sito di taglio, posizionato per convezione tra i residui -1 e +1 (Champoux, 2001).

Come descritto precedentemente il lobo superiore dell'enzima ("CAP") è caratterizzato dalla presenza delle eliche "nose cone", che formano un angolo di circa 90° disponendosi a forma di V e sembrano essere importanti nel meccanismo di topoisomerizzazione (Lue et al., 1995). L'altro lobo della molecola ("CAT") costituito dal subdominio III e dal dominio C-terminale forma la base dell'enzima (Chrencik et al., 2004). Questo secondo lobo è connesso al "CAP" mediante una lunga  $\alpha$ -elica, "connector", e due "lips" che interagiscono attraverso un ponte salino ed interazioni di Van der Waals, in una regione diametralmente opposta. Durante il ciclo catalitico l'enzima passa da una conformazione chiusa, nella quale taglia e rilassa il DNA, ad una aperta, che permette l'associazione e il rilascio del DNA substrato. Queste transizioni rompono le interazioni esistenti tra le "lips" e determinano il sollevamento del CAP dal CAT, facendo leva sulla sommità dell' $\alpha$ -elica 8 o putative hinge (Stewart et al., 1998). Il residuo Gly369 della topoisomerasi IB di lievito, corrispondente alla Gly437 nell'umana, sembra essere essenziale nel meccanismo di apertura-chiusura dell'enzima; infatti



**Figura 9.** A. Diagramma schematico dei domini della DNA topoisomerasi I umana (Pommier et al., 1999). Le regioni A-D contengono alcuni siti di mutazione che rendono l'enzima resistente alla camptotecina (Gupta et al., 1995). I sottodomini I, II e III (Csd) sono riportati in rosso. B. Domini della DNA topoisomerasi I umana risolti dall'analisi cristallografica. In alto, la forma ricostituita senza il dominio linker. In basso, la forma con il dominio N-terminale troncato (Topo70) e la tirosina catalitica mutata in fenilalanina (Y723F) (Stewart et al., 1998).



**Figura 10.** Due visioni della struttura della topoisomerasi I umana legata non covalentemente al DNA (22 pb). (a) La struttura dell'enzima è osservata di lato con l'asse del DNA orientato orizzontalmente e (b) longitudinalmente. I sottodomini del core I, II e III sono colorati rispettivamente in giallo, blu e rosso. Il dominio linker e C-terminale sono indicati in arancione e verde. L'estremità N-terminale è indicata con N e quella C-terminale con C. L' $\alpha$ -elica che connette il CAP con la base del core è chiamata "Connector". (b) La regione "Lips", dove la proteina si

sostituzioni di questo residuo con altri diversi dalla glicina, diminuiscono l'affinità dell'enzima al DNA semplicemente riducendo la flessibilità degli angoli  $\Phi$  e  $\Psi$  di questo punto critico (Hann et al.,1998). Nell'enzima umano la Gly437 dista solo 3.7Å dal Trp 205, appartenente alla regione N-terminale, il quale insieme ad altri residui del medesimo dominio partecipa al processo di apertura e chiusura dell'enzima (Redinbo et al.,2000). I Trp203, 205 e 206 formano un grosso gruppo di residui idrofobi insieme ai Trp 441 e 754, rispettivamente del dominio core e C-terminale, localizzato all'apice dell' $\alpha$ -elica 8 o "putative hinge".

Il corretto posizionamento della regione 203-214 (Fig. 11) e del gruppo di residui idrofobi è critico per la chiusura dell'enzima intorno al DNA, infatti, questa fase del ciclo catalitico viene alterata dalla sostituzione della Gly437 con un residuo carico, probabilmente a causa della ridisposizione dei residui appartenenti al gruppo idrofobo (Hann et al.,1998).

#### ***Meccanismo d'azione.***

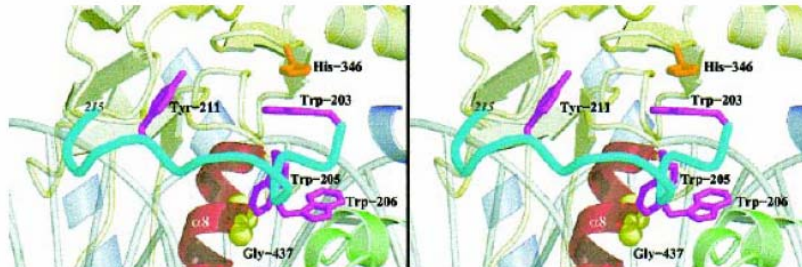
Champoux e collaboratori nel 1998 hanno proposto per la prima volta il "modello della rotazione controllata" per descrivere il meccanismo di rilassamento di una molecola di DNA superavvolto da parte della topoisomerasi I umana. Questo modello presenta delle caratteristiche intermedie tra il *modello dell'enzima a ponte*, in cui l'enzima interagisce covalentemente con l'estremità 3' in seguito al taglio di un filamento della doppia elica e non covalentemente con l'estremità 5' permettendo al filamento non scissile di passare nell'apertura così formata, e il *modello della rotazione libera*, identificato nella topoisomerasi di tipo IB di vaccinia virus, che vede l'enzima legare covalentemente solo l'estremità 3' generata con il taglio, consentendo all'elica a valle del sito di rottura di ruotare liberamente intorno al legame fosfodiesterico del filamento intatto.

La figura 12 schematizza il modello della rotazione controllata suddividendo, per convenzione, il ciclo catalitico in cinque passaggi: 1) associazione con il DNA e formazione del complesso non covalente, 2) taglio del filamento e formazione dell'intermedio covalente, 3) rilassamento del DNA mediante rotazione controllata del filamento scisso, 4) saldatura del filamento tagliato, 5) rilascio del substrato rilassato.

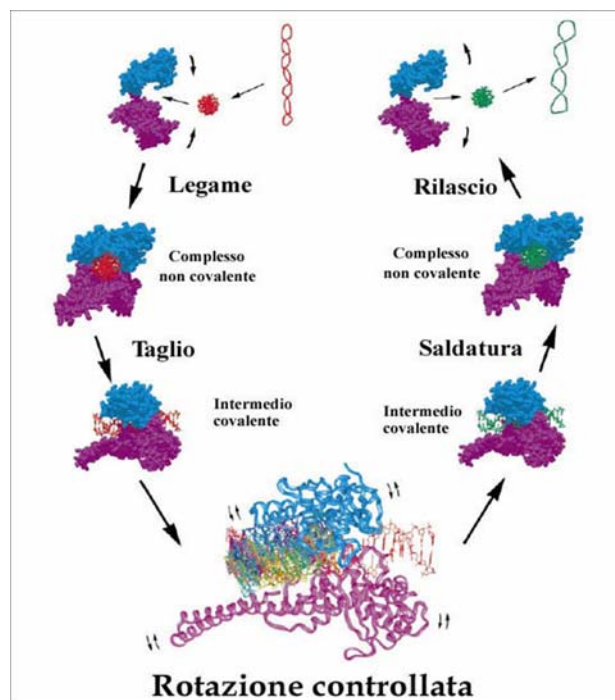
#### ***Associazione con il DNA e formazione del complesso non covalente.***

La specificità per il substrato delle topoisomerasi eucariotiche è stata individuata sulla base sia della sequenza nucleotidica che della struttura terziaria del DNA. Sebbene la topoisomerasi I umana non presenta un alto

grado di specificità di sequenza, numerosi studi dimostrano che l'enzima ha una forte preferenza a legarsi con il DNA superavvolto, positivamente o negativamente, piuttosto che con il DNA rilassato (Muller, 1985; Camilloni et al., 1989). In particolare la struttura topologica sul DNA riconosciuta dall'enzima sembra essere i nodi, zone in cui i duplex si incrociano (Zechiedrich et al., 1990; Madden et al., 1995). Studi cristallografici di complessi covalenti e non covalenti permettono di avere informazioni sui contatti tra l'enzima ed il substrato che risultano essere fondamentalmente gli stessi, coinvolgendo principalmente i gruppi fosfato della doppia elica di DNA (Redinbo et al., 1998). Questi dati trovano supporto nella caratterizzazione biochimica del mutante inattivo Tyr723Phe, non in grado di legarsi covalentemente al DNA, per il quale è stata messa in evidenza la medesima affinità dell'enzima wild type per il substrato (Madden et al., 1995). Usando dei detergenti che stabilizzassero il complesso covalente si è definita la sequenza di taglio preferenziale che si estende tra le posizioni -4 e -1 che risulta essere la seguente: 5'-(A/T)(G/C)(A/T)T-3' (Been et al., 1984; Tanizawa et al., 1993), con l'enzima legato covalentemente alla timina 3'. Questa sequenza consenso la si può riscontrare degenerata, in media, ogni dieci coppie di basi, corrispondenti ad ogni giro di elica (Christiansen et al., 1993; Stewart et al., 1998). Quindi l'attacco dell'enzima avviene di norma su una timina in posizione -1, ma può coinvolgere occasionalmente anche una citosina (Fig. 13) indicando l'esistenza di una preferenza per una pirimidina in questa posizione. Questa preferenza in parte, viene spiegata dall'unico contatto base specifico, visibile nella struttura cristallografica, tra l'azoto della catena laterale del residuo Lys532 (uno dei residui del sito attivo, presente nel core domain) e l'atomo O-2 dell'anello pirimidinico (Fig. 14). Tuttavia mutando la Lys532 in alanina si riduce l'attività dell'enzima senza che vari significativamente la specificità di taglio (Interthal et al., 2004); le basi strutturali per questa debole specificità di sequenza rimangono, così, poco chiare ed altre interazioni DNA-proteina, in aggiunta a questa, possono giocare un importante ruolo nella selezione del sito di taglio (Champoux., 2001). La stessa preferenza di taglio è stata osservata anche per topoisomerasi IB di specie diverse, tutte sono in grado di tagliare una sequenza di circa 30 paia di basi localizzata negli spaziatori non trascritti del DNA ribosomale di *Tetrahymena thermophylus* (5'-CATGAAAAGACTT↓AGAAAATTTTAAAA-3') (Christiansen et al., 1987); in particolare l'enzima umano lega questa sequenza con un'alta affinità ( $KD \sim 10^{-10}$  M; Stevensner et al., 1989).



**Figura 11.** Stereovisione dei 12 nuovi residui costruiti all’N-terminale della struttura –1C. Lo scheletro amminoacidico da Trp203 alla gly214 è indicato in celeste e i residui aromatici, in questa porzione della molecola sono indicati in viola. Gly437 un putativo residuo perno, vicino all’apice dell’ $\alpha$ -8 del core subdominio III (rosso) è indicato in giallo (Redinbo et al., 2000).



**Figura 12.** Meccanismo di “rotazione controllata” della DNA topoisomerasi I umana (Stewart et al., 1998).

Quindi il ciclo ha inizio con il legame al DNA in maniera non covalente. La topoisomerasi I umana deve pertanto trovarsi in una conformazione aperta, permessa probabilmente dal movimento dei domini intorno al putative hinge. Il legame è guidato in massima parte dalla superficie e dalla complementarità di carica tra l'enzima e il DNA che portano all'avvolgimento del DNA da parte della topoisomerasi mediante il raggiungimento del contatto fra le lips (Stewart et al., 1998).

*Taglio del filamento e formazione dell'intermedio covalente.*

Avvenuto il legame non covalente, 4 dei 5 residui del sito attivo (tutti tranne la Tyr723) consentono il posizionamento del fosfato scissile per fare avvenire l'attacco nucleofilo da parte dell'O2 in posizione 4 della Tyr723 (Fig. 15). Questa reazione determina il taglio del filamento di DNA e genera un legame fosfotirosinico tra la tirosina del sito attivo e il 3' fosfato, lasciando un gruppo ossidrile al 5'.

Le strutture cristallografiche evidenziano che i residui Arg488 e Arg590 formano legami idrogeno con l'ossigeno O1 non legante del fosfato scissile e His632 è impegnata con l'ossigeno non legante O2 del medesimo gruppo. Studi cristallografici successivi mostrano un diverso orientamento dei residui chiave del sito attivo, suggerendo la possibilità di osservare due distinti stadi dell'evento catalitico (Redinbo et al., 2000). Infatti nella struttura dove è presente la citosina in posizione -1 del sito di taglio (-1C) è stata evidenziata una rotazione di 75° del gruppo fosfato, rispetto alla posizione occupata in quella che presenta una timina in posizione -1 (-1T). L'His632 interagisce con lo stesso atomo di ossigeno non legante (O2), mentre l'Arg488 e la Lys532 formano legami idrogeno con l'O1. Inoltre l'Arg590 agisce facilitando l'attacco nucleofilo della tirosina catalitica mediante l'interazione con l'O4 di quest'ultima attraverso la formazione di un legame idrogeno diretto ed uno mediato da una molecola di acqua. L'acqua media l'interazione e viene indicata come "acqua catalitica", in quanto si pensa che possa funzionare come accettore del protone idrossilico della tirosina catalitica determinando la formazione di un anione fenolato, il quale, ora, può dare luogo all'attacco nucleofilo (Fig. 16).

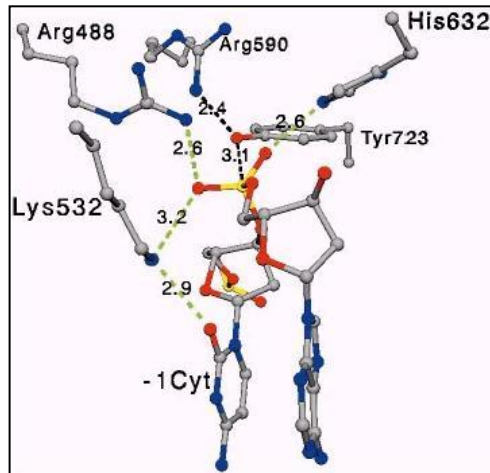
Le due strutture prese in considerazione sono dei complessi non covalenti tra l'enzima (mutante inattivo Tyr723Phe) ed il DNA. Il modellamento dell'idrossile sull'anello benzenico della fenilalanina evidenzia che la tirosina catalitica è perfettamente allineata per l'attacco nucleofilo e la triade di amminoacidi basici è posizionata per stabilizzare lo stato di transizione pentavalente. Due considerazioni fanno ipotizzare che la configurazione -1C rappresenti uno stadio più avanzato della catalisi, rispetto quella -1T:

l'orientamento delle catene amminoacidiche laterali nella struttura del complesso covalente (-1T) (Redinbo et al.,1998), è lo stesso di quello osservato nel -1C ed inoltre, dopo il riorientamento del fosfato, procedendo dal -1T al -1C, Arg 590 è ad una distanza tale da entrambi gli ossigeni non leganti da non poter più fare legami idrogeno, ma si trova in stretta prossimità dell'idrossile della Tyr723. Questa stretta vicinanza può diminuire il pKa della tirosina stessa, facilitando la perdita del protone.

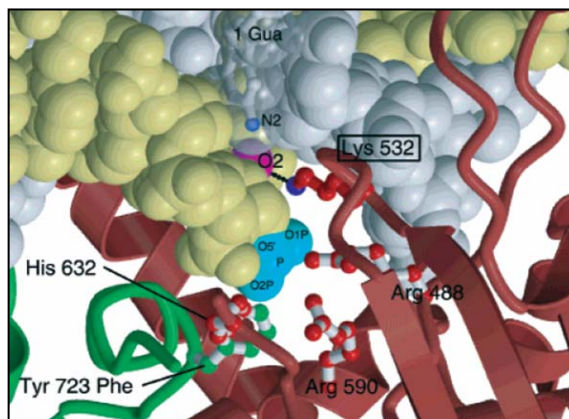
*Rotazione del filamento scisso e rilassamento.*

Il rilassamento avviene mediante un meccanismo definito di “rotazione controllata” che differisce da una rotazione libera in cui, dopo il taglio, il filamento a valle del sito di taglio ruota liberamente eliminando così gli stress torsionali a cui è sottoposto il duplex. Infatti in questo meccanismo la rotazione del duplex di DNA intorno al legame fosfodiesterico del filamento intatto è regolato da interazioni elettrostatiche tra il DNA, la regione linker e le eliche “nose-cone” della proteina. Le cariche positive presenti sulla superficie di queste regioni svolgono il ruolo di “frenare” la rotazione del DNA, a causa dell’attrito procurato dai vari domini proteici sulla molecola del duplex (Koster et al.,2005), e di guidare, grazie alla loro mobilità intrinseca, il filamento ruotato nella giusta posizione per il successivo evento. Inoltre dati cristallografici dell’enzima legato al DNA mostrano come ci sia uno spazio insufficiente a permettere una rotazione libera della doppia elica senza che quest’ultima abbia contatti con alcune regioni della topoisomerasi umana. Nel meccanismo di rotazione del filamento un ruolo fondamentale sembra essere svolto dal dominio linker (Stewart et al., 1997; Stewart et al.,1999), il quale presenta numerosi residui carichi positivamente sulla superficie che interfaccia il DNA, ma di questi solo due, Lys650 e Arg708, contattano il substrato a livello dei fosfati tra le basi +9/+10 e +8/+9 (Stewart et al.,1998). A dispetto di ciò forme ricostituite dell’enzima e rispettivamente prive di questo dominio manifestano una riduzione dell’affinità per il DNA di circa 20 volte e rilassano il substrato in maniera distributiva, quando confrontate con l’enzima wild-type (Stewart et al., 1997). Questo dominio acquisisce, inoltre, resistenza alla proteolisi in un enzima legato non covalentemente al DNA (Stewart et al., 1997). Queste evidenze hanno fatto ipotizzare che il linker potrebbe servire a trattenere l’estremità 5’ del filamento tagliato, in una conformazione che rallenta l’attacco nucleofilo al legame fosfotirosinico, ovvero la fase di risaldatura del filamento; in questo modo l’equilibrio taglio-risaldatura è influenzato e spostato verso il taglio, facilitando il rilassamento del DNA (Stewart et al., 1997; Fiorani et al., 2003).

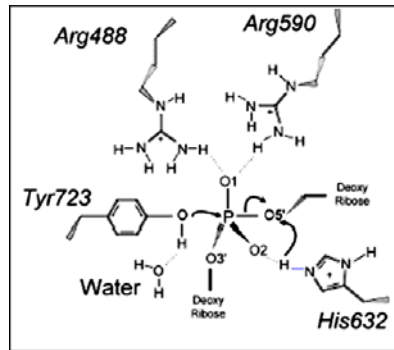




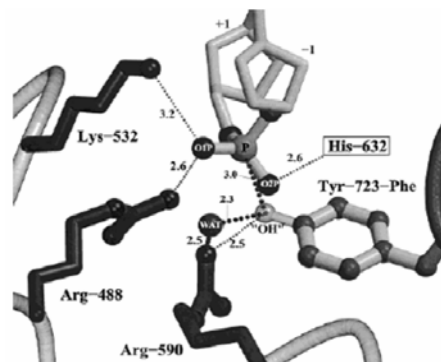
**Figura 13.** Stereovista delle catene laterali degli amminoacidi del sito attivo della topoisomerasi I umana. Le relazioni tridimensionali tra i residui del sito attivo e i gruppi fosfato del filamento scissile sono mostrati per la struttura contenente una citosina in posizione -1 del DNA. I legami idrogeno sono rappresentati da linee tratteggiate verdi.



**Figura 14.** E' mostrata una sovrapposizione tra l'interazione della Lys532 con la sequenza -1C e -1T. La coppia di basi C-G della struttura -1C è rappresentata in verde e la Lys-532 in rosso mentre le regioni equivalenti della struttura -1T sono azzurre (Redinbo et al., 2000).



**Figura 15.** Diagramma schematico di un possibile stadio intermedio della reazione di taglio della topoisomerasi I umana e sito attivo nel complesso covalente. I residui conservati del sito attivo Arg488, Arg590 e His632 (subdominio III del core) e la tirosina catalitica Tyr723 (dominio C-terminale) sono mostrati intorno al fosfato scissile del DNA, che è coordinato secondo una bipiramide trigonale (Stewart et al., 1998).



**Figura 16.** Putativa acqua catalitica (WAT) e catene laterali catalitiche nel sito attivo del -1C. Lys532 e Arg488 formano, rispettivamente, legami idrogeno di 3,2 Å e 2,6 Å con l'O1P non legante e His632 dista 2,6 Å dall'altro ossigeno non legante, O2P. La potenziale acqua catalitica, proposta come una base specifica nella reazione di taglio del filamento, dà luogo ad un legame idrogeno di 2,5 Å con Arg590. L'idrossile tirosinico, se posizionato nel mutante Tyr723Phe, sarebbe a 3 Å dal fosforo, 2,3 Å dalla putativa acqua catalitica e 2,5 Å dal gruppo guanidinico dell'Arg590 (Redinbo et al., 2000).

Quindi potenziali interazioni tra l'enzima, nella sua forma chiusa, e il DNA, combinate con un certo grado di flessibilità della proteina, aumentata proprio dal dominio linker, permettono di accomodare le rotazioni del duplex attraverso locali cambiamenti conformazionali (Leppard et al., 2005).

*Risaldatura del DNA e rilascio dell'enzima.*

la reazione di risaldatura delle due estremità del filamento tagliato è sostanzialmente l'inverso della reazione di transesterificazione della reazione di taglio, in questo caso, però, l'attacco nucleofilo al legame fosfodiesterico è guidato dall'estremità 5' idrossilica, generatasi precedentemente (Champoux, 1981). La continuità della doppia elica è ripristinata e l'enzima, non più legato covalentemente al DNA, è rilasciato.

*Espressione e localizzazione cellulare.*

La sequenza di DNA codificante la topoisomerasi IB umana, presente su un gene a singola copia che mappa una regione cromosomica 20q12 (Juan et al., 1988), è composta da 21 esoni contenenti alcuni siti di splicing che fanno presupporre la possibilità che esistano varianti dell'enzima (Larsen et al., 1999). Il promotore privo di elementi regolatori del tipo TATA o CCAAT contiene siti di legame per fattori trascrizionali generici, quali Sp1, il fattore trascrizionale ottamerico (OTF), proteine che legano gli elementi di risposta all' c-AMP, NF-kB e siti di legame per fattori con motivi strutturali HLH e cerniera di leucina (Kunze et al., 1991; Heiland et al., 1993); quest'ultimi sono noti per essere attivati come risposta a stimoli esterni o in condizione di stress cellulare.

La topoisomerasi I non mostra significanti alterazioni nella quantità e nella stabilità durante il ciclo cellulare (Heck et al., 1988; Baker et al., 1995) inoltre la sua attività catalitica risulta essere comparabile in diverse cellule umane (quali fegato, cervello, ovaio, testicolo, tonsille) (Bronstein et al., 1996). Questo non accade nel caso di tumori, dove l'attività della topoisomerasi varia sia tra differenti tipi di tumore, ad esempio è stata riscontrata aumentare in quello prostatico, della cervice e colonrettale a differenza del ganglioneuroblastoma e del tumore al seno nei quali risulta diminuire (Larsen et al., 1999), sia tra differenti pazienti con lo stesso tumore (Muller, 1985).

