

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"

DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA
XX CICLO

Indirizzo: Ecologia e Fisiologia Microbica

La Girasi Inversa dell'archaeon ipertermofilo *Sulfolobus solfataricus*

Coordinatore: Prof. Amalia Virzo De Santo

Dottoranda: Dott.ssa Anna Valenti

Relatore: Prof. Maurilio De Felice

Correlatore: Dott. ssa Maria Ciaramella

INDICE GENERALE

PREFAZIONE	pag. 4
SOMMARIO GENERALE	pag. 5
INTRODUZIONE	pag. 10
1. Gli <i>Archaea</i> : un utile sistema modello...sorprendentemente originale.....	pag. 10
2. Le topoisomerasi e la regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA.....	pag. 11
3. La Girasi Inversa.....	pag. 14
4. La topologia del DNA <i>in vivo</i>	pag. 18
5. Parametri topologici del DNA.....	pag. 20
6. Le proteine implicate nella regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA.....	pag. 22
7. Agenti genotossici: il danno e il riparo.....	pag. 24
8. I danni da alchilazione.....	pag. 26

CAPITOLO I

Produzione e caratterizzazione della Girasi Inversa dell'archaeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* in forma nativa. Espressione eterologa, purificazione e caratterizzazione delle due isoforme della Girasi Inversa di *S. solfataricus* TopR1 e TopR2.

Sommario.....	pag. 28
Risultati Parte I.....	pag. 30
Risultati Parte II.....	pag. 35

CAPITOLO II

Interazione fisica e funzionale della Girasi Inversa e della *Single strand binding protein* SSB in *Solfataricus*.

Sommario.....	pag. 43
Risultati	pag. 45

CAPITOLO III

Risposta ai danni da alchilazione in *S. solfataricus*

Sommario.....	pag. 62
Risultati Parte I.....	pag. 64
Risultati Parte II.....	pag. 69

DISCUSSIONE.....pag. 81

MATERIALI E METODI

Capitolo I.....pag. 91

Capitolo II.....pag. 96

Capitolo III.....pag. 101

BIBLIOGRAFIA.....pag. 106

PREFAZIONE

Il lavoro sperimentale è stato svolto presso il laboratorio della Dott.ssa Maria Ciaramella dell'Istituto di Biochimica delle Proteine (IBP) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Napoli.

Il progetto scientifico sviluppato durante il triennio di dottorato verte principalmente sullo studio della girasi inversa termofila, una topoisomerasi atipica che rappresenta uno dei più tipici esempi dell'originalità delle macromolecole degli organismi termofili sia batteri che *Archaea*.

La tesi è così strutturata: un'introduzione generale, un sommario del lavoro svolto e i risultati sperimentali ottenuti divisi in tre capitoli; si conclude con la discussione dei dati e la descrizione dei materiali e metodi utilizzati.

SOMMARIO GENERALE

Il mio lavoro sperimentale si inquadra in un progetto più generale volto allo studio della Girasi Inversa termofila e ai processi cellulari in cui è coinvolta.

La Girasi Inversa è una topoisomerasi atipica presente esclusivamente negli organismi termofili sia batteri che *Archaea* ed è l'unico enzima noto in grado di introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA (Forterre, P., 2002). La sequenza primaria ricavata da più di 30 genomi mostra che tale enzima, costituito da circa 1050-1200 residui amminoacidici, è formato da due domini distinti fusi in un unico polipeptide. La regione N terminale contiene motivi amminoacidici conservati nelle elicasi della super famiglia 2 (SF2) tra cui il sito di legame dell'ATP (P-loop) e la "DEAD" box. Questa famiglia comprende RNA e DNA elicasi, come le eIF4A o le proteine RECQ-like (Sgs1 di *Saccaromycete Cerevisiae*, RecQ di *Escherichia coli*, RecQ1, BLM e WRN umane), coinvolte in alcuni dei più importanti processi cellulari. Esclusi i suddetti motivi elicasici, la *Girasi Inversa* non mostra significative similarità di sequenza con elicasi o altre proteine e non è stato mai dimostrato che possa svolgere attività elicasico. Il dominio C terminale mostra il 30% di identità di sequenza con le topoisomerasi di tipo 1A, una famiglia che comprende la topoisomerasi I batterica e la topoisomerasi III, altamente conservata in tutti i viventi (*Eukaria, Bacteria, Archaea*). Come le topoisomerasi di tipo IA, la porzione C-terminale della *Girasi Inversa* favorisce il rilassamento di molecole di DNA negativamente superavvolte, in assenza di ATP. I due domini cooperano per introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA in una reazione guidata da ATP. La risoluzione della struttura tridimensionale della *Girasi Inversa* dell'archeon *Archaeoglobus. fulgidus* (Rodriguez, A.C, 2002), l'unica attualmente determinata, ha confermato l'organizzazione bi-modulare dell'enzima e l'omologia strutturale dei suoi domini C ed N-terminale con le topoisomerasi e le elicasi, rispettivamente. Numerosi dati riportati in letteratura mettono in evidenza interazioni funzionali e fisiche tra le elicasi appartenenti alla famiglia RecQ e le topoisomerasi: tali complessi sono coinvolti in numerosi processi quali la replicazione, la ricombinazione ed il mantenimento della stabilità del genoma (Wu, L. et al., 1999; Harmon, F.G et al., 2003). In particolare la Topoisomerasi

III interagisce con le elicasi della famiglia RecQ e tale interazione è evolutivamente conservata: in tutti i casi riportati, un difetto in uno dei due “partners” implica una minore stabilità genomica indicando un importante ruolo cellulare di questa associazione. Nell’uomo, alterazioni nei geni che codificano per le elicasi della famiglia RecQ, WRN e BLM, causano l’insorgenza di gravi patologie come la Sindrome di Werner e la sindrome di Bloom che provocano aberrazioni cromosomiche da cui derivano invecchiamento precoce e maggiore predisposizione al cancro. La Girasi Inversa rappresenta un modello di cooperazione tra elicasi e topoisomerasi e, come tale, potrebbe essere coinvolta nel mantenimento della stabilità del genoma negli organismi ipertermofili esposti ad elevata frequenza di danni del genoma a causa dell’alta temperatura tipica del loro habitat.

Il superavvolgimento positivo è considerato un elemento chiave per l’adattamento alle alte temperature in quanto stabilizza la doppia elica prevenendo la denaturazione, e favorisce una rapida rinaturazione dopo il passaggio dei complessi trascrizionali e replicativi. Sebbene il ruolo *in vivo* della *Girasi Inversa* non sia ancora chiaro, si è ipotizzato che, data la sua peculiare presenza negli organismi termofili, possa intervenire nell’adattamento di tali organismi alla vita ad alte temperature (Forterre P., et al 1996). Recentemente, a sostegno di questa ipotesi, è stato dimostrato che l’inattivazione del gene che codifica per la Girasi Inversa dell’archaeon *Thermococcus kodakaraensis*, sebbene non sia letale, induce specificamente un rallentamento della crescita cellulare alle alte temperature. Tuttavia, studi attuali suggeriscono che tale enzima potrebbe giocare un ruolo nel mantenimento dell’integrità del genoma partecipando, direttamente o indirettamente, nel riparo e/o nella protezione del DNA.

Al fine di dare un contributo scientifico riguardo la comprensione dei sistemi utilizzati dagli organismi viventi per preservare l’integrità genomica, il mio lavoro sperimentale ha riguardato lo studio degli aspetti biochimici e funzionali della Girasi Inversa e gli eventi cellulari che la coinvolgono.

I risultati ottenuti sono stati suddivisi in tre parti che riguardano principalmente:

- Produzione e caratterizzazione della Girasi Inversa dell’archeon *Sulfolobus solfataricus* in forma nativa. Espressione eterologa, purificazione e caratterizzazione delle due

isoforme della Girasi Inversa di *S. solfataricus* *TopR1* e *TopR2*. Valutazione dell'effetto dell'espressione delle due proteine ricombinanti sulla crescita cellulare di *E. coli*.

- Studio dell'interazione fisica e funzionale tra la Girasi Inversa e la *single strand binding protein* SSB di *S. solfataricus* (Napoli et al., 2005)
- Studio degli eventi cellulari conseguenti all'induzione dei danni da alchilazione nell'archeon termofilo *solfataricus* e valutazione dell'effetto di tale danno sulla *Girasi Inversa* (Valenti et al., 2006)

Nel capitolo I è riportata la purificazione e la caratterizzazione funzionale della Girasi Inversa in forma nativa e ricombinante. Allo scopo di studiare la Girasi Inversa dell'archeon termofilo *S. solfataricus* ho isolato l'enzima da un estratto proteico di cellule di *S. solfataricus*, mediante l'utilizzo di una combinazione di tecniche cromatografiche. La Girasi Inversa nativa, avente un peso molecolare di 130 KDa è stata purificata in forma omogenea per più del 95%. Sebbene sia stata preparata un'elevata quantità di biomassa (8 litri di coltura cellulare) da cui estrarre il pool di proteina, in seguito agli step di purificazione necessari all'isolamento della Girasi Inversa, sono stati ottenuti solo 4 µg totali di proteina: questo dato suggerisce che, nella cellula, la Girasi Inversa è presente a bassi livelli. La caratterizzazione enzimatica della Girasi Inversa ha messo in evidenza che l'enzima purificato in forma attiva conserva le sue proprietà enzimatiche: in presenza di ATP è in grado di introdurre superavvolgimenti positivi del DNA ed, in assenza del cofattore, rilassa il DNA come una topoisomerasi di tipo IA. L'attività enzimatica risulta maggiore all'aumentare della temperatura (la massima attività si ottiene incubando l'enzima ad 80°C), indicando che la Girasi Inversa mantiene le caratteristiche di un enzima termofilo, la cui struttura ed attività sono favorite dalle alte temperature.

Sebbene sia stato ottenuto un enzima puro e funzionale, la scarsa quantità prodotta e la complessità delle procedure di purificazione ha evidenziato l'esigenza di esprimere la proteina in forma ricombinante in un sistema eterologo, al fine di poterne disporre di più elevate quantità necessarie alle manipolazioni sperimentali.