In tutti gli eucarioti superiori le DNA topoisomerasi I sono enzimi essenziali a partire dalla loro richiesta per la vitalità sia in *Drosophila* (Lee et al., 1993) che nel topo (Morham et al., 1996). Nelle cellule umane la

topoisomerasi I è costitutivamente espressa durante tutto il ciclo cellulare (Baker et al, 1995) e diversi studi hanno rivelato che si tratta di una proteina nucleare presente principalmente nel nucleolo (Muller, 1985; Zhang et al., 1988; Christensen et al., 2004). Un ruolo chiave nella sua localizzazione (nucleoplasma/nucleolo) è giocato dal dominio N-terminale, il quale contiene cinque sequenze di localizzazione nucleare o NLS (“Nuclear Localization Signals”) (Alsner et al., 1992; Mo et al., 2000) ed inoltre è in grado di mediare un’associazione con l’oloenzima RNA polimerasi I nel nucleolo (Hannan et al., 1998; Christensen et al., 2004). Numerose osservazioni indicano che la topoisomerasi occupa un ruolo nei processi associati al DNA ribosomale (rDNA) nel nucleolo (organello responsabile per la biogenesi del ribosoma). L’elevata concentrazione dell’enzima in questo compartimento subcellulare è spiegata dall’intensa attività trascrizionale cellulare, circa il 40-60%, che riguarda proprio il DNA ribosomale generando superavvolgimenti che devono essere continuamente rilassati (Hannan et al., 1998). Durante la trascrizione del rDNA le molecole di topoisomerasi I sono localizzate assieme all’RNA polimerasi I nel centro fibrillare del nucleolo e vi restano associate anche quando queste si allontanano verso il perimetro del nucleolo (Christensen et al., 2004). Inoltre le topoisomerasi, l’RNA polimerasi I e altri fattori coinvolti nella trascrizione restano associate agli organizzatori nucleolari (NOR, ovvero, regioni cromosomiche associate con un nucleolo) durante la mitosi e lungo tutta la durata del ciclo cellulare, probabilmente permettendo una più rapida organizzazione nucleolare e un più veloce inizio della trascrizione del rDNA, dopo la divisione cellulare (Hannan et al., 1998; Christensen et al., 2002).

Il meccanismo di localizzazione nucleolare della topoisomerasi I è stato fonte di grande interesse. Nonostante esista una forte associazione tra la topoisomerasi I e l’RNA polimerasi I, quest’ultima non è richiesta per la localizzazione nucleolare della topoisomerasi stessa. Infatti esiste uno scambio dinamico della topoisomerasi I tra il nucleolo e il nucleoplasma, osservato utilizzando il metodo FLIP (photobleaching analysis) che vede la topoisomerasi I fluorescente monitorata nei suoi spostamenti. Il recupero della fluorescenza dopo l’analisi di photobleaching rivela che l’accumulo di quest’enzima nel nucleolo si deve ad una sua più lenta mobilità in questo comparto rispetto a quella che è presente nel nucleoplasma. Sebbene il motivo di questa differenza è sconosciuto uno dei fattori che potrebbe contribuire è l’alto numero di processi, come la replicazione e la trascrizione, che richiedono la topoisomerasi I nel nucleolo. Questa ipotesi è supportata dal fatto che mutanti cataliticamente inattivi dell’enzima non sono

accumulati nel nucleolo, ma sono distribuiti equamente in tutto il nucleo (Christensen et al., 2002).

### ***Attività e funzioni biologiche.***

La DNA topoisomerasi negli organismi inferiori, quali il lievito, non è essenziale (Uemura et al., 1984; Goto et al., 1985); negli organismi superiori, invece, la sua assenza determina la morte nei primi stadi dello sviluppo (Lee et al., 1993; Morham et al., 1996). Queste diversità hanno suggerito che, in organismi multicellulari, l'enzima svolga funzioni addizionali rispetto a quelle osservate in organismi più semplici nonostante i singoli eventi coinvolti siano ancora poco chiari, di certo si ha l'esistenza dell'interazione della topoisomerasi con altre proteine, come accennato in precedenza, oltre che con il DNA. Ad esempio, durante la replicazione la topoisomerasi I si localizza a livello della forca di replicazione (Fig. 17) e nella trascrizione a livello dell'apertura delle due eliche, dove si associa con l'RNA polimerasi II che si trova a sua volta associata con altri fattori di trascrizione (Lebel et al., 1999). Nella replicazione si può anche osservare l'interazione dell'enzima con la DNA elicasi WRN in quanto l'elicasi, svolgendo la molecola di DNA, crea stress topologici, quali superavvolgimenti positivi, che devono essere risolti (Leppard et al., 2005).

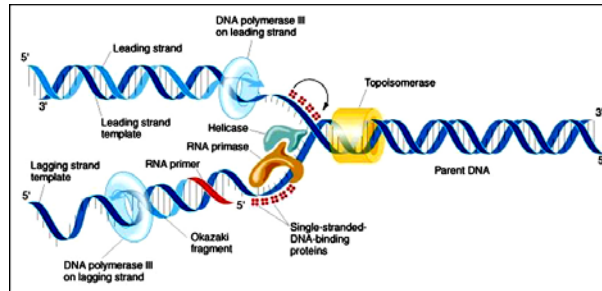
La DNA topoisomerasi partecipa alla regolazione della trascrizione di quei geni che presentano nel proprio promotore le cassette TATA. Il meccanismo è indipendente dalla sua attività di taglio e risaldatura del filamento (Merino et al., 1993; Shykind et al., 1997) e richiede una associazione fisica con componenti diverse del complesso del fattore TFIID (Bullock et al., 1984; Hino et al., 1989; Wang et al., 1991; Kretzschmar et al., 1993); in questo modo l'enzima può sia reprimere un livello basale di trascrizione sia aumentare un livello di espressione pre-esistente.

Rossi ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che la topoisomerasi è coinvolta nella fosforilazione dei fattori di "splicing". La modificazione chimica di questi fattori determina lo splicing alternativo, ovvero, il diverso processamento dell'mRNA che, di conseguenza, influenza le caratteristiche delle proteine sintetizzate (Rossi et al., 1996). Il legame dei fattori di splicing con la DNA topoisomerasi I coinvolge i residui 139-175 del dominio N-terminale, mentre il sito di legame dell'ATP sembra essere localizzato in una regione che si estende dal residuo 641 al 765, comprendente il dominio C-terminale (Labourier et al., 1998; Rossi et al., 1998).

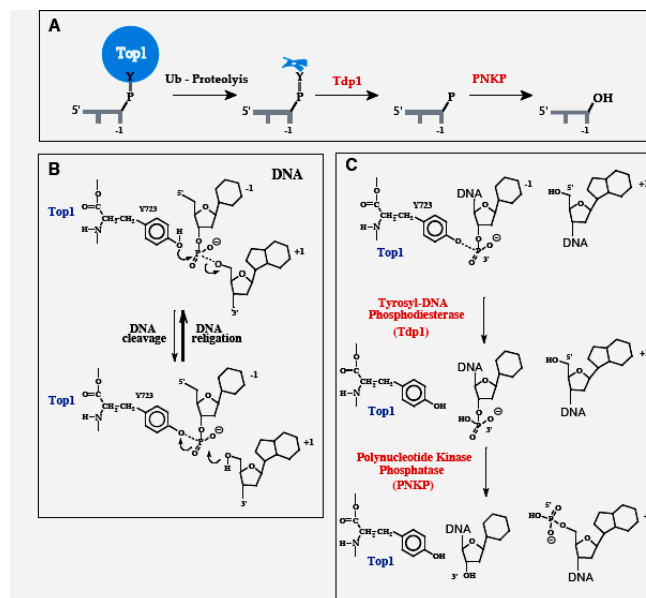
Il processo metabolico della ricombinazione vede una maggiore attività dell'enzima soprattutto a livello dei siti preferenziali di taglio (Pourquier et al., 1997) mostrando somiglianze strutturali e funzionali con le ricombinasi sito specifiche (Lanza et al., 1996). A volte può avvenire che, alla fine della reazione, la topoisomerasi I rileghi tra loro l'estremità 3' del filamento tagliato con l'estremità 5' di una molecola di DNA eterogenea, determinando una ricombinazione non omologa (Anderson et al., 1994), responsabile di instabilità genetica e associata all'insorgenza di neoplasie. Inoltre l'enzima ha la capacità di riconoscere danni endogeni del DNA come errori nell'appaiamento di basi, mutazioni di singoli nucleotidi e alcune forme di danni ossidativi. Questo riconoscimento porta alla formazione di un complesso stabile covalente DNA-topoisomerasi I nelle vicinanze del sito danneggiato (Kimura et al., 1997). La formazione di questi complessi covalenti rappresenta una barriera fisica per la replicazione e trascrizione e può condurre alla formazione di danni irreversibili per la continuità del DNA, in quanto impedisce la risaldatura del filamento tagliato. La formazione di tali complessi è associata, infatti, con l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione dei geni coinvolti nel riparo del DNA e/o apoptosi (Rubbi et al., 2003; Vousden et al., 2002). Le cellule presentano un efficiente sistema di riparazione in grado di risolvere questa e altre tipologie di danno al DNA (Leppard et al., 2005). Nel caso specifico della topoisomerasi I il legame covalente tirosina-DNA viene riconosciuto, l'enzima eliminato e il DNA preparato alla successiva risaldatura. In alternativa, la lesione può essere rimossa dal sistema di escissione-riparazione (Connelly et al., 2004). La via di escissione vede la tirosil-DNAfosfodiesterasi 1 (Tdp1) coinvolgere il complesso XRCC1 e il BER (*Base Excision Repair*). La proteina Tdp1, identificata prima nel lievito e poi nell'uomo, si associa, in quest'ultimo, con fattori di riparo di DNA a singolo filamento tagliati (SSBR), come XRCC1 e la polinucleotide chinasi fosfatasi (PNKP) (Plo et al., 2003), probabilmente attraverso la sua diretta interazione con la DNA ligasi III (El-Khamisy et al., 2005). Il meccanismo è azionato dall'associazione di una poli(ADPribosio) polimerasi o PARP con lesioni interne al DNA, la quale attiva PARP stessa nel reclutamento del complesso di riparo DNA ligasi III/ XRCC1 (Leppard et al., 2003; Okano et al., 2003). La figura 18 mostra il meccanismo di azione del complesso, dove in seguito all'azione della Tdp1, che catalizza il taglio del legame fosfotirosinico liberando una estremità 3'fosfato (Raymond et al., 2005), la PNKP processa entrambe le estremità generate nel sito danneggiato. PNKP idrolizza l'estremità 3'fosfato in 3'idrossile e fosforila l'estremità 5', quindi la

continuità della doppia elica è ristabilita da una successiva attività della DNA polimerasi e/o ligasi III.

Nelle cellule umane non è ancora stato chiarito il coinvolgimento di altri sistemi di riparazione dell'intermedio bloccato topoisomerasi-DNA oltre al SSBR. Da esperimenti effettuati in lievito, si è visto che il complesso covalente, che si viene a formare, può essere risolto attraverso il sistema di riparo delle lesioni della doppia elica (DSBR) che si sovrappone al riparo dipendente dalla Tdp1 (Pouliot et al., 2001). Ulteriori fattori implicati nei sistemi di riparo di lievito, quali le endonucleasi struttura-specifiche Rad1/Rad10 e Mus81/Mms4, sono stati trovati anche nell'uomo e vengono implicati in tre diversi meccanismi per il riparo del complesso covalente della topoisomerasi (Connelly et al., 2004; Liu et al., 2002; Vance et al., 2002). La proteina Mus81 umana co-localizza con l'elicasi WRN nel nucleolo durante la fase S del ciclo cellulare (Gao et al., 2003), suggerendo la possibilità che il complesso DNA-topoisomerasi possa essere riparato attraverso un meccanismo dipendente da WRN e Mus81 durante questa fase del ciclo. Se questi sistemi non sono in grado di riparare i danni al DNA viene evocata una risposta analoga a quella causata dagli inibitori della trascrizione. Si osserva, quindi, la traslocazione della topoisomerasi I dal nucleolo al nucleoplasma, la distruzione del nucleolo e la stabilizzazione di p53 nel nucleo che porta all'arresto del ciclo cellulare e ad un'eccessiva regolazione dei geni coinvolti nel riparo del DNA e nell'apoptosi (Rubbi et al., 2003). La topoisomerasi I, inoltre, si associa *in vivo* con p53 e in sua assenza non è in grado, in seguito ad un danno al DNA, di traslocare dal nucleolo al nucleoplasma (Mao et al., 2002). La topoisomerasi I, quindi, sembrerebbe coinvolta nella risposta dipendente da p53 ad un danno al DNA che comporta o l'attivazione del sistema di riparo o induzione dell'apoptosi se il danno è troppo esteso.



**Figura 17.** Ruolo e localizzazione della topoisomerasi durante la replicazione.



**Figura 18:** Riparo del complesso covalente topoisomerasi I mediante il meccanismo Tdp1-PNKP. **A)** Diagramma schematico delle azioni successive da Tdp1 a PNKP. **B)** Reazioni di transesterificazione catalizzate da topoisomerasi I. **C)** Tdp1 idrolizza il legame fosfotirosinico: PNKP idrolizza il 3'P e fosforila il 5' dell'estremità tagliata del DNA che diventa nuovo substrato per la ligasi o per la polimerasi.



### ***Regolazione post-traduzionale e della sua attività.***

L'attività catalitica della topoisomerasi I umana è in gran parte dipendente dal suo stato di fosforilazione, in quanto se defosforilata perde la capacità di rilassare i DNA superavvolti (Larsen et al., 1999). La fosforilazione dell'enzima, da parte di diverse chinasi come la casein chinasi, la protein chinasi C (pkC) e la c-Abl tirosin chinasi, coinvolge residui di serina e tirosina e determina un aumento dell'attività enzimatica (Tse-Dinh et al., 1984; Durban et al., 1983; Coderoni et al., 1990). Residui di serina fosforilabili sono stati localizzati all'interno del dominio N-terminale della proteina, mentre la Tyr286, fosforilata dalla c-Abl chinasi, è localizzata nel core subdominio II. In vitro mutazioni di questo residuo decrementano la fosforilazione da parte di questa chinasi, generalmente attivata da lesioni del DNA, ma non la eliminano totalmente, indicando che sono presenti altri siti di fosforilazione, non ancora identificati (Yu et al., 2004).

Lesioni al DNA causate da vari agenti tossici provocano l'attivazione della poli ADP-ribosilazione, modificazione post-traduzionale delle proteine cromosomali, che agisce anche sulla topoisomerasi I (Ferro et al., 1984). Questa modificazione inibisce maggiormente l'enzima nelle vicinanze del DNA danneggiato, determinando una diminuzione della replicazione fino al completo riparo del DNA stesso.

### ***Inibitori della DNA topoisomerasi I.***

Le DNA topoisomerasi ricoprono un importante ruolo clinico, in quanto sono il bersaglio cellulare di numerosi agenti antineoplastici ed antimicrobici (Wang et al., 1997). Grazie ad una intensa ricerca svoltasi in questi ultimi anni è stato possibile avere una migliore comprensione del meccanismo di questi enzimi, della loro interazione con il DNA e con questo tipo di farmaci oltre a consentire la produzione e l'isolamento di composti sempre più efficaci dal punto di vista terapeutico e specifici per alcuni tipi di tumore.

Gli inibitori vengono suddivisi in due classi a seconda del loro meccanismo di azione:

- Classe I: agiscono stabilizzando il complesso covalente enzima-DNA ed il camptotepite è rappresentato dalla camptotecina.

- Classe II: bloccano il legame enzima-DNA mediante interazione con la topoisomerasi (Boege et al., 1996) o col DNA (Bridewell et al., 1997) ed i maggiori rappresentanti sono i flavonoidi.

Un meccanismo di inibizione del tutto differente da quelli elencati nei due punti precedenti è stato proposto per il composto  $\beta$ -lapacione (3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b]piran-5,6-dione), inibitore selettivo della topoisomerasi I umana. Dagli studi eseguiti da Li e dai suoi collaboratori risulta che il  $\beta$ -lapacione inibisce l'attività catalitica dell'enzima in quanto non permette che avvenga la reazione di taglio. Infatti, il suo meccanismo di azione non avviene attraverso la stabilizzazione del complesso covalente di taglio enzima-DNA, come sia ha per la camptotecina (che verrà successivamente descritta), né interagendo o intercalandosi con il DNA substrato, come nel caso degli inibitori di seconda classe. Quindi è stata suggerita una diretta interazione dell'inibitore con l'enzima in grado di bloccare la formazione del complesso covalente, senza impedire il legame non covalente del DNA all'enzima. In questo modo la topoisomerasi I, il DNA ed il  $\beta$ -lapacione formano un complesso ternario cataliticamente inattivo ed infine si può ipotizzare una natura non competitiva dell'inibizione (Li et al., 1993).

#### ***L'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA).***

Risulta necessario uno sviluppo sempre maggiore di nuovi inibitori della topoisomerasi I umana non camptotecinici come farmaci antitumorali in quanto l'attività delle camptotecine è limitata dal loro equilibrio con la forma carbossilica inattiva a pH fisiologico ed il complesso enzima-DNA-CPT risulta reversibile dopo la rimozione del farmaco (Pommier et al., 1999).

Grande interesse, in questa ricerca, è stato rivolto sugli acidi grassi polinsaturi "n-3" o " $\omega$ 3" (con cui si indica la posizione del primo doppio legame successivo al primo atomo di carbonio metilico definito C1) che hanno mostrato capacità nel ridurre la crescita tumorale *in vivo* ed *in vitro* (Field et al., 2004). Appartengono alla categoria degli acidi grassi " $\omega$ 3", presenti in alimenti marini ed in alcune piante, l'acido  $\alpha$ -linolenico (con una catena di 18 atomi di carbonio), essenziale all'organismo, e l'acido eicosapentaenoico (con 20 atomi di carbonio), che deriva dalla metabolizzazione del primo, necessario al corretto funzionamento di organi ed apparati e alla protezione verso l'aterosclerosi e malattie cardio-vascolari (Fig. 19). Questi acidi grassi sono in grado di alterare la crescita tumorale

rallentando o bloccando la replicazione cellulare mediante interferenze con le fasi del ciclo cellulare, oppure aumentando la morte cellulare attraverso la necrosi e/o apoptosi. Gli effetti antitumorali, mostrati *in vivo*, possono essere mediati anche dagli effetti del sistema immunitario dell'ospite. Numerosi meccanismi sono stati proposti per la loro influenza sulla risposta immunitaria, che includono cambiamenti nella struttura e composizione della membrana cellulare fosfolipidica, nelle proteine e segnali di membrana (ad esempio recettori, segnali di trasduzione), nell'espressione genica e nello sviluppo immunitario.

Recentemente sono stati considerati di grande interesse gli acidi grassi coniugati dei due acidi elencati precedentemente, ovvero isomeri posizionali e geometrici in cui sono presenti doppi legami coniugati, per la loro grande attività inibitoria tumorale rispetto agli stessi acidi non coniugati (Yonezawa et al., 2005). In particolare, l'acido cis-eicosapentaenoico coniugato (cEPA; 5Z7E9E14Z17Z-20:5), che si trova in alghe rosse e verdi, ha attirato l'attenzione dei ricercatori poiché ha mostrato un forte effetto antitumorale su cellule tumorali trapiantate in topi nudi. In questi topi nutriti con il cEPA è stato dimostrato che l'acido coniugato, soggetto alla perossidasi lipidica, crea uno stress ossidativo nelle cellule tumorali, inducendo l'apoptosi e l'inibizione della crescita cellulare, ma non nei tessuti sani (Tsuzuki et al., 2004). Studi successivi *in vitro* hanno mostrato come il cEPA (Fig. 19) sia anche un potente inibitore della topoisomerasi I umana, nonostante ancora non sia noto il suo meccanismo molecolare di inibizione.

### ***La camptotecina.***

Le topoisomerasi I sono l'unico bersaglio di una classe di droghe della famiglia dei quinoloni, che hanno come capostipite la camptotecina (Hsiang et al., 1985; Hsiang et al., 1988). La camptotecina è un alcaloide indolo monoterpeneoide presente nella corteccia, nel legno e nei frutti di una pianta asiatica della famiglia delle Nyssaceae, la *Camptotheca acuminata* (Wall et al., 1966). Questa molecola presenta un sistema di anelli pentaciclico che comprende una subunità chinolinica (anelli A e B) fusa attraverso due anelli interposti (C e D) ad un anello terminale  $\alpha$ -idrossi- $\delta$ -lattone con un centro chirale nella posizione C-20 (E) (Fig. 20) (Wall et al., 1966). Studi di rimozione degli anelli A, A-B o A-B e C hanno mostrato che i composti tetra, tri e biciclici che si vengono a formare sono privi di attività inibitoria (Wall et al., 1995); mentre l'aggiunta di un ulteriore anello, con la formazione di derivati esaciclici, non determina alcuna alterazione

dell'efficacia. Quindi lo scheletro di cinque anelli è la struttura minima richiesta per l'attività del farmaco (Wani et al., 1980) e la sua configurazione planare è essenziale per l'inibizione della topoisomerasi I.

Altre caratteristiche possono, però alterare la citotossicità evidenziando un decremento nell'efficacia, quali modificazioni dell'anello E, che coinvolgono il 20(S)idrossile o il gruppo  $\alpha$ -idrossilattionico, modificazioni del gruppo piridone dell'anello D, sostituzioni nella posizione 12 dell'anello A o la saturazione dell'anello B (Hertzberg et al., 1989; Wall et al., 1977; Wani et al., 1987; Nicholas et al., 1990) al contrario, ben tollerate e spesso stimolatrici della tossicità del farmaco sono le sostituzioni nelle posizioni 9, 10 e 11 dell'anello A (Sawada et al., 1996; Crow et al., 1992).

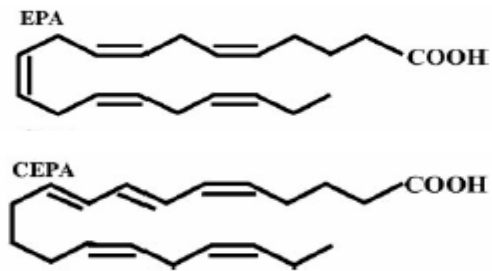
Ad esempio la camptotecina presente in natura nella forma 20 (S) è in grado d'inibire la topoisomerasi I 10-100 volte più potentemente dell'isomero 20 (R) (Garcia-Carbonero et al., 2002). Un' ulteriore caratteristica strutturale importante riguarda il gruppo  $\alpha$ -idrossilattionico dell'anello E che è soggetto ad idrolisi spontanea e reversibile portando all'apertura dell'anello, forma carbossilata, a pH neutro o alcalino. Quindi in soluzione si viene a creare un equilibrio dinamico pH dipendente tra la forma lattionica ad anello chiuso e quella carbossilica (Fig. 21). La forma carbossilica, molto più solubile, è considerata quasi del tutto inattiva, mentre la forma lattionica è quella che presenta un'attività citotossica più elevata, ma una solubilità inferiore (Fassberg et al., 1992; Pizzolato et al., 2003). In alcuni distretti dell'organismo umano in cui vi è un'alta acidità (ad esempio la vescica), l'acido carbossilico si converte in lattone, comportando forti effetti collaterali come gravi cistiti emorragiche. Inoltre, la sua scarsa solubilità ha comportato problemi nella somministrazione, tanto che la sua sperimentazione clinica è stata fermata nel 1972. Per questi motivi la camptotecina non è impiegata nella cura di alcuni tumori come quello delle ovaie e quello colon-rettale, ma si preferiscono dei suoi derivati maggiormente solubili come il topotecano e l'irinotecano (Fig. 22). Il topotecano (9-[(dimetilammino)metil]-10-idrossicamptotecina), il cui nome farmacologico è Hycamptyn, è stato il primo analogo della camptotecina ad essere approvato per usi clinici (nel 1996) dalla US Food and Drug Administration, eccellente antitumorale *in vitro* (Kingsbury et al., 1991), manifesta la sua maggiore attività nei confronti di adenocarcinomi delle ovaie e del colon, tumori del sistema nervoso centrale e sarcomi (Houghton et al., 1992; Friedman et al., 1994; Pratesi et al., 1995). L'irinotecano (7-etil-10[4-(1-piperidin)-1-piperidin]carbonilossicamptotecina), o Camptosar è attivo contro il cancro dei polmoni, della cervice e delle ovaie (Ulukan et al.,

2002). La caratteristica peculiare di questa droga è la sua estesa catena laterale dipiperidinica, che rende il farmaco molto solubile, ma sostanzialmente inattivo, l'eliminazione di questa, grazie all'attività di carbossilesterasi (soprattutto nel fegato e nel distretto gastrointestinale), determina la formazione del metabolita SN-38, che è 1000 volte più potente dell'irinotecano; SN-38 è, quindi, la forma attiva del farmaco.