Nel genoma di *S. solfataricus* sono presenti due geni che codificano per due isoforme della *Girasi Inversa*, *TopR1* e *TopR2*. Non ci sono dati attualmente disponibili in letteratura

riguardo l'espressione delle due proteine in un sistema eterologo. I tentativi di clonaggio di entrambi i geni nei classici ceppi di *E. coli* utilizzati per trasformazioni di geni eterologhi, hanno dato esiti negativi. Il clonaggio dei geni TopR1 e TopR2 è stato possibile solo nel ceppo Able C che ha la caratteristica di aumentare la probabilità di acquisizione, da parte della cellula ospite, di geni tossici, attraverso la riduzione del numero di copie del plasmide. Lo stesso ceppo è stato utilizzato per l'espressione delle proteine. Le proteine TopR1 e TopR2 in forma ricombinante, sono state purificate all'omogeneità; entrambe le isoforme conservano le caratteristiche enzimatiche dell'enzima nativo.

La necessità di utilizzare il ceppo Able C che favorisce l'espressione di proteine tossiche ha suggerito l'ipotesi che l'enzima potrebbe interferire con il metabolismo cellulare dell'organismo ospite. È stato osservato, infatti, che entrambe le isoforme della Girasi Inversa sono instabili in *E. coli* e tendono facilmente a proteolizzarsi; inoltre, l'espressione eterologa delle due proteine induce un rallentamento della crescita cellulare di *E. coli*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione della Girasi Inversa in *E. coli* è dannosa, suggerendo l'ipotesi che la proteina potrebbe interferire con processi vitali per la cellula come replicazione, trascrizione o ricombinazione.

La seconda parte del mio lavoro sperimentale ha riguardato lo studio dell'interazione fisica e funzionale tra la Girasi Inversa e la *single strand binding protein* SSB di *S. solfataricus*.

La Girasi Inversa è l'unica topoisomerasi in grado di introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA: il substrato preferito per la sua attività è rappresentato da una regione a singolo filamento fiancheggiata da doppio filamento, suggerendo l'ipotesi che l'enzima necessiti di regioni parzialmente denaturate per esplicare la sua funzione. Nel lavoro sperimentale presentato nel Capitolo II, è stato dimostrato che la *DNA Single Strand Binding Protein* SSB di *S. solfataricus*, stimola l'attività di supercoiling positivo della Girasi inversa. Dall'analisi dei singoli stadi della reazione di topoisomerizzazione, è emerso che SSB, stabilizzando il DNA a singolo filamento, stimola il legame della Girasi inversa al DNA e di conseguenza tutti gli stadi successivi della reazione. Attraverso tecniche di immunoprecipitazione è stata studiata l'interazione fisica delle due proteine in estratti proteici di *S. solfataricus*. Da tali studi è emerso che le due proteine interagiscono fisicamente in presenza di DNA, ma non mediante interazioni dirette proteina-proteina. È stato inoltre dimostrato che SSB stimola

L'attività di *supercoiling* positivo della *Girasi Inversa* anche in presenza della proteina cromosomale Sul7d che invece ha un effetto inibitorio sulla stessa attività. Da tali risultati si può ipotizzare che la modulazione dell'attività della *Girasi Inversa* mediante le due *DNA binding proteins* potrebbe giocare un ruolo nella regolazione delle dinamiche conformazionale della cromatina durante i molteplici processi metabolici del DNA. Infine è stato dimostrato che SSB stimola il legame della *Girasi inversa* al DNA contenente lesioni indotte da UV, suggerendo l'ipotesi che l'interazione funzionale tra le due proteine potrebbe avere una rilevanza biologica nella risposta ai danni indotti da UV..

Il ruolo della *Girasi Inversa* negli organismi termofili non è ancora chiaro, tuttavia è stato dimostrato che l'enzima, *in vitro*, stabilizza il DNA contro la denaturazione termica inoltre, in precedenza, studi effettuati nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che la *Girasi Inversa* viene reclutata al DNA dopo esposizione alle radiazioni ultraviolette. Tali studi fanno ipotizzare un potenziale coinvolgimento dell'enzima nel mantenimento della stabilità del genoma e nella risposta al danno al DNA.

La terza parte del mio lavoro sperimentale s'inquadra in un progetto volto allo studio degli eventi cellulari conseguenti all'induzione dei danni da alchilazione nell'archeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* e alla valutazione dell'effetto di tale danno sulla regolazione dell'enzima *Girasi Inversa*. Gli agenti alchilanti sono dannosi agenti genotossici che, mediante l'alchilazione delle basi del DNA, ne compromettono la biosintesi e la normale funzionalità. I risultati riportati nel Capitolo III hanno dimostrato che, in *S. solfataricus*, il trattamento delle cellule con l'agente alchilante Methyl methanesulfonato (MMS), induce specificamente la degradazione della *Girasi Inversa*, probabilmente mediata da una proteasi metallo-dipendente. Parallelamente alla scomparsa dell'enzima si osserva la degradazione del DNA genomico e la morte cellulare. I dati riportati, valutati nel loro complesso, sostengono l'ipotesi di un potenziale coinvolgimento della *Girasi Inversa* nelle intricate e ancora poco conosciute vie della risposta al danno al DNA in *S. solfataricus*..

INTRODUZIONE

1. Gli *Archaea*: un utile sistema modello...sorprendentemente originale

Gli *Archaea* sono stati identificati come “il terzo dominio dei viventi” (Woese et al., 1990). Suddivisi in quattro phyla principali (crenarchaeota, euryarchaeota, korarchaeota e nanoarchaeota), presentano una morfologia cellulare procariotica con assenza di strutture nucleari, citoscheletro e organelli (Edgell and Doolittle, 1997; Olsen and Woese, 1997).