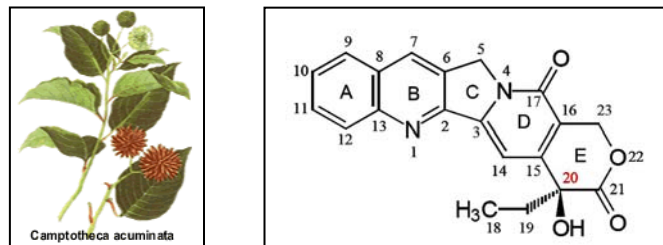
#### ***Meccanismo di morte cellulare e citotossicità.***

Il principale meccanismo di inibizione delle camptotecine vede la stabilizzazione del complesso covalente topoisomerasi I-DNA, formatosi durante il ciclo catalitico, inibendo specificatamente la reazione di risaldatura del filamento (Svejstrup et al., 1991). In normali condizioni le rotture del singolo filamento sono transienti e presenti in basse concentrazioni allo stato stazionario, poiché la velocità di risaldatura è maggiore di quella di taglio (Champoux et al., 2001; Staker et al., 2005). Tuttavia, in circostanze che determinano la formazione del complesso ternario enzima-farmaco-DNA, possono verificarsi numerosi effetti deleteri, quali mutazione, inserzione, delezione e aberrazioni cromosomiche (Cozzarelli et al., 1990; Corbett et al., 1993; Liu., 1990; Anderson et al., 1994; Ferguson et al., 1994). Infatti, mentre l'attività di risaldatura della topoisomerasi viene diminuita da questi farmaci, le macchine replicative e trascrizionali collidono con il complesso covalente enzima-DNA rendendolo irreversibile, poiché l'estremità 5' del filamento tagliato del DNA stampo non è più allineato con il suo substrato (Pommier, 2006). Le lesioni così provocate sono inizialmente bersaglio di vie di ricombinazione e riparo, ma quando presenti in concentrazioni sufficienti azionano una serie di eventi che, in ultimo, culminano nella morte cellulare per necrosi o apoptosi (Gupta et al., 1995; Chen et al., 1994; Liu et al., 1994; Pommier et al., 1994; Pommier., 1995).

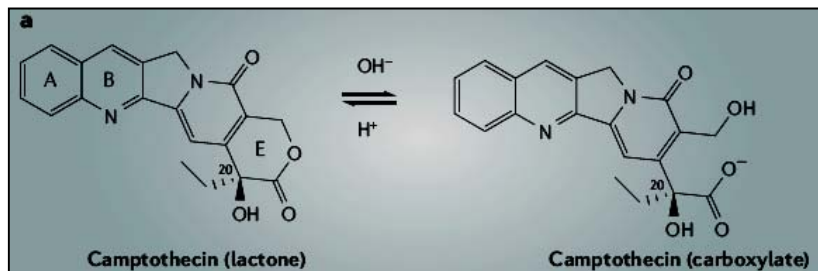
Nelle cellule in divisione, il primo meccanismo citotossico dovuto ad inibitori delle topoisomerasi è la collisione con la forca di replicazione; infatti le cellule tumorali in cultura tendono ad essere resistenti, fuori dalla fase S (O'Connor et al., 1991), quando la replicazione viene arrestata prima della somministrazione della CPT (Hsiang et al., 1989). Ad ogni modo, come accade per tutti gli altri agenti ciclo-specifici, la citotossicità aumenta proporzionalmente al tempo di esposizione; inoltre il farmaco è comunque maggiormente efficace su cellule in attiva replicazione cellulare, ovvero su cellule tumorali, rispetto a cellule sane.



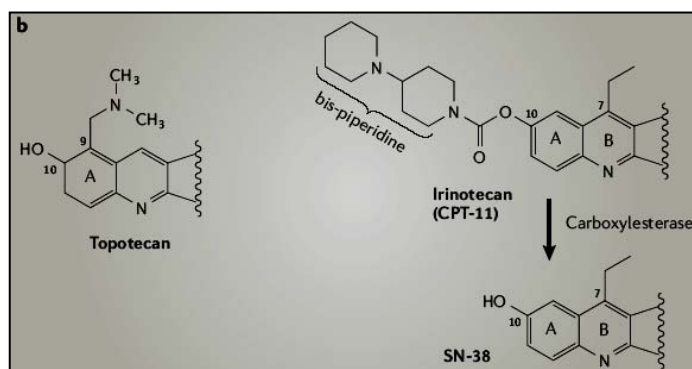
**Figura 19.** Struttura chimica dell'acido eicosapentaenoico (EPA; 5Z8Z11Z14Z17Z-20:5) e dell'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA; 5Z7E9E14Z17Z-20:5) (Tsuzuki et al., 2004)



**Figura 20:** *Camptotheca acuminata* (sinistra) e struttura della molecola della camptotecina (destra).



**Figura 21.** Equilibrio dinamico della CPT (Pommier, 2006).



**Figura 22:** Struttura del topotecano (sinistra), dell'irinotecano (destra) e del suo derivato più attivo SN-38 (Pommier, 2006).

La natura del danno provocato dal sistema di replicazione è dovuta alla conversione del complesso covalente in una rottura del doppio filamento, in seguito alla replicazione dell'ultimo nucleotide al 5' terminale del filamento principale (Strumberg et al., 2000). Quindi, il grosso accumulo dei complessi ternari, in seguito alla somministrazione della camptotecina, e i cambiamenti indotti da questa sul DNA avviano varie risposte cellulari che possono portare alla rapida rilocalizzazione della topoisomerasi dal nucleolo al nucleoplasma, all'arresto del ciclo cellulare nella fase G2, alla stabilizzazione di p53 e alla morte cellulare (Liu et al., 2000).

Come accennato in precedenza, anche per i complessi trascrizionali, al pari di quelli replicativi, è stato proposto un meccanismo per la conversione del complesso covalente reversibile in un complesso irreversibile. Nonostante la natura dei danni provocati non sia stata ancora ben caratterizzata è stato osservato che le lesioni al DNA causate dalla trascrizione associata al complesso covalente, possono indurre apoptosi in cellule come i neuroni e i linfociti (Pommier, 2006).

L'azione delle camptotecine, quindi, non è dovuta all'inibizione dell'attività enzimatica, ma alla conversione della topoisomerasi I in veleno cellulare (Chen et al., 1994).

### ***Interazioni atomiche farmaco-complesso.***

I primi studi sull'interazione della camptotecina con l'enzima hanno dimostrato che il farmaco intrappola il complesso covalente della topoisomerasi attraverso un unico meccanismo. Inoltre, la camptotecina non si lega all'enzima libero e solamente in maniera debole al DNA non ancora coinvolto nell'intermedio covalente (Leteurtre et al., 1993). Grazie ad analisi di sequenze dei siti di taglio della topoisomerasi I è stata proposta la possibilità della camptotecina di intrappolare il complesso covalente enzimatico formando un complesso ternario con una molecola di farmaco accatastata tra due paia di basi (Fig. 23) che si trovano al fianco del sito di taglio del DNA associato all'enzima (Jaxel et al., 1991). Questo complesso è maggiormente stabilizzato quando è presente una guanina sulla posizione +1 del filamento scissile, immediatamente a valle del sito di taglio, e una timina in posizione -1, a monte del sito di taglio. In più, dato che solamente l'enantiomero naturale 20(S) della camptotecina è attivo, è possibile ipotizzare l'esistenza di una stereospecificità del sito di legame per la droga sulla superficie del complesso covalente (Jaxel et al., 1989).



L'analisi cristallografica dei complessi ternari, costituiti dal DNA, dalla topoisomerasi e da diversi derivati della CPT (ad esempio il topotecano) ha confermato tale ipotesi; in tutti i cristalli infatti ogni anello policiclico-aromatico della droga si intercala tra la base -1 e la +1 del sito di cleavage.

L'ingresso del farmaco richiede l'apertura della doppia elica, ottenuta mediante il cambio conformazionale del legame fosfodiesterico opposto al sito di taglio. Il posizionamento di tale legame fosfodiesterico è, normalmente nel complesso binario, mediato da legami idrogeno tra Arg364 e l'azoto N3 dell'adenina -1 del filamento non scissile, come anche dal legame di Lys532 e l'ossigeno della timina in posizione -1 del sito di taglio. Addizionali interazioni nel complesso ternario sono state evidenziate con gli atomi di azoto della catena principale dei residui Arg362 e Gly363. Numerose mutazioni nella regione della lip1 (360-370) e lip2 (496-505), come anche nei due loop che ne stabilizzano la struttura, rispettivamente loop 417-423 e 529-538, determinano farmaco resistenza (Bailly et al., 1999; Urasaki et al., 2001; Fiorani et al., 1999; Chang et al., 2002; Saleem et al., 1997) probabilmente attraverso distorsioni strutturali di questi loop, che in ultimo alterano la posizione di Asp533, l'unico residuo proteico coinvolto in un'interazione diretta col 20(S)idrossile dell'anello E del farmaco (Chrencik et al., 2004). Un solo altro contatto proteina-farmaco, mediato dall'acqua, è presente e coinvolge Asn722 e l'ossigeno carbonilico dell'anello D della droga. L'intercalazione provoca un allontanamento di circa 8Å del gruppo idrossilico dell'estremità 5' dal legame fosfotirosinico rallentando, in questo modo, la fase di risaldataura del filamento.

La comparazione del cristallo del complesso ternario della camptotecina, ottenuto recentemente (Staker et al., 2005), con quello del topotecano, evidenzia una modalità di associazione pressoché identica. Una torsione di 11° della molecola di CPT, relativamente al TPT, lungo l'asse verticale della doppia elica di DNA, è dovuta, probabilmente, all'interazione sterica della sostituzione in posizione 7 dell'anello B del topotecano con la base adenosinica a monte (-1) del sito di taglio, sul filamento non scissile.

### ***Farmaco resistenza.***

I diversi meccanismi di resistenza agli inibitori della topoisomerasi I possono essere divisi in quattro gruppi:

- 1) meccanismi di pre-taglio relativi al metabolismo, accumulo e distribuzione intracellulari del farmaco;

- 2) meccanismi successivi al taglio, quali le numerose vie che conducono alla morte cellulare, includendo apoptosi, regolazione del ciclo cellulare e riparazione del DNA;
- 3) mutazioni dell'enzima risultanti in una diminuzione dei livelli del complesso covalente (Pommier et al., 1999).

La caratterizzazione biochimica di mutanti della topoisomerasi I, che mostrino resistenza nei confronti degli inibitori, consente di indagare sia il ruolo di specifici residui amminoacidici che i siti di legame degli inibitori stessi. Le diverse mutazioni possono diminuire o determinare la perdita dell'attività enzimatica, come anche alterare specifici passaggi del ciclo catalitico, che riducono il tempo di vita del complesso covalente (Fertala et al., 2000; Fiorani et al., 2003). L'analisi di strutture cristallografiche ha, inoltre, evidenziato che alcune delle mutazioni responsabili della farmacoresistenza, possano interessare residui coinvolti direttamente nell'associazione col farmaco o nella stabilizzazione della regione di intercalazione (Fig. 24) (Staker et al., 2002); per altre, invece, nessuna interazione diretta è stata evidenziata ed il meccanismo che conduce alla resistenza o all'ipersensibilità verso il farmaco rimane elusivo (Kubota et al., 1992; Scaldaferrò et al., 2001; Chang et al., 2002; Fiorani et al., 2003).

Inoltre la struttura cristallografica di enzimi mutati CPT-resistenti ha evidenziato che mutazioni puntiformi, distanti dal sito di legame della CPT, determinano conseguenze nel legame della droga attraverso effetti allosterici sui residui amminoacidici che formano i legami idrogeno diretti con la CPT (Marchand et al., 2006; Chrenick et al., 2004).

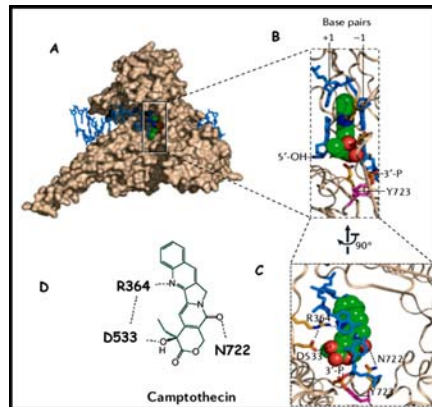
La necessità della presenza di una timina in posizione -1 per l'attività stabilizzatrice della CPT nei confronti del complesso binario è stata usata per spiegare la farmaco resistenza di un mutante della topoisomerasi I umana, Glu418Lys. Infatti, la maggiore preferenza del mutante, rispetto al wild-type, per i substrati che non hanno una timina in posizione -1 del filamento scissile, ha come conseguenza che questo, *in vivo*, possa tagliare su molte molecole di DNA in posizioni in cui la camptotecina non si può legare, motivandone una resistenza dipendente dal tempo (Fiorani et al., 2006). Oltre a prevenire la fase di risaldatura del DNA, alte concentrazioni di camptotecina e di topotecano inibiscono anche il rilassamento del DNA. Champoux nel 2001 aveva proposto un modello secondo il quale il legame della camptotecina al complesso enzima-DNA impedisce la rotazione del DNA così da diminuire la velocità di rilassamento (Champoux, 2001). Come spiegato nei paragrafi precedenti riguardanti la struttura ed il ciclo catalitico dell'enzima, il dominio linker svolge un ruolo fondamentale durante la fase

di rotazione del filamento di DNA e la seguente risaldatura. La delezione o mutazione (Ala653Pro) in questo dominio rende l'enzima resistente alla camptotecina, come osservato in saggi di rilassamento di DNA plasmidico *in vitro* (Fiorani et al., 2003). La motivazione di questo è dovuta al fatto che la mutazione, A653P determina una maggiore flessibilità del dominio linker (Fig. 25) e diminuisce la sua azione frenante durante la fase di rotazione, determinando una maggiore velocità di risaldatura ed una minore sensibilità alla camptotecina. L'eliminazione del dominio linker, infatti sposta l'equilibrio tra il cleavage e la risaldatura verso la risaldatura (Iretton et al., 2000). Quindi creare o individuare linee cellulari che mostrino resistenza nei confronti degli inibitori a causa di mutazioni consente sia di indagare il ruolo strutturale di specifici residui amminoacidici che di determinare la disposizione dell'inibitore nel complesso covalente (Staker et al., 2002).

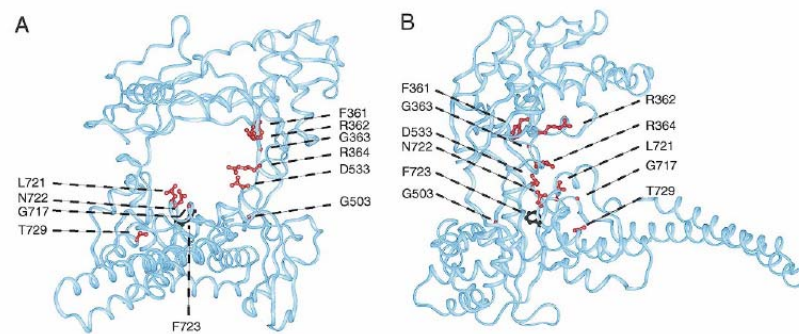
#### ***Aumento della sensibilità alla camptotecina.***

Il continuo sviluppo di nuovi farmaci sempre più efficaci dal punto di vista chemioterapico ha portato allo studio di mutazioni della topoisomerasi I che conferiscono ipersensibilità agli inibitori. Inoltre, possono essere ricavate notevoli informazioni sul ruolo di questi residui eventualmente mutati analogamente agli studi condotti sulle mutazioni farmaco-resistenti. A tal proposito sono stati selezionati per la prima volta, attraverso uno screening di cloni, alcuni mutanti della topoisomerasi I umana ipersensibili alla camptotecina in cellule di lievito (*S. cerevisiae*) (Scaldaferro et al., 2001).

Fra i vari cloni, ottenuti mediante saggi di citotossicità *in vivo*, ne è stato individuato uno con una doppia mutazione nella regione linker dell'enzima (Asp677Gly-Val703Ile) che mostra un incremento della sensibilità alla camptotecina, *in vivo*, 10 volte superiore rispetto alla proteina wild-type. Nonostante sia poco conosciuto il ruolo dei due residui mutati, è noto che l'Asp677 appartenga all'ansa tra le due  $\alpha$ -eliche del dominio linker, mentre la Val703 sia posta nella seconda  $\alpha$ -elica e prenda contatto con i residui idrofobi (in particolare con la Leu617) dell'elica adiacente (residui: 611-630) (Fig. 26). Quindi, la loro sostituzione potrebbe influenzare la struttura della proteina, in particolare la sostituzione della valina con l'isoleucina potrebbe modificare la superficie idrofoba del dominio linker. Le mutazioni del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile, per di più, non influiscono direttamente



**Figura 23:** A, La CPT è rappresentata in **verde**, la superficie della topoisomerasi I in **grigio** e l'elica di DNA duplex in **blu**. B, Ingrandimento del complesso ternario. La droga (in **verde**: atomi di carbonio, in **rosso**: ossigeni e in **blu**: atomi di azoto) è collocata tra le basi che fiancheggiano il sito di taglio della topoisomerasi (posizione -1: base legata alla Tyr-723 in **magenta**; posizione +1: estremità 5' del DNA tagliato). C, Legami idrogeno tra la CPT e i residui della top1. D, I residui della topoisomerasi evidenziati in **rosa** corrispondono ad alcune delle mutazioni che conferiscono la resistenza alla droga (Pommier, 2006).



**Figura 24.** Struttura della topoisomerasi I umana e raggruppamento dei residui associati con la farmaco resistenza. A e B mostrano la struttura proteica in una visione rispettivamente frontale e laterale rispetto al DNA (Pommier et al., 1999).

l'interazione della CPT con il complesso DNA-topoisomerasi, in quanto lontane dal presunto sito in cui si lega il farmaco.

### ***Il sistema di lievito *Saccharomyces cerevisiae* per selezionare mutanti sensibili alla camptotecina.***

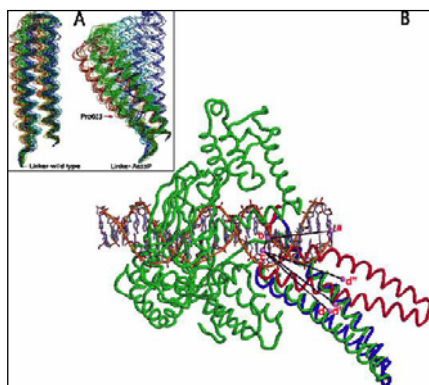
Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un sistema modello per lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari che determinano la sensibilità ai composti antitumorali, come le camptotecine. Le caratteristiche, dalle quali è dipesa la sua scelta, sono molteplici e peculiari. La relativamente bassa complessità del suo genoma aploide completamente sequenziato ( $1.2 \times 10^7$  bp), la velocità di crescita, la crescita in terreni liquidi e l'ampia varietà di marker di selezione utilizzabile rendono il lievito un sistema semplice ed economico per lo studio di molti enzimi esogeni fra i quali, appunto, le topoisomerasi (Cherry et al., 1997; Goffeau et al., 1996; Perego et al., 2000). In *S. cerevisiae* sono note due DNA topoisomerasi I, Topo1p e Top3p (codificate dai geni *Top1* e *Top3*) e una sola DNA topoisomerasi II. Il gene codificante la DNA topoisomerasi I (Top1p) non è essenziale e ceppi deleti di questo gene (*top1Δ*) crescono normalmente. E' quindi possibile introdurre in questi ceppi il gene della topoisomerasi IB umana esprimendola in assenza di complicazioni derivanti dall'enzima endogeno (Reid et al., 1998) ed analizzando il fenotipo di mutanti dell'enzima nei confronti dei farmaci antitumorali.

Il sistema si è mostrato particolarmente duttile per lo studio della camptotecina e del suo bersaglio cellulare. Infatti le cellule di lievito *topo1Δ*, mancanti dell'obbiettivo del farmaco, sono naturalmente resistenti ad esso e un'alterata sensibilità dell'enzima nei confronti della camptotecina, introdotta da mutazioni nella sequenza amminoacidica, può esser facilmente messa in evidenza utilizzando ceppi deleti nel gene RAD52, coinvolto nel riparo del DNA (Bjornsti et al., 2002). Tra l'altro questa è un'ulteriore prova del fatto che la citotossicità della CPT è dovuta alla stabilizzazione e all'accumulo dei complessi covalenti enzima-DNA piuttosto che ad un'inibizione dell'enzima (Reid et al., 1998).

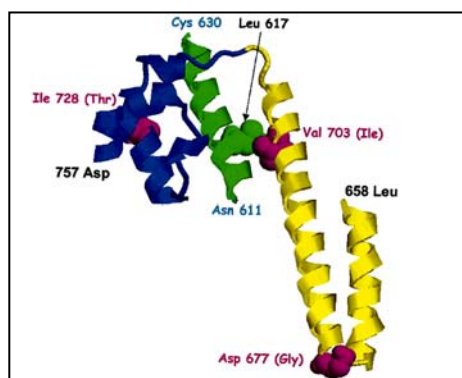
Per l'espressione della topoisomerasi I umana in lievito sono disponibili diversi vettori plasmidici che possiedono URA3 e HIS3, come marker di selezione, in grado di compensare specifiche mutazioni del lievito quali *URA3-52* o *HIS-Δ1*. Tra i plasmidi più usati nella trasformazione del lievito, che possono essere mantenuti come episomi o integrati nel genoma

attraverso ricombinazione omologa (Sikorski et al., 1989; Christianson et al., 1992; Funk et al., 2002), ci sono quelli centromerici (YCp) oppure i vettori episomali (YEp). I primi contengono un'origine di replicazione (ARS) ed una sequenza centromerica (CEN) sono solitamente presenti nelle cellule in un basso numero di copie; i secondi, capaci di replicarsi autonomamente per la presenza di un segmento di 2  $\mu$ m che funziona da origine di replicazione, sono responsabili dell'alto numero di copie e dell'alta efficienza di trasformazione del vettore nelle cellule. Inoltre l'espressione dei geni, inseriti nei plasmidi, può essere fortemente regolata ponendo la loro sequenza sotto il controllo di promotori inducibili, come GAL1 e GAL10, o di promotori costitutivi (Reid et al., 1998).

Alcuni problemi, come la degradazione proteolitica dell'enzima, l'insensibilità dei ceppi selvatici alla maggior parte dei farmaci dovuta all'impermeabilità della parete cellulare o al trasporto della droga fuori dalla cellula (Benedetti et al., 1998), sorgono durante lo studio della topoisomerasi I e dei suoi inibitori. Questi vengono risolti mediante differenti stratagemmi come l'uso di ceppi privi di proteasi (Lindsley et al., 1991), lo sviluppo di ceppi permeabili a questi composti e la delezione di geni che codificano per i trasportatori di membrana.



**Figura 25.** Struttura iniziale e finale della dinamica molecolare sovrapposte alla struttura ai raggi X del complesso topoisomerasi I-DNA. La struttura di partenza dell'enzima nativo e di A653P è mostrata in verde. Le strutture finali dell'enzima nativo e di A653P sono rispettivamente mostrate in blu e rosso. **A.** Particolare del dominio linker. **B.** Proteina intera (Fiorani et al., 2003).