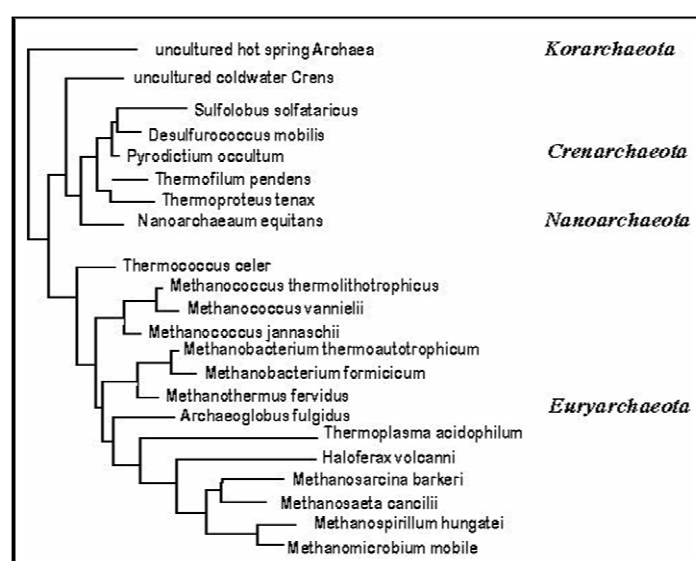


Fig. 1: Albero filogenetico del dominio archaeale.

Tuttavia, la sequenza completa del genoma di molte specie archeobatteriche indica che i complessi molecolari coinvolti in processi quali replicazione, trascrizione, riparazione, e ricombinazione del DNA sono costituiti da fattori proteici più simili a quelli eucariotici che non batterici. Ad esempio, nell'archaeon termofilo *S. solfataricus*, sono stati identificati geni omologhi ai fattori eucariotici coinvolti nel sistema riparativo NER (Riparazione per escissione di nucleotidi) come le elicasi XPB e XPD, e le nucleasi XPG e XPF. Nel nostro laboratorio è stato dimostrato che i livelli di trascrizione di tali geni variano in seguito a danni da UV (Salerno et al. 2003). Più di recente è stata studiata la relazione tra trascrizione e cinetica di riparo in seguito a lesioni indotte da UV in *S. solfataricus* (Romano et al 2006).

Queste ed altre evidenze sperimentali fanno degli *Archaea* un modello semplificato da cui attingere informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA.

Molte specie archeali sono in grado di vivere in condizioni estreme di temperatura, salinità o pH: tali caratteristiche hanno destato notevole interesse riguardo la comprensione dell'organizzazione molecolare e degli eventi biologici correlati con la sopravvivenza alle condizioni estreme. In particolare gli *Archaea* ipertermofili suscitano un grande interesse per l'analisi dei meccanismi di stabilizzazione del DNA e delle proteine a condizioni che sfidano quelle che potevano essere chiamate "leggi biologiche" fino a non molti anni fa. Uno dei più tipici esempi dell'originalità delle macromolecole dei suddetti organismi è rappresentato dalla *Girasi Inversa*, una topoisomerasi atipica presente esclusivamente negli organismi termofili, la cui funzione risulta ancora sconosciuta: tuttavia si ipotizza che la sua capacità di introdurre superavvolgimenti positivi del DNA potrebbe giocare un ruolo nel mantenimento della stabilità del genoma prevenendo la denaturazione termica (Forterre et al. 2002).

2. Le topoisomerasi e la regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA

La topologia del DNA influenza processi metabolici fondamentali e le DNA topoisomerasi costituiscono una classe di enzimi che regolano le dinamiche conformazionali del DNA in tutte le specie viventi.

Cambiamenti nella topologia del DNA sono richiesti per tutti i processi DNA-dipendenti quali replicazione, trascrizione, ricombinazione, riparazione del DNA, rimodellamento della cromatina, condensazione e segregazione dei cromosomi. Ad esempio, superavvolgimenti negativi liberi possono favorire la formazione del complesso aperto dell'RNA polimerasi o della DNA polimerasi e quindi la trascrizione e la replicazione. Allo stesso tempo, gli eventi trascrizionali e replicativi possono cambiare la topologia del DNA in seguito al movimento delle polimerasi che generano superavvolgimenti positivi a valle e negativi a monte del loro procedere per cui le topoisomerasi risultano indispensabili per la riduzione degli stress torsionali generati in seguito al passaggio dei suddetti complessi.