**Figura 26.** Le mutazioni Asp677Gly e Val703Ile, rappresentate in rosa sono localizzate nel dominio linker (in giallo). Nella struttura cristallografica la Val703 interagisce con residui idrofobi inclusa la Leu617, dell' $\alpha$ -elica 611-630 (dominio core, in verde) (Scaldferrero et al., 2001).

### ***Scopo del lavoro.***

La topoisomerasi I B umana è un enzima ubiquitario che svolge un ruolo chiave nel risolvere i problemi topologici del DNA durante processi cellulari essenziali. Inoltre risulta essere l'unico bersaglio del farmaco chemioterapico camptotecina e dei suoi derivati usati nella cura di tumori solidi, quali quello all'ovaio e al colon-retto. Lo studio di mutanti ipersensibili o resistenti ai farmaci permette di comprendere i meccanismi alla base del funzionamento dell'enzima, della sua interazione con la droga e dell'intercorrelazione tra i diversi domini proteici. Questo spiega il forte interesse nella caratterizzazione dell'enzima e dei suoi mutanti.

Il lavoro svolto durante il corso di dottorato è stato indirizzato all'analisi dell'ipersensibilità nei confronti della camptotecina manifestata dal doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile, già noto in letteratura (Scaldaferro et al., 2001). In questo mutante i due residui appartengono al dominio linker, un dominio lontano dal sito attivo dell'enzima e quindi dal sito di interazione con la camptotecina. La caratterizzazione biochimica dei diversi "steps" del ciclo catalitico dell'enzima ha permesso di capire il meccanismo molecolare con cui la proteina mutata esercita l'azione citotossica e di individuare le comunicazioni a lungo raggio tra i diversi domini.

Lo sviluppo sempre maggiore di nuovi farmaci antitumorali ha rivolto il nostro sguardo sull'azione inibitoria degli acidi grassi coniugati, in particolare, quella dell'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA). Uno dei principali target dell'azione di questo acido coniugato risulta essere la topoisomerasi I umana. Poiché ancora non è noto il suo meccanismo di azione, il secondo scopo della tesi è stato quello di indagare il meccanismo di inibizione, cercando di capire quali steps enzimatici va a bloccare; ovvero, se viene bloccata la fase di taglio o direttamente la fase di legame al DNA attraverso un'interazione diretta del cEPA con l'enzima.

Ulteriore parte del lavoro, nonché ultimo obiettivo, è stato rivolto alla caratterizzazione strutturale del dominio N-terminale, in quanto è l'unica regione dell'enzima non ancora cristallizzata ed inoltre le sue funzioni non sono del tutto chiare. Sono state, così, eseguite prove di espressione e purificazione del dominio al fine di identificare le condizioni ottimali di stabilità del campione in soluzione. Inoltre studi strutturali preliminari di dicroismo circolare e di fluorescenza sono stati effettuati per studiarne la struttura e la dinamica in soluzione mediante la tecnica spettroscopica dell'NMR.



## **RISULTATI E DISCUSSIONI.**

### ***CAPITOLO 1. Caratterizzazione del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile della topoisomerasi IB umana ipersensibile alla camptotecina in cellule di lievito.***

L'ipersensibilità alla camptotecina (CPT) del doppio mutante D677G-V703I della topoisomerasi IB umana è stata, prima di tutto, analizzata *in vivo* attraverso un saggio di sensibilità al farmaco. A tal fine, in questo esperimento, è stato appositamente utilizzato il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* JN2-134 *rad52Δ* che, mancante del meccanismo di riparo del DNA danneggiato, risulta essere maggiormente sensibile all'azione della camptotecina che, come descritto nell'introduzione, legatasi al complesso covalente enzima-DNA lo rende irreversibile e causa, così, la rottura del doppio filamento e la morte cellulare.

In figura 27 è mostrato il saggio di vitalità cellulare del ceppo JN2-134 trasformato con plasmidi multicopia (YEp), quali YEpGAL1-hTopoI (contenete il gene della topoisomerasi IB umana), YEpGAL1-hTopoI Asp677Gly-Val703Ile (che presenta il gene dell'enzima doppiamente mutato) e YEpGAL1 (privo del gene dell'enzima). Il vettore YEpGAL1 viene utilizzato come controllo interno di vitalità del ceppo, poiché, grazie all'assenza dell'espressione della topoisomerasi I, le cellule di lievito riescono a crescere sia in assenza che in presenza della CPT. Le cellule vengono fatte crescere "overnight" a 30°C in terreno liquido *ura<sup>-</sup> dex* fino al raggiungimento di un  $OD_{598} = 0.3$ . Successivamente sono state diluite di un fattore 1:10, 1:100 e 1:1000; piccoli volumi (5  $\mu$ l), definiti spot, di ogni singola diluizione vengono depositate su piastre *ura<sup>-</sup> dex* (A), *ura<sup>-</sup> dex* con concentrazioni crescenti di CPT (C, D, E, F e G) e *ura<sup>-</sup> gal* (B).

Nel pannello A si osserva che tutti i ceppi crescono su terreno contenente destrosio, indicando che i ceppi sono vitali e che l'espressione dei plasmide non provoca la morte cellulare. Infatti, nonostante il gene codificante la DNA topoisomerasi IB umana sia sotto il controllo del promotore GAL1, si ha una produzione basale dell'enzima anche in condizioni non induttive, ovvero in presenza di glucosio, in quanto il promotore non è mai totalmente represso. Dal momento che l'espressione avviene da un plasmide a copia multipla, su piastre contenenti glucosio verrà prodotto un quantitativo di enzima sufficiente a verificare se la proteina espressa è sensibile o meno alla camptotecina (Fiorani et al., 1999). In condizioni di induzione, cioè in

presenza di galattosio (come nel pannello B), invece, l'”overespressione” dell'enzima risulta letale per le cellule di questo ceppo. Ciò si può notare per le cellule esprimenti la topoisomerasi I e il doppio mutante.

Dal pannello C al pannello G si osserva che le cellule trasformate con il solo vettore plasmidico e le sue diluizioni continuano a crescere anche in presenza di una concentrazione crescente del farmaco per il motivo spiegato precedentemente. Al contrario le cellule esprimenti sia la topoisomerasi wild-type che quella doppiamente mutata presentano una ridotta vitalità in funzione dell'aumento della concentrazione di CPT. L'espressione del mutante topoisomerasi Asp677Gly-Val703Ile causa una maggiore morte cellulare rispetto a quella dell'enzima selvatico, fino a giungere alla massima concentrazione del farmaco, pari a 0.2  $\mu$ M, dove crescono solamente le cellule wild type non diluite, mentre per il mutante tale concentrazione *in vivo* è letale.

Questo saggio dimostra che il mutante Asp677Gly-Val703Ile è ipersensibile al farmaco antitumorale camptotecina *in vivo* in accordo con i risultati di Scaldaferrò e colleghi (2001) e che l'enzima è sufficientemente attivo cataliticamente, da provocare la morte del ceppo JN2-134 quando viene “overespresso” in presenza di galattosio.

#### ***Ipersensibilità del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile alla CPT in vitro.***

Per studiare l'ipersensibilità del doppio mutante anche mediante saggi *in vitro* è necessaria una sua produzione e purificazione. L'espressione è avvenuta in cellule di lievito del ceppo EKY3 che, a differenza del JN2-134 utilizzato nei saggi *in vivo*, non è deficiente del sistema di riparo del DNA ed è, pertanto, in grado di sostenere una maggiore produzione dell'enzima necessaria alla purificazione. L'enzima è stato purificato, come descritto in materiali e metodi, mediante cromatografia di affinità dato che, nei plasmidi utilizzati per la trasformazione, il gene esprime la proteina presenta all'estremità 5' una sequenza codificante un tag nella regione N-terminale dell'enzima riconosciuto dall'anticorpo coniugato alla resina della colonna cromatografica.

L'attività della topoisomerasi Asp677Gly-Val703Ile, è stata comparata con l'attività mostrata dall'enzima non mutato, mediante una cinetica di rilassamento in presenza di CPT, a concentrazioni pari a 1  $\mu$ M e 2.5  $\mu$ M, ed in funzione del tempo (da 0.5 a 15 min). Il saggio di rilassamento plasmidico permette di seguire la conversione, operata da entrambi gli enzimi, di

molecole superavvolte di DNA in forme con un diverso grado di rilassamento, ovvero che differiscono solamente per il loro linking number. Questo rilassamento è evidenziato in gel d'agarosio 1% dalla comparsa di bande, corrispondenti alle forme rilassate, che migrano più lentamente delle loro corrispondenti superavvolte.

Dalla figura 28 si può seguire come la capacità, sia dell'enzima selvatico che di quello doppiamente mutato, nel rilassare il substrato superavvolto (in questo caso il plasmide pBluescript, mostrato nella corsia C) sia paragonabile in assenza del farmaco, dato che per entrambi si ha la scomparsa della banda corrispondente al plasmide superavvolto. Al contrario, l'attività catalitica del mutante è tanto più rallentata, rispetto alla topoisomerasi selvatica che ne risente solo moderatamente, quanto più viene aumentata la concentrazione dell'inibitore. Tale esperimento conferma, *in vitro*, l'ipersensibilità dell'enzima mutato alla camptotecina, come già osservato *in vivo*.

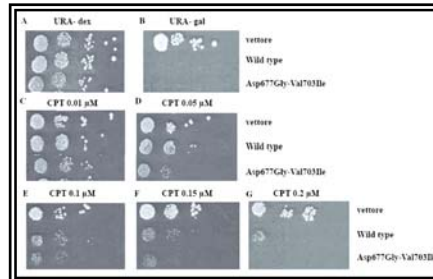
#### ***Attività di rilassamento in funzione della forza ionica.***

Successivamente sono stati analizzati gli effetti della forza ionica sull'efficienza di rilassamento del mutante Asp677Gly-Val703Ile mediante un saggio di rilassamento plasmidico, in cui viene variata la concentrazione salina in un intervallo tra 0 e 300 mM KCl.

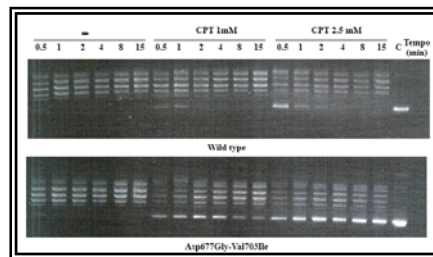
Dai gel d'agarosio mostrati in figura 29 risulta evidente che entrambi gli enzimi mostrano una medesima attività di rilassamento nell'intervallo crescente di concentrazione da 0 a 200 mM KCl; mentre il doppio mutante, a differenza dell'enzima selvatico, continua ad essere in grado di rilassare efficacemente il substrato fino alla massima concentrazione salina (300 mM KCl) utilizzata in questo saggio.

Per indagare ulteriormente il comportamento in funzione della forza ionica sono state effettuate delle cinetiche di rilassamento (da 0 a 15 minuti) a due diverse concentrazioni di sale: 150 mM (corrispondente all'optimum per l'attività del wild-type e del mutante) e 270 mM (in cui si ha una netta differenza di attività tra le due proteine enzimatiche).

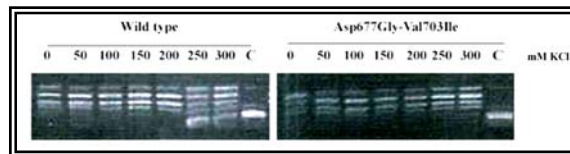
Il saggio, in figura 30, presenta una cinetica paragonabile fra i due enzimi a 150 mM KCl; mentre a 270 mM KCl il mutante è più rapido del selvatico, essendo in grado di rilassare completamente il substrato già a 30 secondi. Tale differente comportamento suggerisce che le due mutazioni portano ad una differente distribuzione del profilo elettrostatico dell'enzima tale da



**Figura 27. Spot test.** Cellule in fase esponenziale di crescita trasformate con YEpGAL1-wild-type, YEpGAL1- Asp677Gly-Val703Ile e YEpGAL1 (vettore), sono state sottoposte a diluizioni seriali (1, 1:10, 1:100, 1:1000) a partire da un  $OD_{598} = 0.3$ . 5 $\mu$ l di ogni diluizione sono stati “spottati” su terreno selettivo in presenza destrosio, di destrosio e concentrazioni crescenti di camptotecina (0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2  $\mu$ M) ed in presenza di galattosio.



**Figura 28. Saggio di rilassamento con camptotecina.** La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con 0.5  $\mu$ g/ml di plasmide superavvolto pBluescript per 0.5, 1, 2, 4, 8 e 15 minuti a 37°C. I prodotti di reazione sono stati separati attraverso elettroforesi su gel d’agarosio e visualizzati usando Bromuro d’etidio come intercalante. La corsia C indica il controllo, reazione in cui non è stato aggiunto l’enzima.



**Figura 29. Saggio di rilassamento a concentrazioni crescenti di sale.** La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con 0.5 $\mu$ g/ml di plasmide superavvolto pBluescript per 1h, in presenza di concentrazioni crescenti di sale (0 – 300 mM KCl) a 37°C. I prodotti di reazione sono stati separati attraverso elettroforesi su gel d’agarosio e visualizzati usando etidio bromuro come intercalante. La corsia C indica il controllo, reazione in cui non è stato aggiunto l’enzima.

permettere un'interazione enzima-DNA anche ad elevati valori di forza ionica.

### ***Equilibrio di taglio/risaldatura.***

Il ciclo catalitico della topoisomerasi I si compone di diversi passaggi, quali l'associazione, il taglio, la rotazione del filamento scisso, la risaldatura e la dissociazione.

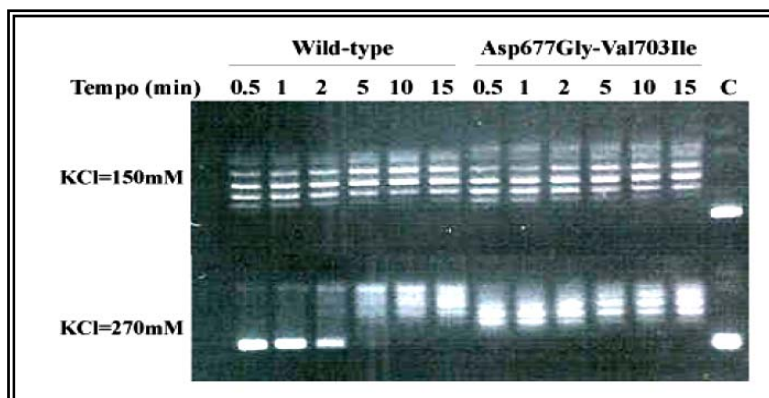
Per comprendere quale sia il livello di ipersensibilità alla camptotecina del mutante Asp677Gly-Val703Ile, si è deciso di analizzare la stabilità del complesso covalente enzima-DNA mediante un esperimento di equilibrio taglio/risaldatura in presenza ed assenza del farmaco. Il substrato utilizzato è un frammento di DNA a doppio filamento ottenuto dall'appaiamento del 25mer CL25 (5'-GAAAAAAGACTTAGAAAAATTTTTA-3'), marcato radioattivamente all'estremità 5' con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, con il filamento complementare CP25 (5'-TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTTC-3'), fosforilato al 5' con ATP non marcato, come riportato nella parte superiore della figura 30 dove la freccia indica il sito di taglio preferenziale della topoisomerasi I. L'equilibrio della reazione è stato raggiunto incubando l'enzima, selvatico e mutato, con il substrato (in difetto rispetto alla proteina) a 37°C per 30 minuti, a 150 mM KCl, in presenza e in assenza di concentrazioni crescenti di CPT (da 0.1 a 100  $\mu\text{M}$ ). La reazione viene bloccata aggiungendo SDS ad una concentrazione finale dell'1%; in seguito a precipitazione con etanolo i campioni vengono digeriti con tripsina ed i prodotti vengono analizzati per mezzo di elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide/urea, come mostrato in basso nella figura 31.

La debole intensità della banda, corrispondente al CL25 tagliato in assenza di CPT, nelle colonne 2 e 3 del wild type e 11 e 12 del mutante D677G-V703I, indica che l'equilibrio è spostato verso la fase di risaldatura. Osservando dalla colonna 4 alla 10 (corrispondente all'enzima selvatico) e dalla colonna 13 alla 19 (corrispondente al doppio mutante) risulta evidente, per entrambi gli enzimi, l'aumentata intensità della banda del filamento tagliato in funzione della crescente concentrazione del farmaco. Infatti, come noto in letteratura, la camptotecina stabilizza il complesso covalente enzima-DNA determinando lo spostamento dell'equilibrio verso il taglio del substrato. Tuttavia, confrontando le colonne 18 e 19 con la 9 e la 10, si nota che l'enzima doppiamente mutato presenta una maggiore intensità della banda del filamento tagliato rispetto a quella dell'enzima. Ciò indica una

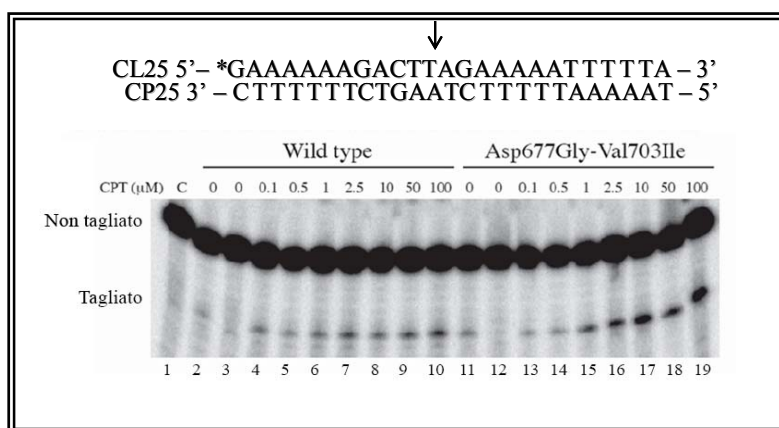
maggior stabilizzazione del complesso covalente confermando l'ipersensibilità di questo mutante all'inibitore e mostrando una diversa costante dell'equilibrio  $K_{eq}$ . Poiché la costante d'equilibrio di questa reazione è data dal rapporto tra la costante di velocità della reazione di taglio ( $k_{cl}$ ) e la costante di velocità della reazione di risaldatura ( $k_r$ ), sono state analizzate le singole velocità del ciclo catalitico per comprendere il diverso comportamento tra la topoisomerasi I selvatica e la topoisomerasi D677G-V703I.

### ***Velocità di taglio.***

Il saggio *in vitro* diretto a valutare la velocità di taglio della topoisomerasi I umana e del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile indipendentemente dalla velocità di risaldatura prevede l'utilizzo di un substrato definito "suicida" (mostrato in alto nella figura 32). Tale substrato è costituito da un oligonucleotide CL14 (5'-GAAAAAAGACTTAG-3'), radiomarcato all'estremità 5', appaiato con il filamento complementare CL25 (5'-TAAAAATTTTTCTAAGTCTTTTTTC-3'), fosforilato al 5' con ATP non marcato, producendo un duplex con un'estensione di 11 paia di basi a singolo filamento. Con questo substrato la risaldatura del filamento è impedita, poiché il dinucleotide (AG-3'), generato durante la reazione di taglio, non può essere rilegato lasciando l'enzima "suicidato", ovvero legato covalentemente, all'estremità 3' (Stewart et al., 1999).



**Figura 30.** Cinetica di rilassamento a diverse concentrazioni di sale. La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con 0.5 µg/ml di plasmide superavvolto pBlueScript per 0.5, 1, 2, 5, 10 e 15 minuti a 37°C, in presenza di 150 e 270 mM KCl. I prodotti di reazione sono stati separati attraverso elettroforesi su gel d'agarosio e visualizzati usando etidio bromuro come intercalante. La corsia C indica il controllo, reazione in cui non è stato aggiunto l'enzima.



**Figura 31.** Equilibrio di taglio/risaldatura del duplex CL25/CP25. La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con il substrato riportato in alto nella figura marcato al 5' del CL25 con [ $\gamma$ - $^{32}$ P], e con concentrazioni crescenti di camptotecina (0 - 100 µM). I prodotti di reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide con urea. La freccia indica il sito preferenziale di taglio dell'enzima.

La proteina selvatica ed il mutante vengono incubati in eccesso con il substrato suicida in condizioni fisiologiche (150 mM KCl) in un esperimento di cinetica. Infatti, a determinati intervalli di tempo (15", 30", 45", 60") sono state prelevate delle aliquote della reazione e bloccate con SDS. Dopo precipitazione con etanolo e digestione con tripsina, i frammenti di DNA tagliati sono stati risolti su un gel di poliacrilammide denaturante con urea (Fig. 32A). Le percentuali dei due prodotti di taglio, normalizzate alla quantità di radioattività totale di ogni corsia, sono state determinate utilizzando il PhosphorImager e il software ImageQuant e riportate in funzione del tempo nel grafico in figura 32B.

I dati mostrano che entrambi gli enzimi tagliano efficientemente il substrato, nonostante presentino una minima differenza nella percentuale di duplex tagliato in queste condizioni sperimentali, raggiungendo il livello di plateau in un tempo comparabile (circa 20 secondi).

#### ***Velocità di risaldatura.***

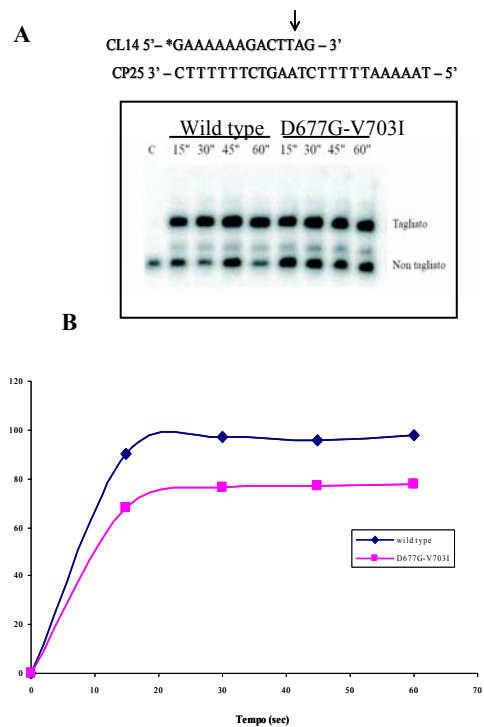
Lo step catalitico della risaldatura del DNA è stato analizzato testando la capacità, sia della proteina nativa che di quella mutata, di riligare l'oligonucleotide R11 (5'-AGAAAATTTT-3') una volta aggiunto al complesso covalente di taglio (Fig. 32). Quindi, il primo passaggio del saggio consiste nell'incubazione di un eccesso di enzima con il substrato CL14/CL25 (lo stesso utilizzato durante la cinetica di taglio), che presenta il sito di taglio preferenziale, per 60 minuti a 25°C, in modo da consentire la formazione del massimo numero di complessi di taglio con l'enzima covalentemente legato all'estremità 3'. Una volta che il taglio è avvenuto, la concentrazione salina viene aumentata a 500 mM KCl, in modo da prevenire l'ulteriore attività di taglio dell'enzima (Yang et al., 2002). Infatti, è noto che la fase di risaldatura non risente dell'alta forza ionica al contrario della fase di taglio. L'aggiunta di sale, perciò, serve ad impedire che il prodotto di risaldatura sia nuovamente tagliato dalla topoisomerasi, comportando un'errata valutazione della cinetica di risaldatura. A questo punto l'oligonucleotide di risaldatura (R11), complementare alla porzione di CP25 a singolo filamento, viene aggiunto alla soluzione di reazione dando, così, luogo al processo di risaldatura (schematizzato in figura 33). Le aliquote prelevate a tempi diversi sono state analizzate in un gel denaturante, come descritto nei materiali e metodi, da cui viene calcolata la percentuale di complessi di taglio rimanenti utilizzando le immagini acquisite dal PhosphorImager mediante il software ImageQuant. La quantificazione della



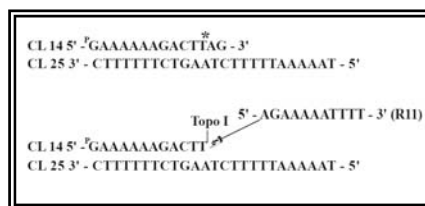
percentuale dei prodotti di taglio viene normalizzata per la radioattività di ogni corsia e riportata in grafico in funzione del tempo.