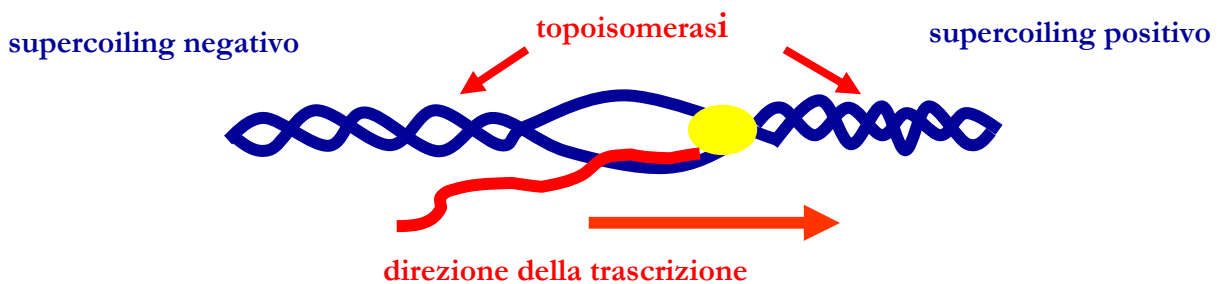


Fig. 2: Rappresentazione schematica della bolla di trascrizione: il passaggio dei complessi trascrizionali favorisce l'introduzione di superavvolgimenti negativi e positivi, rispettivamente a monte e a valle della bolla di trascrizione. Le topoisomerasi rilassano le tensioni torsionali generate.

Tali evidenze suggeriscono che i processi fondamentali che coinvolgono il DNA e i cambiamenti topologici della doppia elica sono reciprocamente influenzati, fornendo così un meccanismo di regolazione basato sulla modulazione del grado di superavvolgimento del DNA.

Le topoisomerasi favoriscono variazioni permanenti del grado di superavvolgimento del DNA mediante la rottura e la risaldatura covalente di uno o entrambi i filamenti. Sono classificate in base a struttura e meccanismo d'azione: gli enzimi di tipo I sono generalmente monomerici, interrompono il singolo filamento e favoriscono il rilassamento di molecole di DNA superavvolte. Le topoisomerasi di classe II sono costituite da due o più subunità, tagliano il DNA su entrambi i filamenti e, anch'esse rilassano il DNA. Tuttavia in questo caso la reazione di srotolamento, nonostante sia energeticamente favorita, richiede l'idrolisi di ATP, probabilmente per favorire cambiamenti conformazionali dell'enzima nel suo stato attivo (Bates e Maxwell, 1993). Le DNA topoisomerasi, quindi, eliminano le tensioni torsionali del DNA rilassando superavvolgimenti sia negativi che positivi. Tuttavia ci sono due DNA topoisomerasi che mostrano un'attività peculiare, in quanto sono in grado di introdurre superavvolgimenti nel DNA in una reazione ATP- dipendente: queste sono la DNA girasi batterica, che introduce superavvolgimenti negativi del DNA e la *Girasi Inversa* dei termofili che introduce superavvolgimenti positivi (Duguet, 1995). Mentre la funzione della Girasi nei batteri è stata chiaramente dimostrata (è essenziale per il mantenimento del supercoiling fisiologico), negli organismi termofili il ruolo della Girasi Inversa ancora non è chiaro.

Plasmidi estratti da organismi termofili risultano superavvolti positivamente, per cui si è ipotizzato che la Girasi Inversa potrebbe essere responsabile dell'induzione di tale stato topologico.(Fig. 2)

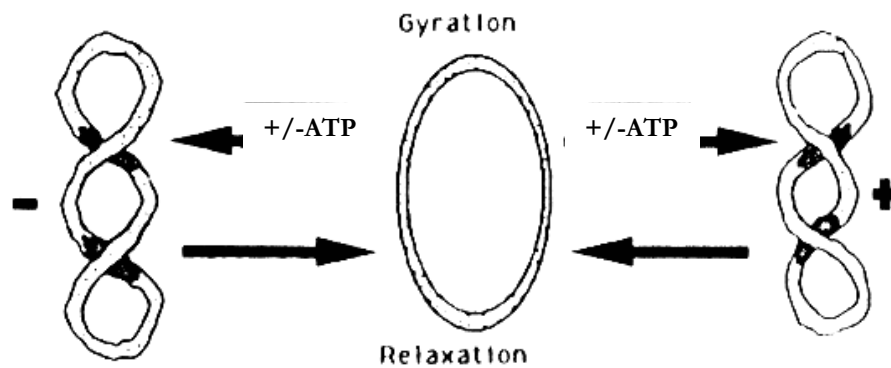


Fig. 2: Rappresentazione schematica dei differenti stati topologici del DNA e delle reazioni catalizzate dalle varie DNA topoisomerasi (Forterre e Elie, 1993).

Durante ogni reazione di topoisomerizzazione, in seguito al taglio del DNA si forma un complesso covalente transiente tra l'enzima e il DNA: la mancata risoluzione dell'intermedio induce rotture persistenti nella doppia elica che possono provocare, nella cellula, gravi danni fino a favorire la morte cellulare, per cui enzimi essenziali per la cellula possono trasformarsi in agenti letali. Questa ambivalenza viene sfruttata nei trattamenti antitumorali basati sull'utilizzo di inibitori specifici delle topoisomerasi, quali ad esempio la *camptotecina*, le antracicline e il *topotecan* che incrementano la formazione di complessi covalenti DNA-topoisomerasi e determinano la morte preferenziale delle cellule in attiva proliferazione.

3. *La Girasi Inversa*

La *Girasi Inversa* rappresenta uno dei più tipici esempi dell'originalità delle macromolecole presenti negli organismi ipertermofili (D'Amaro et al., 2007; Nadal et al., 2007).

Dall'analisi filogenetica dei genomi sequenziati è emerso che il gene che codifica per la *Girasi Inversa* è l'unico termofilo-specifico attualmente identificato: esso è infatti presente in tutti gli organismi che vivono a temperature superiori agli 80°C (ipertermofili) ed in molti, anche se non in tutti batteri e archaea termofili (le cui condizioni ottimali di crescita sono comprese tra i 65 e gli 80°C). Essa è invariabilmente assente in tutti i genomi di organismi mesofili (Forterre et al., 2007)

La presenza della *Girasi Inversa* negli eubatteri suggerisce la possibilità di un trasferimento genico laterale dagli Archaea a questi ultimi essenziale per il loro adattamento alle alte temperature (Nadal; 2007).

La *Girasi Inversa* è una topoisomerasi unica nella sua struttura e funzione. La sequenza primaria ricavata da più di 30 genomi ha messo in evidenza che tale enzima, costituito da circa 1050-1200 residui amminoacidici, è formato da due domini distinti fusi in un unico polipeptide. La regione N-terminale contiene brevi motivi di sequenza conservati nelle elicasi della super famiglia 2 (SF2) come il sito di legame dell'ATP (P-loop) e la "DEAD" box (Menzel R., et al 1983). Tale famiglia comprende molte RNA e DNA elicasi come le eIF4A o le proteine RECQ-like (Sgs1 di *S. cerevisiae*, RecQ di *E.coli*, RecQ, BLM e WRN umane), coinvolte nei più importanti processi cellulari. Esclusi i suddetti motivi elicasici, la *Girasi Inversa* non mostra delle significative similarità di sequenza con altre elicasi o proteine e non è stato mai dimostrato che possa svolgere attività elicasica.

Il domino C-terminale mostra il 30% di identità di sequenza con le topoisomerasi di tipo IA, che comprendono la topoisomerasi I batterica e la topoisomerasi III altamente conservata nei tre domini viventi (*Eucaria*, *Bacteria*, *Archaea*). Tale regione contiene una tirosina conservata nel sito catalitico essenziale per l'attività delle topoisomerasi di tipo IA e, all'estremità N-terminale, un dominio che lega lo ione zinco implicato nel legame al

DNA. Come le topoisomerasi di tipo IA, il dominio C-terminale favorisce il rilassamento di molecole di DNA negativamente superavvolte, in assenza di ATP.

La risoluzione della struttura tridimensionale della *Girasi Inversa* di *A. fulgidus* (Rodriguez and Stock, 2002; Fig.3.1), l'unica attualmente determinata, ha confermato l'organizzazione bi-modulare dell'enzima e l'omologia strutturale dei suoi domini C ed N-terminale con le topoisomerasi e le elicasi, rispettivamente.

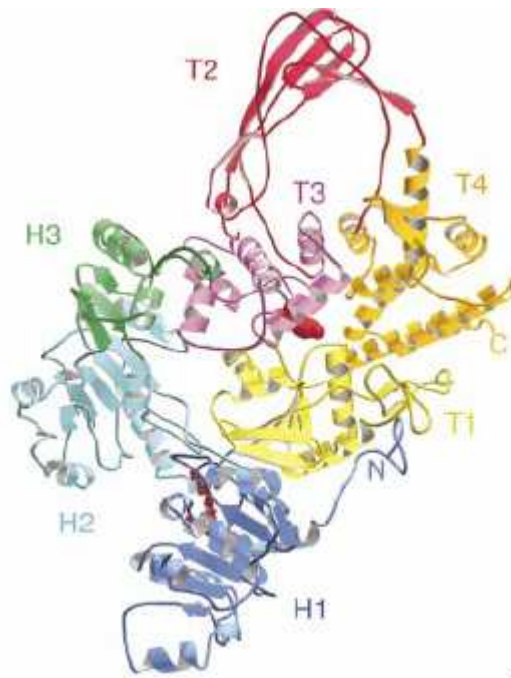


Fig.3.1: Struttura cristallografica della *Girasi Inversa* di *Archaeoglobus fulgidus* (Rodriguez and Stock, 2002).

I due domini, in una reazione guidata da ATP, cooperano per effettuare un cambio topologico nella doppia elica: l'introduzione di superavvolgimenti positivi. Il superavvolgimento positivo è considerato un elemento chiave per l'adattamento alle alte temperature, in quanto stabilizza la doppia elica prevenendo locali aperture e favorisce una rapida rinaturazione dopo il passaggio dei complessi trascrizionali e replicativi. Sebbene il ruolo *in vivo* della *Girasi Inversa* non sia ancora chiaro, si è ipotizzato che, data la sua peculiare presenza negli organismi termofili, possa intervenire nell'adattamento di tali organismi alla vita alle alte temperature (Forterre 2002): tale ipotesi è attualmente oggetto di dibattito tra gli scienziati. Recentemente, a sostegno di questa ipotesi, è stato dimostrato che l'inattivazione del gene che codifica per la Girasi Inversa di *Thermococcus*

kodakaraensis induce specificamente un rallentamento della crescita cellulare alle alte temperature (Atomi et al 2004), sebbene non sia letale. Inoltre ci sono evidenze che l'enzima, *in vitro*, previene la denaturazione termica del DNA e induce l'aggregazione del doppio filamento (Kampmann, M. and Stock, D. 2004). Recentemente è stato riportato che la *Girasi Inversa* potrebbe essere coinvolta nella risposta al danno al DNA. A conferma di questa ipotesi esperimenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che, in *S. solfataricus*, la *Girasi Inversa* viene specificamente reclutata sul DNA dopo esposizione delle cellule alle radiazioni UV (Napoli et al 2004) e che viene degradata in modo specifico, in seguito all'induzione di danni da alchilazione (Valenti et al., 2006; Capitolo III). Tali studi sostengono l'ipotesi che la *Girasi Inversa* potrebbe essere coinvolta, direttamente o indirettamente, nel riparo e/o nella protezione del DNA.