Dal gel e dal grafico (rispettivamente figura 34A e 34B) risulta evidente che l'enzima doppiamente mutato presenta una velocità di risaldatura inferiore all'enzima nativo, in quanto si può notare come la scomparsa dei prodotti di taglio avvenga molto più lentamente. Al fine di confermare questo risultato, è stato eseguito un esperimento di risaldatura in condizioni fisiologiche, ovvero senza aumentare la concentrazione salina prima dell'aggiunta dell'oligonucleotide R11. Il risultato di questo esperimento, mostrato nel grafico della figura 35, evidenzia ulteriormente la minore velocità di risaldatura del mutante rispetto a quella dell'enzima nativo.

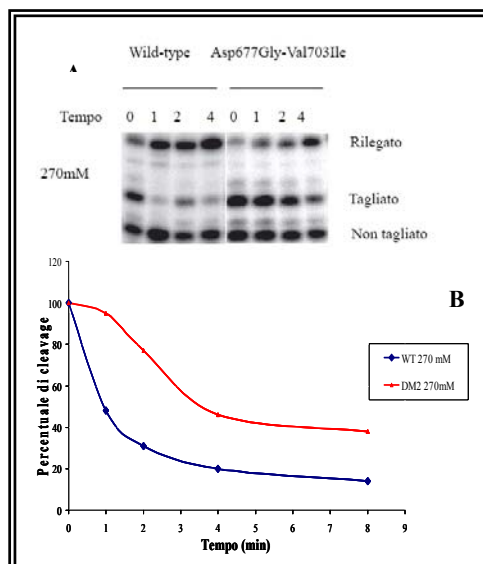
Ciò indica che le mutazioni dei residui 677 e 703 del dominio linker rallentano il processo di risaldatura, determinando una maggiore esposizione, rispetto alla topoisomerasi, del complesso enzima-DNA all'azione stabilizzatrice della camptotecina, causa dell'ipersensibilità del mutante Asp677Gly-Val703Ile al farmaco.



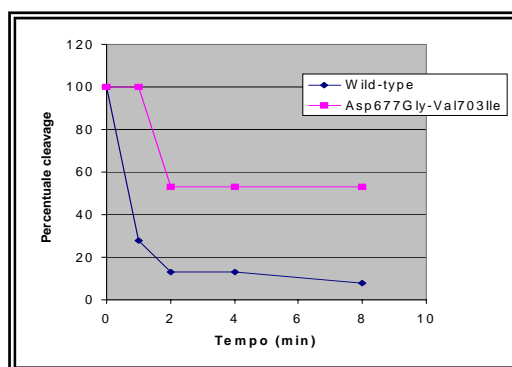
**Figura 32.** Cinetica di taglio del substrato suicida CL14/CP25 a 150 mM KCl. La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con il substrato riportato in alto nella figura marcato al 5' del CL14 con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]. La freccia indica il sito preferenziale di taglio dell'enzima. I prodotti di reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide con urea (**A**) e analizzati con il software ImageQuant che ha permesso di determinare le percentuali dei prodotti di taglio normalizzate sulla quantità totale di radioattività presente in ogni lane (**B**).



**Figura 33.** Rappresentazione schematica della reazione di risaldatura.



**Figura 34.** Cinetica di risalatura del substrato suicida CL14/CP25 a 270mM KCl. La proteina wild type e quella mutata (Asp677Gly-Val703Ile), sono state incubate con il substrato marcato al 5' del CL14 con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]. (A) I prodotti di reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide con urea. In basso (B) grafico delle percentuali dei prodotti di taglio normalizzati per la radioattività di ogni colonna.



**Figura 35.** Grafico delle medie delle percentuali dei complessi covalenti di taglio rimanenti normalizzate per la radioattività totale di ogni corsia.

## ***CAPITOLO 2. L'acido eicosapentaenoico coniugato, un nuovo inibitore della topoisomerasi IB umana con un meccanismo d'azione diverso dalla camptotecina.***

Yonezawa e collaboratori dopo aver selezionato numerosi inibitori per la topoisomerasi IB umana hanno individuato che l'enzima viene efficientemente inibito da acidi grassi dalla catena lineare con 18 o più atomi di carbonio, dall'estremità carbossilica libera e dalla presenza di doppi legami in configurazione cis. Da studi successivi è stato determinato che acidi grassi polinsaturi coniugati presentano una maggiore azione inibitoria rispetto ai medesimi acidi non coniugati (Yonezawa et al., 2005). Tra questi grande attenzione è stata posta sull'acido eicosapentaenoico coniugato in quanto risulta essere particolarmente potente.

### ***Effetto inibitorio dell'attività catalitica della topoisomerasi I da parte dell'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA).***

L'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA), isomero posizionale e geometrico dell'acido non coniugato, è stato ottenuto mediante trattamento alcalino dell'acido eicosapentaenoico. Per accertarsi che la coniugazione sia avvenuta correttamente è stato effettuato un saggio di rilassamento (descritto in materiali e metodi) della topoisomerasi IB umana, mediante il quale è stato possibile indagare l'effetto inibitorio dell'acido grasso polinsaturo coniugato sull'attività catalitica dell'enzima.

Dal gel d'agarosio 1% mostrato in figura 36 si può seguire la conversione di molecole superavvolte di DNA in forme con un diverso grado di rilassamento, ovvero che differiscono solamente per il loro linking number, attraverso la diversa mobilità elettroforetica di quest'ultime. Le corsie 1 e 2 mettono a confronto la capacità della DNA topoisomerasi di rilassare il plasmide pBluescript superavvolto (corsia 3), rispettivamente, in assenza ed in presenza del cEPA con una concentrazione pari a 200  $\mu$ M.

Infatti, nella prima corsia la totale assenza della banda corrispondente al substrato nella conformazione superavvolta e la conseguente formazione di topoisomeri (bande di plasmide rilassato) sono indice di una buona attività enzimatica, mentre nella seconda corsia la presenza del plasmide superavvolto, che presenta una banda di maggiore intensità rispetto a quelle più deboli dei rispettivi topoisomeri, rivela la capacità del cEPA di inibire il rilassamento dell'enzima bloccandone l'attività catalitica.

Questo esperimento conferma l'effetto inibitorio dell'acido eicosapentaenoico coniugato sull'attività di rilassamento della topoisomerasi, ma non permette di capirne il meccanismo di inibizione.

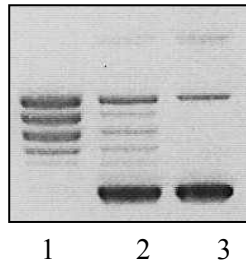
#### ***Effetto del cEPA sulla reazione di taglio della topoisomerasi IB.***

Dato che il meccanismo di azione dell'acido eicosapentaenoico coniugato è ancora sconosciuto si è deciso di esaminare i singoli step del ciclo catalitico enzimatico (quali associazione, taglio, rotazione controllata, risaldatura e dissociazione) che potrebbero essere inibiti dal cEPA.

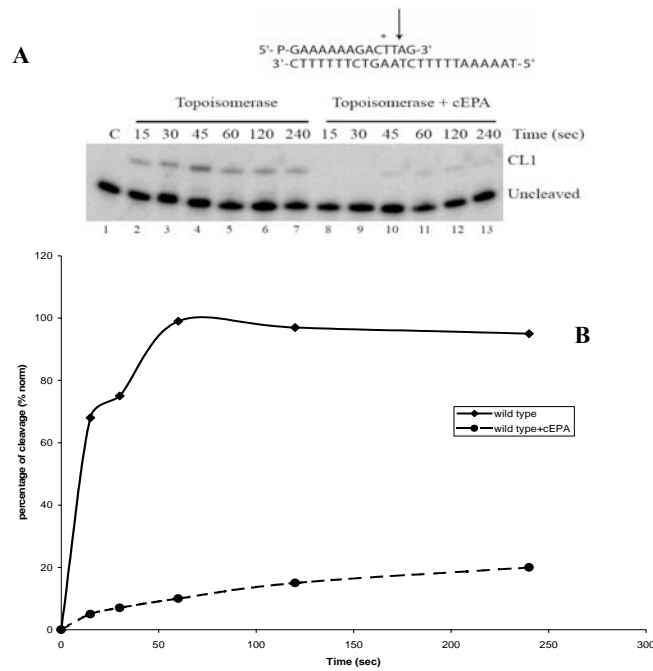
In primo luogo è stata analizzata la reazione di taglio. L'esperimento di cinetica di taglio della topoisomerasi IB e dell'enzima in presenza dell'inibitore è stato eseguito utilizzando un substrato suicida. Il substrato, il medesimo utilizzato nel saggio di taglio del doppio mutante Asp677Gly-Val703Ile, è il doppio filamento CL14(5'-GAAAAAAGACTT\*AG-3')/CP25(5'-TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTC-3') radiomarcato con <sup>32</sup>P all'estremità 5', che presenta un sito di taglio preferenziale indicato dall'asterisco. La reazione di risaldatura è preclusa dall'impossibilità di rilegare il dinucleotide AG-3' che si viene a formare nella reazione precedente. In questo modo l'enzima viene a trovarsi covalentemente legato all'estremità 3' delle dodici basi dell'oligonucleotide (Stewart et al., 1999). Il substrato suicida viene incubato con una quantità in eccesso di enzima in assenza ed in presenza di cEPA alla concentrazione finale di 300 μM. A determinati intervalli di tempo dall'inizio della reazione (15", 30", 45", 1', 2' e 4') sono state prelevate aliquote di 5 μl, bloccate con l'aggiunta di SDS 1% finale e precipitate con etanolo freddo.

La figura 37A mostra i frammenti di DNA, prodotti nella reazione di taglio, risolti in un gel denaturante di poliacrilammide/urea. Dalla colonna 2 alla 7 la topoisomerasi mostra la sua azione di taglio sul sito preferenziale. La banda corrispondente al prodotto di taglio migra più lentamente del frammento integro poiché anche dopo trattamento con la tripsina rimangono legati al filamento tre residui amminocidici che ne rallentano la corsa elettroforetica. La reazione di taglio dell'enzima in assenza di cEPA è molto rapida, infatti, già a 15s si ha la comparsa della banda del substrato scisso pari al 65% del prodotto di taglio (quantificato e normalizzato sulla quantità totale di radioattività in ogni corsia). L'attività della topoisomerasi, nei tempi successivi, tende ad aumentare fino a raggiungere il massimo a 45s, come si può notare dal grafico riportato in figura 37B. Al contrario in presenza del cEPA la reazione di taglio è fortemente inibita. Infatti una debole banda

corrispondente al substrato tagliato si può osservare dopo 45s e solamente dopo 4 minuti si ottiene il 20% circa del prodotto di taglio (linea tratteggiata del grafico in Fig. 37B). Dall'esperimento riportato in figura 37 si può, quindi, concludere che l'acido grasso coniugato inibisce fortemente l'attività catalitica della topoisomerasi IB impedendo la reazione di taglio dell'enzima, ma ciò non permette di sapere se questo è dovuto ad un impedimento del legame del DNA all'enzima oppure ad una inibizione della stessa reazione catalitica.



**Figura 36.** Gel d'agarosio 1%: corsia 1 topoisomerasi IB con il plasmide pBluescript; corsia 2 inibizione dell'attività catalitica della topoisomerasi IB in presenza di cEPA 200  $\mu$ M; corsia 3 substrato pBluescript.



**Figura 37.** Cinetica di taglio con substrato suicida CL14/CP25 della topoisomerasi IB in presenza ed in assenza del cEPA. **(A)** Gel denaturante di poliacrilammide/urea della cinetica di taglio del substrato suicida descritto all'inizio della figura. CL1 identifica il complesso scisso nel sito indicato dalla freccia. Corsia C substrato CL14/CP25 senza enzima. **(B)** Percentuale del prodotto di taglio riportato in grafico in funzione del tempo per la topoisomerasi IB in assenza (linea intera) ed in presenza (linea tratteggiata) del cEPA 300  $\mu$ M, dopo la normalizzazione sulla quantità totale di radioattività presente in ogni colonna.

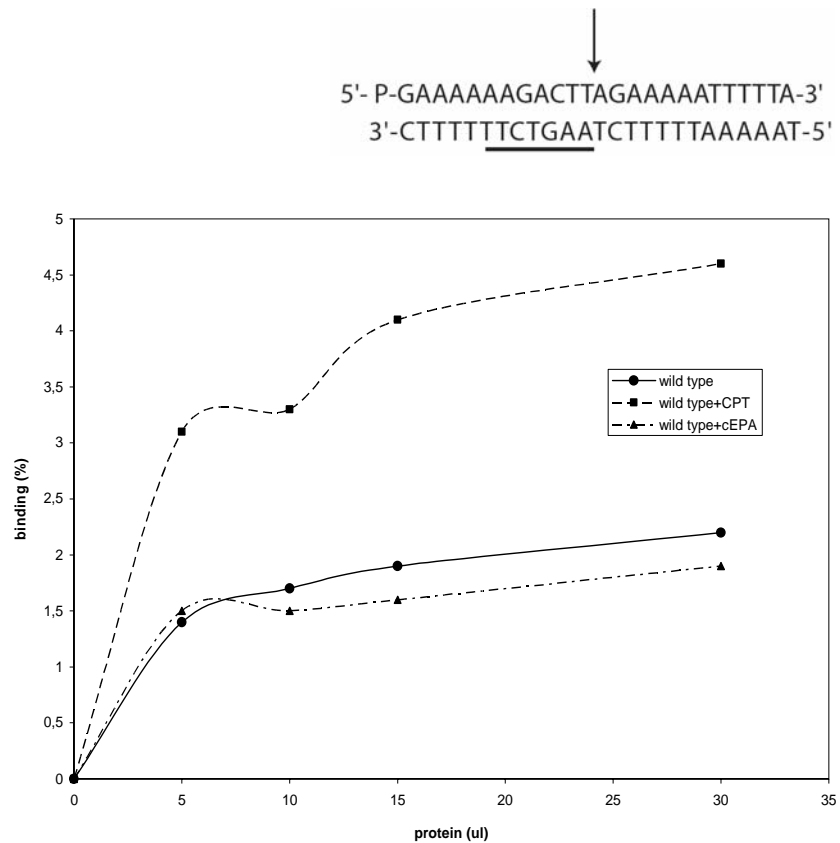
### *Il saggio di filter-binding per la topoisomerasi IB umana.*

Yonezawa e collaboratori hanno precedentemente dimostrato che il cEPA non si lega al DNA a doppio filamento libero, dato che la temperatura di fusione del doppio filamento di DNA non cambia in presenza dell'inibitore (Yonezawa et al., 2005). Quindi è stato svolto il saggio di filter-binding in presenza ed in assenza del cEPA per determinare se la sua inibizione della reazione di taglio è dovuta alla diretta interazione dell'acido con il sito di legame del DNA dell'enzima o ad una inibizione a livello del sito attivo.

In particolare il legame proteina-DNA è stato seguito utilizzando il substrato CL25/CP25, un oligonucleotide 25mer a doppio filamento radiomarcato all'estremità 5', che presenta un sito di legame (TTCTGAA) preferenziale dell'enzima (Anderson et al., 1985). L'oligonucleotide viene incubato con quantità crescenti di enzima in assenza ed in presenza del cEPA (300  $\mu$ M) o CPT (100  $\mu$ M) su un filtro di nitrocellulosa, mantenendo costante la percentuale di glicerolo. La CPT è stata utilizzata come controllo positivo in quanto risulta in grado di bloccare il complesso covalente di taglio e quindi darebbe origine ad un aumento della quantità di complesso enzima-DNA intrappolato (Pommier, 2006). Le soluzioni sono state filtrate attraverso il filtro preequilibrato e processato mediante fotometria a scintillazione liquida.

Il grafico della percentuale di legame riportato in figura 38 mostra che non si ha alcuna differenza di legame tra la topoisomerasi I in presenza ed in assenza del cEPA. Questi dati dimostrano che l'acido eicosapentaenoico coniugato non impedisce il legame enzima-DNA, ma inibisce la formazione del complesso covalente di taglio. L'esperimento in presenza di camptotecina, nota per la sua capacità di stabilizzare fortemente il complesso covalente, evidenzia la formazione di una maggiore percentuale del complesso enzima-DNA confermando che la CPT e il cEPA inibiscono l'enzima con un differente meccanismo. Infatti la CPT stabilizza fortemente il complesso di taglio rallentando il processo di risaldatura, mentre l'acido eicosapentaenoico coniugato interagisce con la DNA topoisomerasi IB umana senza impedire l'interazione enzimatica con il DNA, ma inibendo il taglio del singolo filamento di DNA.





**Figura 38.** Saggio di filter-binding. Percentuale del legame della DNA topoisomerasi IB in funzione della quantità di proteina. Il substrato di DNA CL25/CP25 a doppio filamento radiomarcato all'estremità 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  è mostrato all'inizio del grafico; la freccia indica il sito preferenziale di taglio CL1, mentre i nucleotidi sottolineati sono il sito di legame del DNA. Il saggio è stato effettuato con l'enzima da solo (cerchi), in presenza di CPT 100  $\mu\text{M}$  (quadrati) e di cEPA 300  $\mu\text{M}$  (triangoli).

### ***CAPITOLO 3. Studi strutturali preliminari del dominio N-terminale della DNA topoisomerasi IB umana.***

Una conoscenza sempre più approfondita della struttura della DNA topoisomerasi IB umana ci ha spinti ad eseguire studi dinamici-strutturali in soluzione attraverso tecniche spettroscopiche. Non avendo ancora a disposizione un sistema di espressione e purificazione atto ad ottenere quantità elevate di proteina “full-length”, ovvero l’intero enzima di 91 kDa, si è indirizzato l’analisi verso i singoli domini dell’enzima, essendo riportato in letteratura che questi possono essere prodotti in sistemi batterici (Stewart et al., 1997; Lisby et al., 2001).

In particolare il nostro interesse è stato rivolto al dominio N-terminale, in quanto è l’unica regione della proteina a non esser stata ancora cristallizzata probabilmente a causa della sua flessibilità. Recentemente è stato dimostrato che questo dominio lega il DNA ed alcuni dei suoi residui partecipano alla rotazione controllata del filamento scisso coordinando le altre regioni dell’enzima. Inoltre contiene sequenze di localizzazione nucleare, siti di fosforilazione e siti di legame di numerose proteine nucleari svolgendo un ruolo centrale nella regolazione dell’attività enzimatica. Perciò una conoscenza dell’organizzazione strutturale di questo dominio porterebbe ad ottenere una maggiore comprensione del ruolo cellulare e della regolazione di questo enzima essenziale per la vitalità cellulare.

#### ***Espressione e purificazione del dominio N-terminale.***

Il dominio N-terminale di 218 residui amminoacidici è stato prodotto all’interno del sistema batterico *E. coli* del ceppo BL21.

Le cellule batteriche vengono trasformate con il vettore plasmidico pGEX-2T, mostrato in figura 39A, nel quale è stato inserito il gene esprimente il dominio N-terminale a valle della regione codificante come proteina di fusione l’enzima glutatione-S-transferasi in modo da poter essere purificata mediante cromatografia di affinità. L’overespressione e l’induzione del dominio sono state verificate mediante un gel di poliacrilammide SDS-PAGE (Fig. 39B) degli estratti cellulari. Nella corsia 2 del gel è possibile osservare una banda più intensa delle altre, indicata con la freccia, indice dell’avvenuta espressione della proteina ricombinante GST-N-terminale dopo l’induzione con IPTG 40µg/ml. La parte solubile dell’estratto cellulare (corsia 3 del gel) viene purificata mediante

cromatografia a scambio cationico. Una volta eluita la proteina ricombinante si effettua il taglio della proteina di fusione GST con la trombina umana, che riconosce una specifica sequenza aminoacidica nella regione di legame. La purificazione successiva mediante cromatografia a scambio cationico, al fine di ottenere una soluzione proteica priva della proteina di fusione GST, presenta ancora delle impurezze ad un peso molecolare inferiore (corsia 4 della figura 39B). E' stata, quindi, effettuata una gel filtrazione (cromatografia ad esclusione molecolare) del dominio. La purezza raggiunta dal dominio dopo quest'ultima purificazione, come è possibile vedere nel gel SDS-PAGE in figura 39C, ci permette di eseguire un'analisi strutturale preliminare mediante tecniche spettroscopiche in soluzione di fluorescenza, dicroismo circolare e NMR monodimensionale.

#### *Analisi di spettrofluorimetria del dominio N-terminale.*

Data l'impossibilità di formare dei cristalli al fine di studiare la struttura di questo dominio mediante diffrazione di raggi X si è deciso di eseguire delle prime analisi strutturali attraverso la spettroscopia di fluorescenza.

Si è potuta utilizzare questa tecnica spettroscopica grazie alla presenza di sonde fluorescenti intrinseche alla proteina, quali le catene laterali aromatiche di alcuni amminoacidi (ad esempio la tirosina, il triptofano e la fenilalanina). La fluorescenza intrinseca è in genere dominata dall'emissione del gruppo indolo dei triptofani poiché presentano un maggiore assorbimento rispetto alla tirosina e, soprattutto, possono essere eccitati selettivamente ad una lunghezza d'onda pari a 295nm.

Lo spettro di emissione, riportato in figura 40, è stato ottenuto monitorando in un intervallo di 300-500 nm la variazione dell'intensità di fluorescenza del dominio N-terminale dopo averlo eccitato a 295 nm. Il picco esibisce un massimo centrato a 355 nm. Ciò indica che i triptofani presenti nella sequenza amminoacidica del dominio (in tutto sono quattro) sono completamente esposti al solvente, infatti se questi fossero stati protetti da una struttura globulare della proteina il loro massimo di emissione sarebbe spostato verso lunghezze d'onda minori. Il risultato ottenuto è stato confermato da un secondo esperimento in cui il dominio è stato eccitato a 280 nm, lunghezza d'onda in cui assorbono anche le tirosine, dimostrando che non si ha alcun trasferimento di energia tra i triptofani e le tirosine presenti nella sequenza amminoacidica.

Per conoscere la struttura secondaria del dominio si è deciso di eseguire degli spettri di dicroismo circolare.

### *Analisi di dicroismo circolare del dominio N-terminale.*

La principale applicazione della spettrometria di dicroismo circolare è lo studio della conformazione di macromolecole biologiche, da cui si possono ottenere informazioni sulla proporzione relativa delle strutture secondarie ( $\alpha$  eliche, foglietti  $\beta$  e random coil) presenti in una proteina in soluzione.

La figura 41 mostra il primo studio strutturale del dominio N-terminale della DNA topoisomerasi IB umana ottenuto mediante la tecnica spettroscopica del dicroismo circolare (CD). Lo spettro dicroico, misurato nell'intervallo della lunghezza d'onda della far-UV (200-250 nm), mostra due picchi negativi a 206 nm e 223 nm, dove il primo picco ha una maggiore intensità rispetto al secondo. In proteine, la cui struttura secondaria è in conformazione  $\alpha$  elica, l'intensità dei due picchi è approssimativamente la medesima. Lo spettro indica, quindi, che il dominio, oltre ad una struttura secondaria ad  $\alpha$  elica, presenta numerose regioni non strutturate o strutturate in maniera irregolare. Inoltre la prominente del picco a 206 nm può essere indice di una struttura ad elica 3-10.

Si sono anche eseguite misure di dicroismo circolare con concentrazioni decrescenti di proteina, ovvero da 20  $\mu$ M a 5  $\mu$ M (mostrate in figura 41). Gli spettri relativi alle diverse concentrazioni sono stati normalizzati per la propria concentrazione in modo da poter ottenere un valore assoluto del rapporto tra i picchi. Il rapporto (pari a circa 1,68) è pressoché identico, quindi, nella diluizione da 20 a 5  $\mu$ M non si ha alcun cambiamento di struttura dipendente dalla concentrazione.

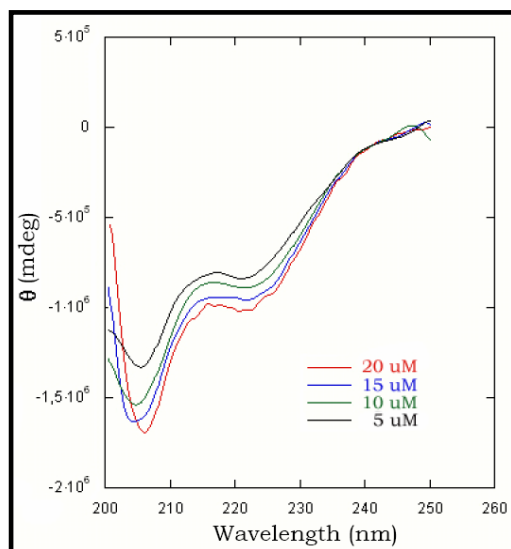


### *Analisi NMR monodimensionale del dominio N-terminale.*

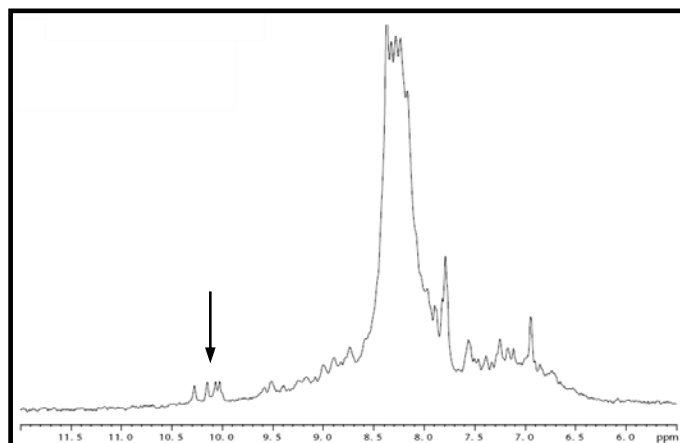
Lo studio della struttura molecolare e dei cambiamenti conformazionali sono le principali applicazioni in campo biologico della tecnica NMR.

Dallo spettro NMR monodimensionale del dominio N-terminale, riportato in figura 42 ed eseguito a 25°C ad una frequenza pari a 700,13 MHz per l'atomo di idrogeno, si può notare come la regione del segnale degli idrogeni ammidici compresa tra 8 e 8,5 ppm presenti dei picchi poco dispersi. Ciò indica la presenza di regioni non strutturate all'interno del dominio preso in considerazione. Tuttavia ad entrambi i lati di questo picco ci sono dei segnali provenienti da idrogeni del carbonio  $\alpha$  degli amminoacidi che possono essere attribuiti a regioni strutturate. Nella regione da 6,5 ppm a 8 ppm i gruppi amminici e le catene laterali aromatiche dei residui contribuiscono al segnale anche se non sono in regioni strutturate (infatti i picchi non sono ben definiti). La continuità del segnale indica che alcuni di questi picchi sono prodotti da gruppi ammidici che si trovano in regioni strutturate. Inoltre solo gruppi ammidici che si trovano in una regione strutturata della proteina possono contribuire alla regione, indicata dalla freccia, tra 9 e 10,5 ppm (tipica dei triptofani).

Questo spettro conferma la presenza di regioni strutturate e disordinate all'interno del dominio N-terminale, ma per ricavare ulteriori informazioni strutturali è necessario eseguire spettri NMR bidimensionale producendo il dominio marcato con gli isotopi  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ .



**Figura 41.** Spettro CD nella far-UV del dominio N-terminale 20  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , in tampone fosfato 20 Mm, NaCl 150 mM a pH = 7.1.



**Figura 42.** Spettro NMR 1D del dominio N-terminale 60  $\mu\text{M}$  in tampone fosfato 20mM, NaCl 150 mM a pH = 7.1; la freccia indica i picchi dei triptofani.

## **CONCLUSIONI**

Come già esposto nella parte introduttiva della tesi la DNA topoisomerasi IB umana, enzima coinvolto nella rimozione dello stress torsionale del DNA, ricopre un ruolo estremamente importante da un punto di vista clinico, rappresentando l'unico bersaglio cellulare da alcuni tipi di farmaci antitumorali, quali la camptotecina ed i suoi derivati, efficaci in un ampio spettro di tumori umani.

Il lavoro descritto nel primo capitolo è stato rivolto alla caratterizzazione biochimica del doppio mutante dell'enzima Asp677Gly-Val703Ile. Gli studi sperimentali *in vivo* ed *in vitro* hanno confermato l'ipersensibilità del mutante, già riportata in letteratura (Scaldaferro et al., 2001), al farmaco camptotecina, mentre saggi di rilassamento condotti in condizioni di diversa forza ionica hanno sottolineato una diversa attività delle due proteine, dovuta probabilmente al differente profilo elettrostatico nell'interazione con il DNA. Successivamente l'analisi della reazione di taglio e di risaldataura del ciclo catalitico dimostra che l'aumento della sensibilità nei confronti della CPT è accompagnata da una riduzione della velocità di risaldataura del mutante, permettendo una maggiore stabilizzazione del complesso covalente da parte del farmaco. Inoltre studi di simulazione di dinamica molecolare, condotti nel nostro laboratorio, hanno evidenziato come le due mutazioni conferiscano sia una minore flessibilità del dominio linker e delle eliche "nose cone" rispetto alla proteina nativa sia un riarrangiamento del sito attivo. In particolare si assiste ad un riarrangiamento della Lys 532 che, causando la destrutturazione del sito attivo, in parte stabilizza il complesso covalente enzima-DNA ed in parte rallenta la velocità di risaldataura. Studi precedentemente condotti sul mutante Ala653Pro, che presenta resistenza alla camptotecina ed una maggiore flessibilità del linker rispetto all'enzima nativo, hanno dimostrato l'importanza del ruolo del dominio linker nel modulare la velocità di rotazione del filamento tagliato (Fiorani et al., 2003). Infatti, la diversa flessibilità del linker sembra essere correlata con la sensibilità dell'enzima alla CPT, ovvero, una minore flessibilità sembra conferire ipersensibilità, mentre una maggiore comporta resistenza. L'insieme di questi risultati sperimentali, quindi, permette di comprendere maggiormente l'importanza del dominio linker nel modulare le proprietà funzionali della topoisomerasi I, dimostrando che mutazioni su questo dominio, che si trovano lontane dal sito attivo, sono in grado di modificare



l'efficienza catalitica dell'enzima riducendo la sua velocità di risaldatura. Caratterizzazioni di questo tipo permettono di comprendere maggiormente l'organizzazione strutturale dell'enzima e la sua interazione con la droga per la realizzazione di farmaci sempre più efficienti.

Nel secondo capitolo è stato condotto lo studio del meccanismo di inibizione dell'acido eicosapentaenoico coniugato, analizzando le singole fasi del ciclo catalitico, in particolare la reazione di taglio e la formazione del complesso non covalente enzima-DNA, in quanto analisi precedenti hanno dimostrato che il cEPA non si lega al doppio filamento del DNA, ma interagisce direttamente con l'enzima (Yonezawa et al., 2005). Dai dati ottenuti si può, quindi, dedurre che l'inibitore non ostacola il legame del DNA all'enzima, ma può influenzare la reazione di taglio stessa, probabilmente, modificando la struttura della DNA topoisomerasi IB umana una volta legata al DNA.

Il terzo ed ultimo capitolo della tesi è stato rivolto alla caratterizzazione strutturale del dominio N-terminale della topoisomerasi IB, in quanto è l'unica regione dell'enzima non ancora cristallizzata ed inoltre le sue funzioni non sono del tutto chiare. Si è, così, deciso di eseguire studi preliminari di struttura mediante tecniche spettroscopiche in soluzioni, quali fluorescenza, dicroismo circolare e NMR monodimensionale. Gli spettri ottenuti di dicroismo circolare e NMR confermano la presenza di regioni strutturate e disordinate, anche se non è possibile discriminare tra la coesistenza di due regioni differentemente strutturate nello stesso dominio e la presenza di due popolazioni in conformazione strutturata e non strutturata. Per decidere quali delle due ipotesi sia corretta si dovranno eseguire spettri NMR bidimensionali più dettagliati producendo il dominio N-terminale marcato con gli isotopi  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$ .

## ***MATERIALI E METODI***

### ***MATERIALI PER IL SISTEMA LIEVITO Saccharomyces cerevisiae:***

#### ***Cepi di lievito.***

**EKY3:** MAT $\alpha$ , ura3–52, his3200, leu2 $\Delta$ 1, trp1 $\Delta$ 63, top1::TRP1.

**JN2-134:** MAT $\alpha$ , rad52: LEU2, trp1, ade2-1, his7, ura3-52, ise1, top1-1, leu2.

#### ***Plasmidi.***

**YE<sub>p</sub>GAL1-hTOPI** (12400 bp): vettore episomiale di 2  $\mu$ m, contiene il cDNA della hTopoI sotto il controllo del promotore inducibile dal galattosio GAL1; ha URA3 come marker per la selezione.

#### ***Terreni liquidi di crescita.***

**YPD (1 l):** 10 g Estratto di Lievito, 20 g Bacto – peptone, 900 ml ddH<sub>2</sub>O. Autoclavare a 120°C per 20'. Aggiungere 100 ml di destrosio 20% (w/v) filtrato – sterilizzato (F.S.).

**ura<sup>-</sup> dex (1 l):** 1.70 g Yeast Nitrogen Base (w/o AminoAcids and Ammonium Sulfate), 5 g Solfato d'Ammonio, 0.72 g Drop-out<sup>1</sup> ura<sup>-</sup>, 2 ml NaOH 1N, 900 ml ddH<sub>2</sub>O. Autoclavare a 120°C per 20'. Aggiungere 100 ml di destrosio 20% (w/v) F.S.

**ura<sup>-</sup> raff 2% (1 l):** 1.70 g Yeast Nitrogen Base (w/o AminoAcids and Ammonium Sulfate), 5 g Solfato d'Ammonio, 0.72 g Drop-out ura<sup>-</sup>, 2 ml NaOH 1N, 900 ml ddH<sub>2</sub>O. Autoclavare a 120°C per 20'. Aggiungere 100 ml di raffinosisio 20% (w/v) F.S.

**ura<sup>-</sup> gal 2% (1 l):** 1.70 g Yeast Nitrogen Base (w/o AminoAcids and Ammonium Sulfate), 5 g Solfato d'Ammonio, 0.72 g Drop-out ura<sup>-</sup>, 2 ml NaOH 1N, 900 ml ddH<sub>2</sub>O. Autoclavare a 120°C per 20'. Aggiungere 100 ml di galattosio 20% (w/v) F.S.

**ura<sup>-</sup> dex HEPES (1 l):** 1.70 g Yeast Nitrogen Base (w/o AminoAcids and Ammonium Sulfate), 5 g Solfato d'Ammonio, 0.72 g Drop-out ura<sup>-</sup>, 25

ml HEPES 1 M pH 7.2, 900 ml ddH<sub>2</sub>O. Autoclavare a 120°C per 20'. Aggiungere 100 ml di destrosio 20% (w/v) filtrato sterilmente (F.S).

**ura<sup>-</sup> dex HEPES-camptotecina:** aggiungere al terreno ura<sup>-</sup> dex HEPES e camptotecina (11.8 mM) fino alla concentrazione finale desiderata di CPT.

**ura<sup>-</sup> dex HEPES-DMSO:** aggiungere al terreno ura<sup>-</sup> dex HEPES una quantità di dimetilsolfossido (DMSO) pari a quella di CPT, utilizzata nel terreno ura<sup>-</sup> HEPES con la massima concentrazione di camptotecina (DMSO è il solvente in cui si diluisce la CPT).

#### *Terreni solidi di crescita.*

Aggiungere 20 g di agar ad 1l di terreno liquido e poi autoclavare a 120°C 20'.

#### *Soluzioni utilizzate.*

**TE-LiOAc 10X:** 100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 1 M LiOAc. Autoclavare a 120°C 20'.

**TE-LiOAc-PEG40% 1X:** 10% di TE-LiOAc 10X, 80% di PEG 3350 al 50% (F.S.), 10% di H<sub>2</sub>O sterile.

**TEE 10X:** 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA. Autoclavare a 120°C 20'.

**TEE1X-10% Glicerolo + inibitori delle proteasi 1X:** 10% di TEE10X, 10% glicerolo al 100% (sterile), 4% del cocktail completo di inibitori di proteasi 25X (Roche 1836153), 76% H<sub>2</sub>O sterile.

**TBS 10X:** 500mM Tris-HCl pH 7.4, 1.5M NaCl.

**TBS 1X-Inibitori delle proteasi 1X:** aggiungere a TBS 1X un volume del cocktail completo degli inibitori di proteasi 25X (Roche), di sodio bisulfite 100X (10 mg/ml) e di sodio fluoride 50X (40 mg/ml) per averli 1X nella soluzione finale.

**Glicina HCl 1X:** 0.1 M glicina HCl pH 3.5. Autoclavata.

**Tampone di eluizione della colonna di affinità:** 4% del cocktail completo di inibitori di proteasi 25X (Roche 1836153), 0.1% stock FLAGpeptide 1000X (0.1 mg/ml), 10% di TBS 10X, 86% H<sub>2</sub>O.

**Tampone per la conservazione della colonna:** aggiungere a 50% glicerolo, 0.02% sodio azide.

**Mix TOPI 10X:** 200mM TRIS-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 50µg/ml BSA acetilata.

**TBE 10X:** 0.5M tris, 0.45M Acido Borico, 1mM EDTA.

**Gel di agarosio all'1%:** 1 g di agarosio in 100 ml di TBE 1X.

**Camptotecina:** solubilizzata in DMSO ad una concentrazione di 4 mg/ml (11.8 mM) e conservare a -20°C al buio.

**Sample buffer di corsa per gel d'agarosio: stop dye con SDS 4X:** 2.5% SDS; 25% Ficoll 400; 0.03% Blu di Bromofenolo; 0.03% Xilene Cianolo; 25 mM EDTA.

**Soluzione per gel di poliacrilammide/urea al 20%:** 20% di poliacrilammide 40%, TBE 1X, urea 7 M. Aggiungere 0.1% di APS 10% (w/v), 0.047% TEMED.

**Soluzione per gel di poliacrilammide/urea al 16%:** 16% di poliacrilammide 40%, TBE 1X, urea 7 M. Aggiungere 0.1% di APS 10% (w/v), 0.047% TEMED.

**Sample buffer di corsa per gel di poliacrilammide/urea (Sample dye 0.86X):** 96% Formammide, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.03% Blu di Bromofenolo, 0.03% Xilene Cianolo.

## ***METODI PER IL SISTEMA LIEVITO *Saccharomyces cerevisiae*.***

### ***Trasformazione di lievito (*S. cerevisiae*).***

La topoisomerasi I selvatica o mutante è stata espressa in ceppi di lievito, precedentemente elencati, Top1 $\Delta$ , trasformati con il plasmide YEpGAL1-hTopI o YEpGAL1-hTopIAsp677Gly-Val703Ile.

2–3 colonie del ceppo sono prelevate da piastre YPD, inoculate in 10 ml di YPD liquido ed incubate per una notte a 30°C 120 rpm. Quando la densità ottica a 600 nm è circa pari 1 le cellule sono raccolte, mediante centrifugazione (1500 g, 20 °C per 10 minuti), lavate in un volume di TE–LiOAc 1X pari ad 1/4 del volume iniziale e risospese nella medesima soluzione ad una densità finale di 2×10<sup>9</sup> cellule/ml. Le soluzioni cellulari sono, prima, suddivise in aliquote di 30  $\mu$ l, ad ognuna delle quali sono aggiunti 200–300 ng di DNA plasmidico, 2mg/ml di DNA di sperma di salmone e 140  $\mu$ l di Te–LiOAc–PEG 40% 1X e successivamente incubate per 60 minuti a 30 °C in agitazione. Le cellule sono, quindi, sottoposte a shock termico per 15 minuti a 42 °C ed infine, piastrate su terreno solido ura<sup>-</sup>dex a 30 °C per 2–3 giorni.

### ***Spot test.***

Si tratta di un saggio che permette di analizzare l'eventuale vitalità cellulare attraverso la formazione di colonie in presenza di camptotecina e quindi di stimare la sensibilità alla droga. Per saggiare la sensibilità del mutante Asp677Gly-Val703Ile il ceppo JN2-134 (rad52Δ) è stato trasformato con i plasmidi YEpGAL1-hTopI, YEpGAL1-hTopIAsp677Gly-Val703Ile e con il solo vettore YEpGAL1.

Per ognuno di questi si prelevano 2-3 colonie di trasformanti, s'inoculano in 5 ml di terreno liquido ura<sup>-</sup> dex e si lasciano crescere tutta la notte a 30°C in agitazione. Si leggono allo spettrofotometro a OD<sub>595</sub> e si diluisce in H<sub>2</sub>O bidistillata sterile in modo da ottenere un OD<sub>595</sub> = 0.3 in un volume finale di 200 µl, che viene diluito serialmente 1:10, 1:100, 1:1000.

5 µl di ogni diluizione (spot) vengono depositi su terreni solidi ura<sup>-</sup> dex, ura<sup>-</sup> gal, URA<sup>-</sup> HEPES-CPT alla concentrazione di 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 µg/ml. Le piastre sono incubate a 30°C per 3 giorni.

### ***Espressione della topoisomerasi I umana.***

È stata purificata la proteina nativa (hTopoI) e la proteina mutante (hTopoI Asp677Gly-Val703Ile), a partire da cellule di lievito del ceppo EKY3 trasformate con i plasmidi YEpGAL1-hTopoI e YEpGAL1-hTopoI Asp677Gly-Val703Ile, contenenti al 5' del gene per l'enzima umano, una sequenza codificante per un tag, detto FLAG. La sequenza FLAG (DYKDDDDY) situata nella regione N-terminale della proteina è riconosciuta dall'anticorpo monoclonale M2.

2-3 colonie di trasformanti vengono inoculate in 10 ml di terreno liquido ura<sup>-</sup> dex ed incubate a 30°C per una notte in agitazione. La coltura satura è trasferita in una beuta contenente 1 litro di ura<sup>-</sup> raff 2%, al fine di esaurire il glucosio presente in soluzione ed incubata in movimento a 30°C nella notte. Quando la densità ottica a 595 nm è circa 1, ad ogni beuta sono aggiunti 100 ml di galattosio 20%, per indurre la sintesi della proteina. Le colture cellulari sono, quindi, lasciate crescere per circa sei ore a 30°C 120 rpm.

### ***Estrazione della proteina.***

Le cellule sono recuperate mediante centrifugazione (1500g per 10 minuti a 4°C) e risospese in 2 ml di TEE-10% Glicerolo + inibitori delle proteasi 1X per g di cellule. All'estratto crudo è aggiunto metà volume di glass

beads, con un diametro compreso tra 450 e 600  $\mu\text{m}$ , utilizzate per rompere meccanicamente le cellule “vortexando” 20 volte per 30 secondi e alternando ogni “vortexata” con 30 secondi in ghiaccio, al fine di non consentire il riscaldamento della soluzione. La sospensione è centrifugata per 30 minuti a 12000 rpm e 4°C, nel supernatante sono presenti le proteine cellulari totali.

#### ***Purificazione della proteina.***

Per la purificazione è stata utilizzata la resina d'affinità ANTI-FLAG M2 che ha legato covalentemente l'anticorpo monoclonale murino IgG<sub>1</sub>, in grado di legare specificatamente la sequenza FLAG delle proteine che devono essere purificate. 2 ml di resina sono stati equilibrati con cinque volumi di TBS 1X dopo averla attivata con tre volumi sequenziali di glicina-HCl 0.1M, come descritto nel bollettino tecnico (Sigma).

L'estratto cellulare è stato caricato in colonna e flussato per gravità, al fine di ottimizzare l'efficienza di legame. Le proteine legate in maniera aspecifica sono state rimosse lavando la colonna con 20 volumi di TBS, mentre l'eluizione della proteina è stata eseguita per competizione, utilizzando cinque volumi di una soluzione di TBS contenete 100  $\mu\text{g/ml}$  di peptide FLAG. Le frazioni raccolte, ognuna di 500  $\mu\text{l}$ , sono state addizionate di un ugual volume di glicerolo all'80% e quindi conservate a -20°C.

La colonna può essere conservata e riutilizzata. Per fare ciò subito dopo l'uso deve essere rigenerata attraverso il lavaggio con tre volumi di glicina-HCl 0.1 M, riequilibrata con il TBS finché il pH non torni neutro, lavata con dieci volumi di tampone per la conservazione (contenente sodio-azide 0.02%) ed infine conservata a 4°C nel tampone stesso.

#### ***Saggio di rilassamento del DNA plasmidico.***

Per constatare l'attività delle varie frazioni della proteina purificata si esegue un saggio di rilassamento di DNA plasmidico superavvolto negativamente pBlueScript.

Di ogni frazione si saggia 1  $\mu\text{l}$ , aggiungendo alla reazione 0.5  $\mu\text{g}$  di DNA pBlueScript, mix TOPI 1X, KCl 150 mM e H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume di 30  $\mu\text{l}$ . Ogni reazione viene incubata a 37°C per 1 ora. La reazione viene bloccata con SDS stop dye 1% e i prodotti analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio all'1%, colorato successivamente con bromuro d'etidio 10 mg/ml per rendere visibili, ai raggi UV, le molecole di

DNA che si separano sul gel in funzione del linking number. In questo modo si possono individuare le frazioni in cui la proteina risulta essere più attiva e di queste si può in seguito testare la quantità di proteina attraverso SDS-PAGE e western blotting.

Si usa lo stesso tipo di saggio per osservare il comportamento del mutante rispetto al wild type a diverse concentrazioni di sale, in presenza di diverse concentrazioni CPT per verificare la sensibilità al farmaco.

#### ***Saggio di taglio/risaldatura all'equilibrio.***

10 pmol dell'oligonucleotide CL25 (5'-GAAAAAGACTTAGAGAAAAATTTT-3'), marcato con  $\gamma^{32}\text{ATP}$  all'estremità 5', sono state fatte reagire con 20 pmol del filamento complementare CP25 (5'-TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTTC-3'), al fine di generare un substrato completamente duplex CL25/CP25.

La reazione avviene a 25°C, incubando 20 nM del substrato con una quantità in eccesso della proteina wild-type o mutata (metà del volume finale della reazione) in una soluzione di mix TOPI 1X, 150 mM KCl, CPT (o DMSO) e H<sub>2</sub>O, per 30 minuti. La reazione viene bloccata aggiungendo SDS 0.5%. I prodotti della reazione vengono precipitati con etanolo freddo e risospesi in 5 µl di tripsina (1mg/ml) a 37°C per un'ora, affinché la proteina legata covalentemente all'estremità 3' del substrato sia digerita. La reazione viene bloccata aggiungendo 7 µl di Sample dye. Da ogni campione è prelevata un'aliquota di 2 µl, utilizzata per leggere le conte allo scintillatore, in modo da caricare sul gel di poliacrilammide lo stesso numero di conte. I prodotti della reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide/urea al 16% e sono state determinate le percentuali dei complessi di taglio (%CL) attraverso PhosphorImager ed il software ImageQuant.