Abbiamo inoltre dimostrato che la *Girasi Inversa* interagisce fisicamente con la single strand binding protein SSB sia *in vivo* che *in vitro* e la sua attività di supercoiling positivo viene stimolata da SSB e inibita da Sul7d (un altro componente della cromatina di *S. solfataricus*). Questi studi suggeriscono l'ipotesi che, *in vivo*, lo stato topologico del DNA potrebbe essere regolato mediante la modulazione dell'attività della *Girasi Inversa* da parte dei componenti della cromatina (Napoli et al., 2005; Capitolo II).

E' importante osservare che la *Girasi Inversa*, rappresenta un modello di cooperazione tra due classi di enzimi essenziali, le: topoisomerasi e le elicasi. Numerosi dati riportati in letteratura mettono in evidenza interazioni funzionali e fisiche tra le elicasi appartenenti alla famiglia RecQ e le topoisomerasi: tali complessi sono coinvolti nel mantenimento della stabilità del genoma (Wu *et al.* 1999; Harmon *et al.* 2003). In particolare la Topoisomerasi III interagisce con le elicasi della famiglia RecQ e tale interazione è evolutivamente conservata: in tutti i casi riportati, un difetto in uno dei due implica una minore stabilità genomica indicando un importante ruolo cellulare di questa associazione (T.J. Oakley T. J. *et al.* 2002; Wallis J.W. *et al.* 1989). In lievito, ceppi mutanti nel gene della Topoisomerasi III mostrano un rallentamento della crescita cellulare e difetti nella ricombinazione: tale fenotipo viene soppresso dalla delezione del gene che codifica per l'elicasi Sgs1. E' stato dimostrato che, nell'uomo, alterazioni nei geni che codificano per le elicasi WRN e BLM causano l'insorgenza di gravi patologie come la sindrome di

Werner e la sindrome di Bloom che provocano aberrazioni cromosomiche, invecchiamento precoce e maggiore predisposizione al cancro (Watt,P.M. and Hickson,I.D. 1996).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, è stato dimostrato che la Girasi Inversa lega preferenzialmente zone a singolo filamento fiancheggiate da zone a doppio filamento (Rodriguez, A.C. 2002): tale dato suggerisce che l'enzima necessita di zone parzialmente denaturate per legarsi e svolgere la sua attività topoisomerasica. Nel modello precedentemente accreditato sulla base delle similarità di sequenza si era ipotizzato che il dominio N-terminale, potesse funzionare da elicasi favorendo l'apertura dell'elica e la traslocazione dell'enzima lungo il DNA, che genererebbe superavvolgimenti negativi e positivi, rispettivamente, a monte e a valle del suo passaggio. Il dominio topoisomerasico rilasserebbe i superavvolgimenti negativi ma non quelli positivi e, dall'azione combinata dei due domini, si otterrebbe, quindi, un aumento netto del numero di legame del DNA (Duguet, 1997). Saggi di attività elicasica effettuati sulla Girasi Inversa o sulla sua porzione N-terminale (Declais *et al.*, 2000) non hanno tuttavia dimostrato attività elicasica, mettendo in dubbio tale modello. Il modello attualmente più accreditato (Fig.3.2), basato sulla struttura cristallografica dell'enzima, (Rodriguez and Stock, 2002), ipotizza che il dominio N-terminale sia in grado di generare locali aperture del DNA ma non abbia attività di elicasi e capacità di traslocazione sulla doppia elica. Le locali aperture favorirebbero il taglio sul singolo filamento seguito dalla formazione del complesso covalente enzima-DNA. Si suppone, inoltre, che il legame della *Girasi Inversa* al DNA induca una modificazione conformazionale dell'enzima nello stato aperto che potrebbe favorire il passaggio del filamento di DNA attraverso il taglio: il movimento del filamento è orientato in modo tale da introdurre un giro in più nell'elica. In seguito, nello step di riligazione i filamenti vengono risaldati e il prodotto della reazione (una molecola di DNA con un aumentato numero di legame), viene rilasciato.