#### ***Cinetica di taglio utilizzando un substrato oligonucleotidico.***

10 pmol dell'oligonucleotide CL14 (5'-GAAAAAAGACTTAG-3'), marcato con  $\gamma^{32}\text{ATP}$  all'estremità 5' sono state fatte reagire con 20 pmol del filamento complementare CP25 (5'-TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTTC-3'), generando in questo modo il substrato suicida, costituito da un oligonucleotide duplex con un'estensione di 11bp a singolo filamento.

La reazione di taglio è stata condotta incubando una concentrazione 20nM di substrato suicida con un eccesso di enzima nativo o mutato (pari a metà del volume finale della reazione), in una soluzione di mix TOP1 1X contenente 150 mM KCl e H<sub>2</sub>O, a 25°C. Aliquote della soluzione sono state prelevate a tempi diversi e in ognuna la reazione è stata fermata mediante l'aggiunta di SDS allo 0.5%. I campioni sono stati precipitati e digeriti con tripsina. I prodotti di reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide al 20%, la cui immagine, importata attraverso PhosphorImager e analizzata con il software ImageQuant ha permesso di determinare le percentuali dei prodotti di taglio normalizzate sulla quantità totale di radioattività presente in ogni corsia.

#### ***Cinetica di risaldatura utilizzando un substrato oligonucleotidico.***

Nella cinetica di risaldatura viene utilizzato un substrato duplex suicida CL14/CP25 ed in seguito viene aggiunto un substrato R11.

La reazione di taglio avviene a 23°C, incubando 20 nM del substrato suicida con una quantità in eccesso della proteina wild-type o mutata (metà del volume finale della reazione) in una soluzione di mix TOPI 1X, 150 mM KCl e H<sub>2</sub>O, per un'ora e successivamente per 30 minuti a 37°C.

Prima di aggiungere l'oligonucleotide di risaldatura la miscela di reazione è stata suddivisa in due parti, dove in una vengono aggiunte diverse concentrazioni di camptotecina, nell'altra pari quantità di DMSO; inoltre viene prelevata un'aliquota di 5 µl utilizzata come tempo zero. La reazione di risaldatura è stata iniziata aggiungendo l'oligonucleotide R11 (5'-AGAAAAATTTT-3'), in una concentrazione molare 200 volte in eccesso rispetto la concentrazione del duplex suicida. Aliquote di 5µl, prelevate a tempi diversi, sono state addizionate di SDS 0.5%, precipitate in etanolo e digerite tripsina (1mg/ml). I prodotti di reazione sono analizzati attraverso elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide/urea al 20%; attraverso PhosphorImager e il software ImageQuant sono state determinate le percentuali dei rimanenti complessi covalenti di taglio e normalizzate per la radioattività totale di ogni corsia.



## ***METODI DI ANALISI DELL'ACIDO EICOSAPENTAENOICO CONIUGATO.***

### ***Coniugazione dell'acido eicosapentaenoico.***

L'acido eicosapentaenoico coniugato (cEPA) è stato preparato mediante trattamento alcalino dell'acido eicosapentaenoico secondo il metodo AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) con lievi modifiche.

10 mg dell'acido eicosapentaenoico sono stati aggiunti ad 1 ml della soluzione di KOH 6% (w/w) in glicoletilene, in cui è stato fatto precedentemente gorgogliare azoto per 5 minuti. Questa miscela, in cui si continua a gorgogliare azoto, è stata portata a 180°C per 10 minuti. Dopo aver lasciato raffreddare la soluzione di reazione è stato aggiunto 1 ml di metanolo, è stata acidificata con 2 ml di HCl 6N fino a pH = 2 e successivamente diluita con 2 ml di H<sub>2</sub>O distillata. L'acido grasso coniugato viene estratto con 5 ml di esano. Quest'ultimo viene lavato con 3 ml di CH<sub>3</sub>OH 30% e con un pari volume di H<sub>2</sub>O distillata prima di far evaporare il solvente sotto flusso di azoto. L'acido grasso coniugato viene conservato a -20°C.

L'acido eicosapentaenoico coniugato è stato solubilizzato in DMSO ad una concentrazione finale pari a 6,6 mM.

### ***Saggio di rilassamento del DNA plasmidico con cEPA.***

Per constatare l'effetto inibitorio del cEPA si svolge un saggio di rilassamento del DNA plasmidico negativamente superavvolto pBlueScript.

La soluzione di reazione, contenente 1 µl di topoisomerasi IB umana, 0.5 µg di DNA pBlueScript, cEPA 200 mM, mix TOPI 1X, KCl 150 mM e H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume finale di 30 µl, è stata incubata a 37°C per 30 minuti. La reazione è stata bloccata aggiungendo SDS 1% finale e digerita con proteinasi K 1 mg/ml per 30 minuti a 37°C. Quest'ultima reazione è stata bloccata con SDS stop dye 1%. I prodotti vengono analizzati su gel d'agarosio 1%, come nel saggio di rilassamento plasmidico descritto nei "metodi per il sistema di lievito".

### ***Cinetica di taglio in presenza di cEPA.***

Il substrato suicida utilizzato e lo svolgimento della reazione è stato già descritto in “metodi per il sistema di lievito *Saccharomyces cerevisiae*”. La reazione di taglio è stata condotta in una soluzione di mix TOP1 1X contenente cEPA 300 mM, 150 mM KCl e H<sub>2</sub>O, a 25°C. I prodotti di taglio sono stati analizzati mediante un gel di poliacrilammide/urea 20% e attraverso PhosphorImager e il software ImageQuant sono state determinate le percentuali dei prodotti di taglio normalizzate sulla quantità totale di radioattività presente in ogni corsia.

### ***Saggio di fliter-binding in presenza di cEPA.***

Per questo saggio è stato utilizzato il substrato duplex CL25/CP25, lo stesso dell'equilibrio taglio/risaldatura precedentemente descritto.

Sono state preparate una serie di soluzioni di reazioni, contenenti 20000 cpm di substrato, crescenti quantità di topoisomerasi IB umana (5 µl, 10 µl, 15 µl e 30 µl), cEPA 300 mM o CPT 100 mM, mix TOPI 1X, KCl 150 mM per un volume finale di 100 µl, mantenendo costante la percentuale di glicerolo ed incubandole a temperatura ambiente per 4 minuti. Ogni reazione è stata deposta su un filtro di nitrocellulosa, precedentemente posto all'interno di colonnine spin-x ed equilibrato con 100 µl di salmon sperm 100 µg/ml. Dopo averle centrifugate per 1 minuto a 6000 rpm ed aver raccolto l'eluato (FT), si sono lavati i filtri aggiungendo 100 µl di mix TOPI 1X e KCl 200 mM, raccogliendo anche il lavaggio. A questo punto, per ogni campione, si sono misurate allo scintillatore le conte del FT, del lavaggio e della colonnina contenente il filtro.

La percentuale del DNA legato viene calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ Binding} = [\text{cpm colonnina} / (\text{cpm colonnina} + \text{cpm FT} + \text{cpm lavaggio})] \times 100$$

## ***MATERIALE PER IL SISTEMA BATTERICO E.coli.***

### ***Ceppi batterici.***

**BL21:** *E.coli B F*, *omp T*, *hsdS* (*rb<sup>-</sup>*, *mb<sup>-</sup>*), *gal*, *dcm*.

### ***Terreni liquidi di crescita.***

**LB ( 1 l):** 10 g Caseina ( = Peptone), 5 g Estratto di Lievito, 10 g NaCl. Autoclavare a 120°C per 20'.

### ***Terreni solidi di crescita.***

Aggiungere 15 g di agar ad un litro di LB e poi autoclavare a 120°C 20'.

### ***Antibiotici.***

**Ampicillina** 100 mg/ml viene sterilizzata mediante filtrazione e conservata in aliquote a -20°C.

### ***Soluzioni utilizzate.***

**Tampone di sonicazione:** tampone fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 50 mM a pH = 7.8, inibitori di proteasi 1X.

#### **Tamponi per la cromatografia a scambio cationico:**

**Tampone A:** tampone fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 50 mM a pH = 7.8; **Tampone B:** tampone fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 1 M a pH = 7.8.

**Tampone per cromatografia di gel filtrazione:** tampone fosfato 20 mM, NaCl 150 mM a pH = 7.1.

**Soluzione denaturante SDS-PAGE 2X:** (SDS 4%, 125 mM Tris-HCl pH = 6.8, β-mercaptoetanol 10%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.004%).

**TRIS-GLICINA-SDS 10x :** Tris 250mM, glicina 2.5mM, SDS 1%.

**Soluzione “resolving” per gel denaturante al 10%:** 25% di PoliAcilammide 40%, 25% di 1.5M Tris-HCl a pH 8.8, 0.1% di SDS 10%(w/v), 32.3% H<sub>2</sub>O, 0.05% APS 10% (w/v), 0.05% TEtraMetilEtilenDiammina (TEMED).

**Soluzione “resolving” per gel denaturante al 15%:** 37.5% di PoliAcrilammide 40%, 25% di 1.5M Tris-HCl a pH 8.8, 0.1% di SDS 10%(w/v), 32.3% H<sub>2</sub>O, 0.05% APS 10% (w/v), 0.05% TEtraMetilEtilenDiammina (TEMED).

**Soluzione “stacking” 4% per gel denaturante:** 10% di PoliAcrilammide 40%, 25% di 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS al 10%(w/v), 44.8% H<sub>2</sub>O, 0.05% APS (w/v), 0.1% TEMED.

**Soluzione colorante del gel denaturante:** 0,2% blue-Coomassie in 30% metanolo, 10% acido acetico, 60% H<sub>2</sub>O.

**Soluzione decolorante:** 30% metanolo, 10% di acido acetico e 60% H<sub>2</sub>O.

## ***METODI PER IL SISTEMA BATTERICO DI E.coli.***

### ***Espressione del dominio N-terminale.***

Il ceppo BL21 di *E. coli*, utilizzato per l'espressione del dominio N-terminale della topoisomerasi IB umana, è stato “striccato” su piastre di LB agar con ampicillina 100 µg/ml e lasciate crescere a 37°C per tutta la notte.

Singole colonie di cellule batteriche sono state prelevate dalle piastre, preincolate in 5 ml di brodo LB ampicillina (100 µg/ml) ed incubate a 37°C per una notte. La coltura satura è stata inoculata, con un rapporto di diluizione pari a 1/50, in una beuta contenente 1l di LB con ampicillina 100 µg/ml e glucosio 2% e successivamente incubata a 37°C. Quando la densità ottica a 600nm è 0.5 viene aggiunto IPTG (40µg/ml) per indurre la sintesi proteica e la coltura è stata lasciata crescere a 27°C per 4h a 120 rpm. Le cellule sono state recuperate centrifugando a 10000 g per 15 minuti e risospese in tampone di sonicazione. In seguito a sonicazione (impulsi da 1 minuto seguiti da 1 minuto in ghiaccio) i frammenti cellulari sono stati rimossi centrifugando a 20000g per 30 minuti a 4°C.

### ***Purificazione del dominio N-terminale.***

L'estratto cellulare ottenuto viene caricato su una colonna a scambio cationico 16/10 HiLoad SP Sepharose High Performance ed eluita mediante gradiente 0.5-1 M KCl. Le frazioni di picco raccolte vengono analizzate in gel denaturante di poliacrilammide 10% e quelle contenenti la proteina GST-N-terminale sono quantificate secondo il metodo di Lowry e digerite con 0.5

unità di trombina ogni 100 µg di proteina di fusione per 4h in lenta agitazione a temperatura ambiente. Trascorse le 4h la soluzione è stata centrifugata a 15000 rpm per 30 minuti a 4°C. Recuperato il supernatante viene diluito 1:1 con tampone fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 50 mM a pH = 7.8 (tampone A della colonna cromatografica) e caricato nuovamente, per una seconda corsa, su una colonna cromatografica a scambio cationico con il medesimo gradiente usato per la prima corsa. Le frazioni eluite vengono analizzate su gel denaturante di poliacrilammide 15% e quelle in cui è presente il dominio N-terminale sono concentrate fino ad un volume di 1 ml. Dopo aver centrifugato questo campione a 17000 rpm per 30 minuti a 4°C, si carica sulla colonna per gel filtrazione HiLoad<sup>TM</sup> 16/60 Superdex75. Il dominio così purificato viene quantizzato secondo il metodo di Lowry ed analizzato mediante tecniche spettroscopiche in soluzione.

## ***METODI SPETTROSCOPICI.***

### ***Spettroscopia di fluorescenza.***

Un'analisi preliminare della struttura del dominio N-terminale è stata condotta in soluzione mediante la tecnica spettroscopica di fluorescenza.

La fluorescenza è un fenomeno di emissione, in cui viene misurata la transizione all'interno della molecola da un livello energetico superiore a uno inferiore, rilevando la radiazione emessa anziché quella assorbita. Affinché avvenga tale transizione da uno stato energetico più alto ad uno più basso, è necessario che in precedenza si sia verificato un evento di eccitazione, causato per esempio dall'assorbimento di radiazione elettromagnetica. La lunghezza d'onda della radiazione assorbita deve avere valori minori (energia più elevata) rispetto a quella emessa (fluorescenza). La differenza tra queste due lunghezze d'onda è nota come spostamento (shift) di Stokes. Le radiazioni emesse appaiono come spettri a banda perché molti sono i valori di lunghezza d'onda vicini, che dipendono dai livelli finali di energia vibrazionale e rotazionale raggiunti. Questi spettri di solito non dipendono dalla lunghezza d'onda della radiazione di eccitazione e hanno un andamento speculare rispetto al picco di assorbimento con lunghezza d'onda maggiori.

Lo strumento utilizzato per monitorare l'andamento del segnale di fluorescenza è uno spettrofluorimetro LS50B Perkin Elmer, con un sistema di termostatazione. Si setta la lunghezza d'onda di eccitazione a 295 nm e l'intervallo di emissione tra 300-500 nm. La misura dell'intensità di fluorescenza della soluzione del dominio N-terminale 20  $\mu$ M in tampone fosfato 20 mM e NaCl 150 mM a pH = 7.1 è stata effettuata a 25°C in una cuvetta di quarzo da 1 cm per un volume finale di 1 ml.

### ***Dicroismo circolare.***

Per un ulteriore studio preliminare strutturale in soluzione del dominio è stata utilizzata la tecnica del dicroismo circolare. Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica utilizzata per misurare l'attività ottica di molecole asimmetriche in soluzione. Il CD fornisce informazioni riguardo all'ineguale assorbimento della luce polarizzata circolarmente a destra e a sinistra da parte di molecole otticamente attive, quali le proteine. Le bande CD delle proteine cadono in due regioni spettrali: la far-UV o regione ammidica (170-

250 nm), che è dominata da contributi del legame peptidico, e la regione near-UV (250-300 nm) in cui assorbono gli amminoacidi aromatici. Le due regioni spettrali forniscono differenti informazioni circa la struttura della proteina. Le bande CD nella regione ammidica danno informazioni circa i legami peptidici e la struttura secondaria di una proteina e sono usate per monitorare i cambiamenti nella struttura secondaria nel corso di transizioni strutturali. Il segnale viene registrato in ellitticità espressa in milligradi (mdeg).

Lo strumento usato per l'analisi conformazionale del dominio N-terminale è un dicometro Jasco 600. L'ellitticità è stata rilevata nell'intervallo 200-250 nm (per la far UV) con una sensibilità di 20 mdeg, tempo di acquisizione 1 sec., con fase spettrale di 0.2 nm, velocità di scansione 20 nm/min e 4 scansioni per ogni spettro. Per le misure spettrali sono state utilizzate cuvette di quarzo da 0.1 cm. Dopo l'acquisizione i dati sono convertiti in codice leggibile da PC e l'elaborazione dei dati è stata effettuata con il programma Kaleidagrap.

In queste analisi si sono usate concentrazioni crescenti di dominio N-terminale (5, 10, 15, 20  $\mu$ M) in tampone fosfato 20 mM e NaCl 150 mM a pH = 7.1

### ***NMR monodimensionale.***

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) permette di identificare e monitorare la struttura in soluzione di molecole organiche e biologiche. Il fenomeno della risonanza magnetica nasce dall'interazione tra il momento magnetico di un nucleo atomico ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) ed un campo magnetico esterno ( $B_0$ ). Quando questi nuclei interagiscono con il campo magnetico esterno ( $B_0$ ) uniforme ed omogeneo, si allineano in direzione parallela o antiparallela al campo. La frazione di nuclei il cui momento magnetico è allineato parallelamente a  $B_0$  è in eccesso rispetto a quelli con momento allineato antiparallelamente, in accordo con la statistica di Boltzmann. E' dunque possibile definire un vettore somma di magnetizzazione  $M_0$  che risulta parallelo a  $B_0$ . Se si immagina di perturbare il sistema con un campo magnetico ortogonale a  $B_0$  ed oscillante nel tempo alla stessa frequenza di precessione dei nuclei (frequenza di risonanza) l'effetto di questa perturbazione è la rotazione del vettore di magnetizzazione  $M_0$  sul piano xy. Al termine della perturbazione il vettore  $M_0$  risente nuovamente solo dell'effetto di  $B_0$ , e tende quindi a tornare lungo la direzione del campo. Se ci si pone in un punto sul piano xy e si osserva il

decadimento dell'intensità di  $M_0$ , si avrà una funzione periodica nel tempo che decresce fino a zero. Questa funzione è chiamata FID (free induction decay). Il FID contiene il contributo di tutti i nuclei ed è, quindi, necessario trasformare questa funzione in modo da osservare il contributo di ogni singolo nucleo. La trasformata di Fourier è un'operazione che trasforma il FID da una funzione nel dominio del tempo ad una nel dominio delle frequenze. Graficamente si ottiene uno spettro di frequenze che consiste in un set di picchi la cui intensità rappresenta la proporzione tra le componenti alle diverse frequenze.

Lo strumento utilizzato è lo spettrometro Bruker Avance operante ad una frequenza di 700,13 MHz nel caso dell'idrogeno.

Nell'esperimento si analizza a 298K una soluzione in cui il dominio N-terminale 60  $\mu$ M in tampone fosfato 20 mM e NaCl 150 mM a pH = 7.1. I dati sono stati processati mediante NMRPipe e NMRView.



## ***BIBLIOGRAFIA***

Ahumada A., Tse-Dinh Y. C. The Zn(II) binding motifs of E. coli DNA topoisomerase I is part of a high-affinity DNA binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. 251:509-514.

Alsner J., Svejstrup J. Q., Kjeldsen E., Sorensen B. S., Westergaard O. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J. Biol. Chem.* 1992. 267:12408-12411.

Andersen A.H., Goeke E., Bonven B.J., Nielsen O.F., Westergaard O. Topoisomerase I has a strong binding preference for a conserved hexadecameric sequence in the promotor region of the rRNA gene from *Tetrahymena pyriformis*. *Nucl. Ac. Res.* 1985. 13(5):1543-1557.

Anderson R.D., Berger N.A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat Res.* 1994. 309:109-142.

Bailly C., Lansiaux A., Dassonneville L., Demarquay D., Coulomb H., Huchet M., Lavergne O., Bigg D.C. Homocamptothecin, an E-ring-modified camptothecin analogue, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks. *Biochemistry.* 1999. 38:15556-15563.

Baker S.D., Wadkins R.M., Stewart C.F., Beck W.T., Danks M.K. Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry.* 1995. 19:134-145.

Been M. D., Burgess R. R., Champoux J. J. DNA strand breakage by wheat germ type I topoisomerase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1984. 782:304-312.

Benedetti P., Fiorani P., Capuani L., Wang J.C. Camptothecin resistance from a single mutation changing glycine 363 of human DNA topoisomerase I to cysteine. *Cancer Res.* 1993. 53:4343-4348.

Bergerat A., De Massy B., Gadell, D., Varoutas P.C., Nicolas A., Forterre P. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature.* 1997. 386:414-417.

Bharti A. K., Olson M. O., Kufe D. W., Rubin E. H. Identification of a nucleolin binding site in a human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:1993-1997.

Bjornsti M.A. Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell.* 2002. 2:267-273.

Boege F., Straub A., Kehr A., Bosenberg C., Christiansen K., Anderson A., Jakob F., Kohrle J. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol. Chem.* 1996. 271:2262-2270.

Boles T. C, White J. H, Cozzarelli N. R. Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 1990. 213:931-951.

Bridewell J.M., Finlay G.J., Baguley B.C. Differential actions of aclarubicin and doxorubicin: the role of topoisomerase I. *Oncol. Res.* 1997. 9:535-542.

Bronstein I.B., Vorobyev S., Timofeev A., Jolles C.J., Alder S.L., Holden J.A. Elevations of DNA topoisomerase I catalytic activity and immunoprotein in human malignancies. *Oncol Res.* 1996. 8:17-25.

Bronstein I.B., Wynne-Jones A., Sukhanova A., Fleury F., Ianoul A., Holden J.A., Alix A.J., Dodson G.G., Jardillier J.C., Nabiev I., Wilkinson A.J. Expression, purification and DNA-cleavage activity of recombinant 68-kDa human topoisomerase I-target for antitumor drugs. *Anticancer Res.* 1999. 19:317-327.

Brown P. O., Cozzarelli, N. R. A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science.* 1979. 206:1081-1083.

Bullock P., Champoux J.J., Botchan M. Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. *Science*. 1985. 230:954-958.

Camilloni G., Di Martino E., Di Mauro E., Caserta M. Regulation of the function of eukaryotic DNA topoisomerase I: topological conditions for inactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. 86:3080-3084.

Carey J.F., Schultz S.J., Sisson L., Fazio T.G., Champoux J.J. DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2003. 100:5640-5645.

Champoux J.J., Dulbecco R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA – a possible swivel for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. 69:143-146.

Champoux J. J. Strand breakage by the DNA untwisting enzyme results in covalent attachment of the enzyme to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977. 74:3800-3804.

Champoux J. J. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. N. Y. Rev. Biochem.* 2001. 70:369-413.

Chang J.Y., Liu J.F., Juang S.H., Liu T.W., Chen L.J. Novel mutation of topoisomerase I in rendering cells resistant to camptothecin. *Cancer Res.* 2002. 62:3716-3721.

Charvin G., Strick T.R., Bensimon D., Croquette V. Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005. 34:201-219.

Chen A.Y., Liu L.F. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1994. 34:191-218.

Cherry J.M., Ball C., Weng S., Juvik G., Schmidt R., Adler C., Dunn B., Dwight S., Riles L., Mortimer R.K., Botstein D. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 1997. 387(6632 Suppl):67-73.

Chrencik J. E., Staker B. L., Burgin A. B., Pourquier P., Pommier, Y., Stewart L., Redinbo M. R. Mechanisms of camptothecin resistance by human topoisomerase I mutations. *J. Mol. Biol.* 2004. 339:773-784.

Christensen M.O., Barthelmes H.U., Feineis S., Knudsen B.R., Andersen A.H., Boege F., Mielke C. Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerases I. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:15661-15665.

Christensen M.O., Barthelmes H.U., Boege F., Mielke C. The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nuclear organizer regions of mitotic chromosomes. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:35932-35938.

Christensen M.O., Krokovski R.M., Barthelmes H.U., Hock R., Boege F., Mielke C. Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 2004. 279:21873-21882.

Christiansen K., Bonven B. J., Westergaard O. Mapping of sequence-specific chromatin proteins by a novel method: topoisomerase I on *Tetrahymena* ribosomal chromatin. *J. Mol. Biol.* 1987. 193:517-525.

Christiansen K., Svejstrup A. B., Andersen A. H., Westergaard O. Eukaryotic topoisomerase I-mediated requires bipartite DNA interactions. Cleavage of DNA substrates containing strand interruption implicates a role for topoisomerase I in illegitimate recombination. *J. Biol. Chem.* 1993. 268:9690-9701.

Coderoni S., Paparelli M., Gianfranceschi G.L. Role of calf thymus DNA-topoisomerase I phosphorylation on relaxation activity expression and on DNA-protein interaction. Role of DNA-topoisomerase I phosphorylation. *Mol Biol Rep.* 1990. 14:35-39.

Connelly J.C., Leach D.R. Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol. Cell.* 2004. 13:307-316.

Corbett A.H., Osheroff N. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem Res Toxicol.* 1993. 6:585-97.

Corbett K.D., Berger J.M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2004. 33:95-118.

Cozzarelli N.R., Wang J.C. DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990. 371-389.

Crow R.T., Crothers D.M. Structural modifications of camptothecin and effects on topoisomerase I inhibition. *J Med Chem.* 1992. 35:4160-4164.

D'Arpa P., Machlin P. S., Rattie H. III, Rothfield N. F., Cleveland D. W., Earnshaw W. C. cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. 85:2543-2547.

Durban E., Mills J.S., Roll D., Busch H. Phosphorylation of purified Novikoff hepatoma topoisomerase I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. 111:897-905.

El-Khamisy S.F., Saifi G.M., Weinfeld M., Johansson F., Helleday T., Lupski J.R., Caldecott K.W. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature.* 2005. 434:108-113.

Fassberg J., Stella V.J. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J. Pharm. Sci.* 1992. 81:676-684.

Ferguson L.R., Baguley B.C. Topoisomerase II enzymes and mutagenicity. *Environ Mol Mutagen.* 1994. 24:245-261.

Ferro A.M., Olivera B.M. Poly (ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 1984. 259:547-554.

Fertala J., Vance J.R., Pourquier P., Pommier Y., Bjornsti M.A. Substitutions of Asn-726 in the active site of yeast DNA topoisomerase I

define novel mechanisms of stabilizing the covalent enzyme-DNA intermediate. *J Biol Chem.* 2000. 275:15246-53.

Field C.J., Schley P.D. Evidence for potential mechanism for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. 79:1190s-1198s.

Fiorani P., Amatruda J.F., Silvestri A., Butler R.H., Bjornsti M.A., Benedetti P. Domain interactions affecting human DNA topoisomerase I catalysis and camptothecin sensitivity. *Mol. Pharmacol.* 1999. 56:1105-15.

Fiorani P., Bruselles A., Falconi M., Chillemi G., Desideri A., Benedetti P. Single mutation in the linker domain confers protein flexibility and camptothecin resistance to human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 2003. 278:43268-43275.

Fiorani P., Chillemi G., Losasso C., Castelli S., Desideri A. The different cleavage DNA sequence specificity explains the camptothecin resistance of the human topoisomerase I Glu418Lys mutant. *Nucleic Acids Res.* 2006. 34:5093-5100.

Friedman H.S., Houghton P.J., Schold S.C., Keir S., Bigner D.D. Activity of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against pediatric and adult central nervous system tumor xenografts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994. 34:171-174.

Funk M., Niedenthal R., Mumberg D., Brinkmann K., Ronicke V., Henkel T. Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 2002. 350:248-57.

Gao H., Chen X.B., McGowan C. H. Mus81 endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells. *Mol. Biol. Cell.* 2003. 14:4826-4834.

Garcia-Carbonero R., Supko J. G. Current perspectives on the clinical experience pharmacology and continued development of the camptothecins. *Clin. Cancer Res.* 2002. 8:641-661.

Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H., Nash H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1976. 73:3872-3876.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. Life with 6000 genes. *Science.* 1996. 274:563-567.

Goto T., Wang J.C. 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. USA.* 1985. 82:7178-7182.

Gupta M., Fujimori A., Pommier Y. Eukaryotic DNA topoisomerases I. *Biochem. Biophys. Acta* 1995. 1262:1-14.

Hann C.L., Carlberg A.L., Bjornsti M.A. Intragenic suppressors of mutant DNA topoisomerase I-induced lethality diminish enzyme binding of DNA. *J Biol Chem.* 1998. 273:31519-31527.

Hannan K.M., Hannan R.D., Rothblum L.I. Transcription by RNA polymerase I. *Front. Biosci.* 1998. 3:d376-d398.

Heck M.M., Hittelman W.N., Earnshaw W.C. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1988.85:1086-90.

Heiland S., Knippers R., Kunze N. The promoter region of the human type-I-DNA topoisomerase gene. *Eur. Biochem.* 1993. 217:813-822.

Hertzberg R.P., Busby R.W., Caranfa M.J., Holden K.G., Johnson R.K., Hecht S. M., Kingsbury W.D. Irreversible trapping of DNA topoisomerase I covalent complex. *J. Biol. Chem.* 1990. 265:19287-19295.

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. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of

mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem.* 1989. 32:715-720.

Hino O., Ohtake K., Rogler C.E. Features of two hepatitis B virus (HBV) DNA integrations suggest mechanisms of HBV integration. *J. Virol.* 1989. 63:2638-2643.

Houghton P.J., Cheshire P.J., Myers L., Stewart C.F., Synold T.W., Houghton J.A. Evaluation of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1992. 31:229-239.

Hsiang Y.H., Herzberg R., Hecht S., Liu L.F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1985. 260:14873-14878.

Hsiang Y.H., Lihou M.G., Liu L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res.* 1989. 49:5077-5082.

Hsiang Y.H., Liu L.F. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res.* 1988. 48:1722-1726.

Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98:12009-12014.

Interthal H., Quigley P.M., Hol W.G., Champoux J.J. The role of lysine 532 in the catalytic mechanism of human topoisomerase I. *J Biol Chem.* 2004. 279:2984-92.

Ireton G.C., Stewart L., Parker L.K., Champoux J.J. Expression of human topoisomerase I with a partial deletion of the linker region yields monomeric and dimeric enzymes that responde differently to camptothecin. *J. Biol. Chem.* 2000. 275:25820-25830.

Jaxel C., Capranico G., Kerrigan D., Kohn K.W., Pommier Y. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *J. Biol. Chem.* 1991. 266:20418-20423.



Kimura K., Hirano T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell*. 1997. 90:625-634.

Kingsbury W.D., Bohem J.C., Jakas D.R. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.* 1991. 34:98-107.

Kirkegaard K., Wang J.C. Escherichia coli DNA topoisomerase I catalyzed linking of single-stranded ring of complementary base sequences. *Nucleic Acids Res.* 1978. 5:3811-3820.

Kirkegaard K., Wang J.C. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J. Mol. Biol.* 1985. 185:625-637.

Koster D. A., Croquette V., Dekker C., Shuman S. Friction and torque govern the relaxation of a supercoil by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*. 2005. 434:671-674.

Krah R., Kozyavkin S. A., Slesarev A. I., Gellert M. A two-subunit type I DNA topoisomerase (reverse gyrase) from an extreme hyperthermophile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. 93:106-109.

Kretzschmar M., Meisterernst M., Roeder R.G. Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993. 90:11508-11512.

Krogh B.O., Shuman S. Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. *Mol. Cell*. 2000. 5:1035-1041.

Krogh B.O., Shuman S. Proton relay mechanism of general acid catalysis by DNA topoisomerase IB. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:5711-5714.

Kubota N., Kanzawa F., Nishio K., Takeda Y., Ohmori T., Fujiwara Y., Terashima Y., Saijo N. Detection of topoisomerase I gene point mutation in CPT-11 resistant lung cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. 188:571-577.

Kunze N., Yang G., Dolberg M., Sundarp R., Richter A. Structure of human type I DNA topoisomerase gene. *J. Biol. Chem.* 1991. 266:9610-9616.

Labourier E., Rossi F., Gallouzi I.E., Allemand E., Divita G., Tazi J. Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26:2955-62.

Lanza A., Tornaletti S., Rodolfo C. Human DNA topoisomerase I-mediated cleavages stimulated by ultraviolet light-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:6978-6986.

Larsen A. K., Gobert C. DNA Topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Pathol. Oncol. Res.* 1999. 5:171-176.

Lebel M., Spillare E.A., Harris C.C., Leder P. The Werner syndrome gene product co-purifies with the DNA replication complex and interacts with PCNA and topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1999. 274:37795-37799.

Lee M. P., Brown S. D., Chen A., Hsieh T S. DNA topoisomerase I is essential in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. 90:6656-6660.

Leppard J. B., Champoux J. J. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles and damage control. *Chromosoma.* 2005. 114:75-85.

Leppard J.B., Dong Z., Mackey Z.B., Tomkinson A.E. Physical and functional interaction between DNA ligase III alpha and poly(ADPribose) polymerase I in DNA single-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 2003. 23:5919-5927.

Leshner D.T., Pommier Y., Stewart L., Redinbo M.R. 8-Oxoguanine rearranges the active site of human topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. 99:12102-12107.

Leteurtre F., Fesen M., Kohlhagen G., Kohn K., W., Pommier Y. Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine

residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm. *Biochemistry*. 1993. 31:8955-8962.

Li C., Averboukh L., Pardee A.B.  $\beta$ -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J. Biol. Biochem.* 1993. 268(30):22463-22468.

Lindsley J.E., Wang J.C. Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. 88:10485-10489.

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. Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation. *J Biol Chem*. 2001. 276:20220-20227.

Liu C., Pouliot J.J., Nash H.A. Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99:14970-14975.

Liu L.F. Anticancer drugs that convert DNA topoisomerases into DNA damaging agents. In: Cozzarelli, N. R., Wang, J. C.: *DNA topology and its biological effects*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990. 371-389.

Liu L.F., Miller K.G. Eukaryotic DNA topoisomerases: two forms of type I DNA topoisomerases from HeLa cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. 78:3487-3491.

Lue N., Sharma A., Mondragon A., Wang J. C. A 26 kDa yeast DNA topoisomerase I fragment: crystallographic structure and mechanistic implications. *Structure*. 1995. 3:1315-1322.

Madden K.R., Stewart L., Champoux J.J. Preferential binding of human DNA topoisomerase I to superhelical DNA. *EMBO J*. 1995. 14:5399-5409.

Mao Y., Mehl I.R., Muller M.T. Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99:1235-1240.

Marchand C., Antony S., Kohn K.W., Cushman M., Ioanoviciu A., Staker B.L., Burgin A.B., Stewart L., Pommier Y. A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol. Cancer Ther.* 2006. 5:287–295.

Merino A., Madde, K.R., Lane W.S., Champou, J. ., Reinberg D. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature.* 1993. 365:227-232.

Mizuuchi K., Fisher L. M., O’Dea M. H., Gellert M. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. 77:1847-1851.

Mo Y. Y., Wang, C., Beck W. T. (). A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 2000. 275:41107-41113.

Morham S.G., Kluckman K.D., Voulomanos N., Smithies O. Target disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol. Cell Bio.* 1996. 16:6804-6809

Muller M.T. Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. *B. B. A.* 1985. 824:263-267.

Nicholas A.W., Wani M.C., Manikumar G., Wall M.E., Kohn K.W., Pommier Y. Plant antitumor agents. 29. Synthesis and biological activity of ring D and ring E modified analogues of camptothecin. *J Med Chem.* 1990. 33:972-978.

Nichols M. D., De Angelis K., Keck, J. L. Berger, J. M. Structure and function of an archeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J.* 1999. 18:6177-6188.

O'Connor P.M., Nieves-Neira W., Kerrigan D., Bertrand R., Goldman J., Kohn K.W., Pommier Y. S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxycamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells. *Cancer. Commun.* 1991. 3:233-240.

Okano S., Lan L., Caldecott K.W., Mori T., Yasui A. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 2003. 23:3974-3981.

Osheroff N., Shelton E. R., Brutlag D. L. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *J. Biol. Chem.* 1983. 258:9536-9543.

Perego P., Jimenez G.S., Gatti L., Howell S.B., Zuinino F. Yeast mutants as a model system for identification of determinants of chemosensitivity. *Pharmacol. Rev.* 2000. 52:477-491.

Pizzolato J.F., Saltz L.B., The camptothecins. *Lancet.* 2003. 361:2235-2242.

Plo I., Liao Z.Y., Barcelo J.M., Kohlhagen G., Caldecott K.W., Weinfeld M., Pommier Y. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions. *DNA Repair (Amst.)*. 2003. 2:1087-1100.

Pommier Y. DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993. 32:103-108.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer.* 2006. 6:789-802.

Pommier Y., Kohlhagen G., Kohn K.W., Leteurtre F., Wani M.C., Wall, M.E. Interaction of an alkylating camptothecin derivative with a DNA base at topoisomerase I-DNA cleavage sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. 92:8861-8865.

Pommier Y., Leteurtre F., Fesen M.R., Fujimori A., Bertrand R., Solary E., Kohlhagen G., Kohn K.W. Cellular determinants of sensitivity and resistance to DNA topoisomerase inhibitors. *Cancer Invest.* 1994. 12:530-5342.

Pommier Y., Pourquier P., Urasaki Y., Wu J., Laco G. S. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist. Updates.* 1999. 2:307-318.

Postow L., Crisona N. J., Peter B. J., Hardy C. D., Cozzarelli N. R. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. 98:8219-8226.

Pouliot J.J., Robertson C.A., Nash H.A. Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells.* 2001. 6:677-687.

Pourquier P., Pilon A.A., Kohlhagen G., Mazumder A., Sharma A., Pommier Y. 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.* 1997. 272:26441-26447.

Pratesi G., Tortoreto M., Corti C., Giardini R., Zunino F. Successful local regional therapy with topotecan of intraperitoneally growing human ovarian carcinoma xenografts. *Br. J. Cancer* 1995. 71:525-528.

Raymond A.C, Staker B.L, Burgin A.B Jr. Substrate specificity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp1). *J Biol Chem.* 2005. 280:22029-22035.

Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J. J. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science.* 1998. 279:1504-1513.

Redinbo M.R., Champoux J.J., Hol W.G. Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry.* 2000. 39:6832-6840.

Redinbo M.R., Champoux J.J., Hol W.G. Structural insights into the function of type IB topoisomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9:29-36.

Reid R.J., Benedetti P., Bjornsti M.A. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. 1400:289-300.

Roca J., Wang J.C. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell*. 1994. 77:609-616.

Rossi F., Labourier E., Forne T., Divita G., Derancourt J., Riou J.F., Antoine E., Cathala G., Brunel C., Tazi J. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature*. 1996. 381:80-82.

Rossi F., Labourier E., Gallouzi I.E., Derancourt J., Allemand E., Divita G., Tazi J. The C-terminal domain but not the tyrosine 723 of human DNA topoisomerase I active site contributes to kinase activity. *Nucleic Acids Res*. 1998. 26:2963-2970.

Rubbi C.P., Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J*. 2003. 22:6068–6077.

Saleem A., Ibrahim N., Patel M., Li X.G., Gupta E., Mendoza J., Pantazis P., Rubin E.H. Mechanisms of resistance in a human cell line exposed to sequential topoisomerase poisoning. *Cancer Res*. 1997. 57:5100-6.

Sawada S., Yokokura T., Miyasaka T. Synthesis of CPT-11 (irinotecan hydrochloride trihydrate). *Ann N Y Acad Sci*. 1996. 803:13-28.

Scaldaferro S., Tinelli S., Borgnetto M.E., Azzini A., Capraico G. Directed evolution to increase camptothecin sensitivity of human DNA topoisomerase I. *Chem. & Biol*. 2001. 123:1-11.

Schwartzman J. B., Stasiak A. A topological view of the replicon. *EMBO reports*. 2004. 5:256-261.

Sherratt D. J., Wingley D. B. Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell*. 1998. 93:149-152.

Shykind B.M., Kim J., Stewart L., Champoux J.J., Sharp P.A. Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev*. 1997. 11:397-407.

Sikorski R.S., Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1989. 122:19-27.

Slesarev A. I., Lake J. A., Stetter K. O., Gellert M., Kozyavkin S. A. Purification and characterization of DNA topoisomerase V. An enzyme from hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* that resembles eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:3295-3303.

Slesarev A. I., Stetter K. O., Lake J. A., Gellert M., Krah R., Kozyavkin S. A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature*. 1993. 364:735-737.

Srivenugopal K. S., Lockshon D., Morris D. R. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry*. 1984. 23:1899-1906.

Staker B.L., Freese M.D., Cushman M., Pommier Y., Zembower D., Stewart L., Burgin A.B. Structures of the three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex. *J. Med. Chem.* 2005. 48:2336-2345.

Staker B.L., Hjerrild K., Feese M.D., Behnke C.A., Burgin A.B.Jr, Stewart L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *PNAS*. 2002. 99:15387-15392.

Stevsner T., Mortensen U. H., Westergaard O., Bonven B. J. Interactions between eukaryotic DNA topoisomerase I and a specific binding sequence. *J. Mol. Chem.* 1989. 264:10110-10113.

Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J. Biol. Mol.* 1997. 269:355-372.

Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. The domain organization of human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:7602-7608.

Stewart L., Redinbo M. R., Qiu X., Hol W. G. L., Champoux, J. J. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*. 1998. 279:1534-1540.



Stivers J.T., Harris T.K., Mildvan A.S. Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation. *Biochemistry*. 1997. 36:5212-5222.

Strumberg D., Pilon A.A., Smith M., Hickey R., Malkas L., Pommier Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell. Biol.* 2000. 20:3977-3987.

Svejstrup J.Q., Christiansen K., Gromova I.I., Andersen A. H., Westergaard O. New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action of camptothecin at a specific recognition site. *J. Mol. Biol.* 1991. 222:669-678.

Tanizawa A., Kohn K. W., Pommier, Y. Induction of cleavage in topoisomerase I cDNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21:5157-5166.

Tian L., Claeboe C.D., Hecht S.M., Shuman S. Guarding the genome: electrostatic repulsion of water by DNA suppresses a potent nuclease activity of topoisomerase IB. *Mol. Cell.* 2003. 12:199-208.

Tse Y., Wang J. C. E. coli and M. luteus DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double stranded DNA rings. *Cell* 1980. 22:269-276.

Tse-Dinh Y.C., Wong T.W., Goldberg A.R. Virus- and cell-encoded tyrosine protein kinases inactivate DNA topoisomerases in vitro. *Nature*. 1984. 312:785-786.

Tsuzuki T., Igarashi M., Miyazawa T. Conjugated eicosapentaenoic acid (EPA) inhibits transplanted tumor growth via membrane lipid peroxidation in nude mice. *J. Nutr.* 2004. 134:1162-1166.

Uemura T., Yanagida M. Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J.* 1984. 3:1737-1744.

Ulukan H., Swaan P.W. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs*. 2002. 62:2039-2057.

Urasaki Y., Laco G.S., Pourquier P., Takebayashi Y., Kohlhagen G, Gioffre C., Zhang H., Chatterjee D., Pantazis P., Pommier Y. Characterization of a novel topoisomerase I mutation from a camptothecin-resistant human prostate cancer cell line. *Cancer Res*. 2001. 61:1964-9.

Vance J.R., Wilson T.E., Yeast Tdp1 and Rad1-Rad10 function as redundant pathways for repairing Top1 replicative damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. 99:13669-13674.

Vousden K.H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*. 2002. 1602:47-59.

Wall M.E., Wani M.C. Antineoplastic agents from plants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1977. 17:117-132.

Wall M.E., Wani M.C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic-thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 1995. 55:753-760.

Wall M.E., Wani M.C., Cook C.E., Palmer K.H. Plant antitumor agents, I: the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc*. 1966. 88:3888-3890.

Wallis J. W., Chrebet G., Brodsky G., Rolfe M., Rothstein R. A hyper-recombination mutation in *Saccharomyces cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*. 1989. 58:409-419.

Wang H.K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Med. Res. Rev*. 1997. 17:367-425.

Wang H.P., Rogler C.E. Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J. Virol*. 1991. 65:2381-92.

Wang J. C. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 1985. 54:665-697.

Wang J. C. Helical repeat of DNA in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. 76:200-203.

Wang J.C. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q. Rev. Biophys.* 1998. 31:107-144.

Wang J.C., Roeder R. G. DNA topoisomerase I and PCA can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol. Cell.* 1998. 1:749-757.

Wang, J. C. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein  $\omega$ . *J. Mol. Biol.* 1971. 55:523-533.

Wani M.C., Nicholas A.W., Wall M.E. Plant antitumor agents. 28. Resolution of a key tricyclic synthon, 5'(RS)-1,5-dioxo-5'-ethyl-5'-hydroxy-2'H,5'H,6'H-6'-oxopyrano[3',4'-f]delta 6,8-tetrahydro-indolizine: total synthesis and antitumor activity of 20(S)- and 20(R)-camptothecin. *J Med Chem.* 1987. 30:2317-9.

Wani M.C., Ronman P.E., Lindley J.T., Wall M.E. Plant antitumor agents. 18. Synthesis and biological activity of camptothecin analogues. *J Med Chem.* 1980. 23:554-560.

Wasserman S. A., Cozzarelli N. R. Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science.* 1986. 272:951-960.

White J.H. Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions. *Am. J. Math.* 1969. 91:693-728.

Yang S.W., Burgin A.B.Jr, Hiuzenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C., Nash H.A. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93:11534-11539.

Yang Z., Champoux J.J. The role of histidine 632 in catalysis by human topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:677-685.

Yonezawa Y., Hada T., Uryu K., Eitsuka T., Miyazawa T., Murakami-Nakai C., Yoshida H., Mizushima Y. Inhibitory effect of conjugated eicosapentaenoic acid on mammalian DNA polymerase and topoisomerase activities and human cancer cell proliferation. *Biochem. Pharmacol.* 2005. 70:453-460.

Zechiedrich E. L., Osheroff N. Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.* 1990. 9:4555-4562.

Zhu C. X., Tse-Dinh Y. C. Binding of Zn(II) to Escherichia coli DNA topoisomerase I. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994. 33:195-204.

## **CURRICULUM SINTETICO DELLA CANDIDATA.**

Alessia Campagna nasce a Roma il 4 Ottobre del 1980.

- Nell'anno 1999 si iscrive al corso di Laurea in Chimica della Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali presso l'Università degli studi di Roma "Tor Vergata".
- Nell'anno 2003 entra come allieva nel laboratorio diretto dal prof. Maurizio Paci presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell' Università degli studi di Roma "Tor Vergata". Si dedica allo studio strutturali preliminari della forma attiva della proteasi NS3 del virus Dengue.
- Nel settembre del 2004 discute la tesi dal titolo "Studio preliminare per la determinazione della forma attiva di proteasi NS3 del virus Dengue", relatori interni Prof. Maurizio Paci e la Dott.ssa Sonia Melino, correlatore Prof.ssa AnnaMaria Caccuri, e consegue il Diploma di Laurea in Chimica con la votazione di 110/110.
- Nel 2004 vince il concorso per il Dottorato di Ricerca triennale in Biochimica e Biologia Molecolare della Facoltà di Medicina presso l'Università degli studi di Roma "Tor Vergata" con borsa di studio dell'Università di Roma "Tor Vergata". L'argomento della ricerca è "Caratterizzazione della DNA topoisomerasi IB e della sua interazione con il farmaco camptotecina e l'acido eicosapentaenoico coniugato."
- Attualmente lavora presso il Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma "Tor Vergata", nel laboratorio del Prof. Alessandro Desideri.

**LISTA DELLE PUBBLICAZIONI DELLA  
CANDIDATA.**

Chillemi G., Fiorani P., Bruxelles A., Castelli S., Campagna A., Sarra O., Tesaro C., Fiorentini M., Vassallo O., D'Annessa I., Santoleri S., Desideri A. (2007). Role of flexibility and long range communication on the function of human topoisomerasi I. *Ital.J.Bioc.* 56(2):110-114.

**COPIA DELLE PUBBLICAZIONI RILEVANTI  
DELLA CANDIDATA.**