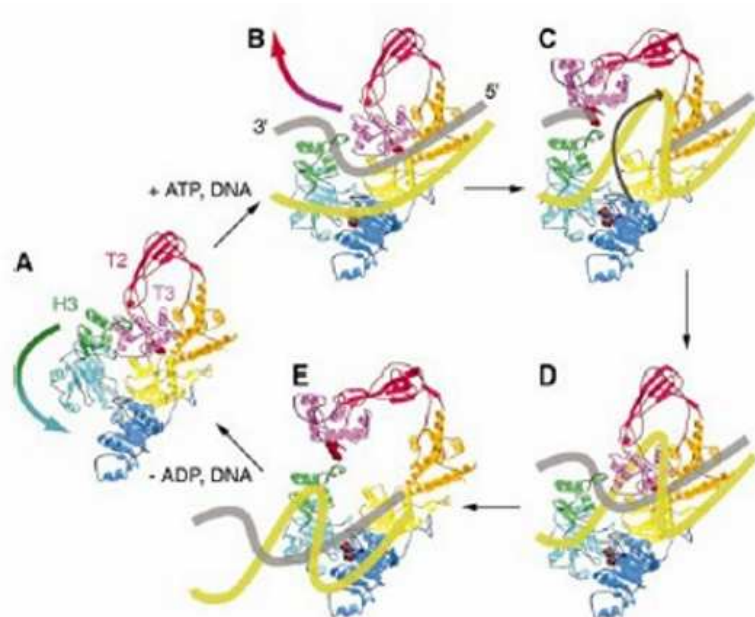


Fig. 3.2. Putativo meccanismo d'azione della girasi inversa (Rodriguez and Stock, 2002).

I modelli attualmente proposti sono solo putativi e rimangono alcuni punti poco chiari.

I) in che modo l'associazione dei due domini sia in grado di svolgere un'attività così complessa e originale; II) il ruolo del *supercoiling positivo* nel metabolismo cellulare dei termofili e III) il presupposto per cui tale attività sia stata identificata solo nei suddetti organismi.

4. La topologia del DNA *in vivo*

Mentre il DNA degli eucarioti e degli archaea mesofili è superavvolto negativamente, il DNA degli ipertermofili presenta delle caratteristiche topologiche distintive: si presenta rilassato o addirittura superavvolto positivamente (Forterre et al., 1996). La spiegazione più plausibile di questo fenomeno è che in tal modo questi organismi prevengono la denaturazione localizzata del DNA alle alte temperature alle quali vivono. Questa ipotesi sembra confermata da due osservazioni: estraendo plasmidi da batteri con differenti temperature ottimali di crescita, si osserva che il grado di superavvolgimento negativo dei plasmidi diminuisce con l'aumento della temperatura di crescita dell'organismo (Charbonnier *et al.*, 1994); (**Fig. 4**).

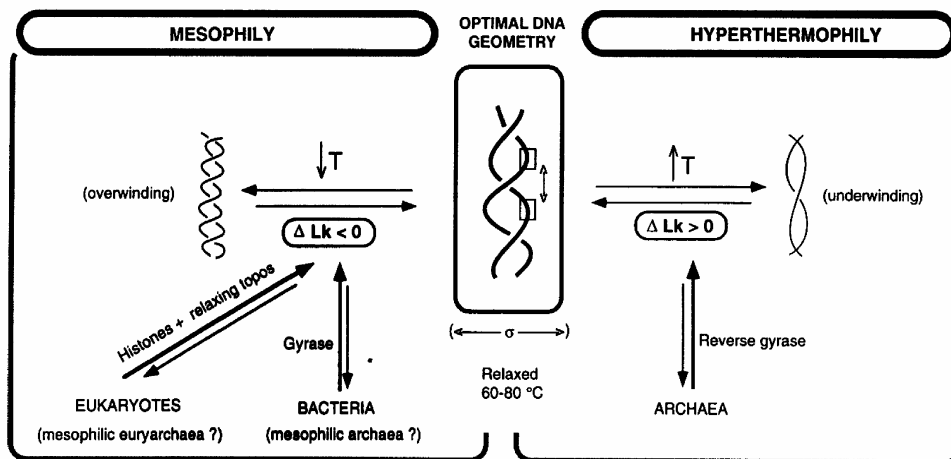


Fig. 4: Ipotesi del controllo omeostatico della geometria del DNA. Gli organismi viventi hanno sviluppato differenti strategie per modificare la topologia del DNA (ΔLk) per compensare l'effetto delle variazioni di temperatura (T) (Lopez-Garcia, 1999).

Inoltre il gene della *Girasi Inversa* rappresenta l'unico gene termofilo-specifico finora identificato (Forterre *et al.*, 2000, 2006) per cui si è ipotizzato che l'enzima sia necessario alla vita ad alta temperatura.

Il DNA è condensato fino a 10^3 volte in una cellula procariotica e fino a 10^5 volte in una cellula eucariotica. Sicuramente un meccanismo comune a tutti gli organismi viventi è il superavvolgimento, visto che un DNA superavvolto sia positivamente che negativamente, risulta più compatto del DNA rilassato. Nei vari organismi il superavvolgimento rappresenta un meccanismo di base della condensazione e viene ottenuto con meccanismi diversi, quali l'avvolgimento del DNA intorno agli istoni, la presenza di proteine "histone like", l'effetto delle topoisomerasi come la girasi batterica (che superavvolge negativamente il DNA) e la *Girasi Inversa* termofila. Al superavvolgimento si aggiungono poi meccanismi specifici adottati dai diversi organismi grazie ad elementi della propria cromatina.

5. Parametri topologici del DNA

Nella doppia elica e i due filamenti si avvolgono attorno ad un asse centrale formando un'elica destrorsa. In questo modo ogni filamento incrocia l'altro ogni 10.5 pb. Il numero di legame (LK) indica il numero complessivo di volte in cui i due filamenti si incrociano nel piano o nello spazio (Fig. 5.1). E' costituito da due parametri: il twist (Tw), che rappresenta il numero di volte che un filamento incrocia l'altro (numero di giri dell'elica: numero di bp/N di bp per passo dell'elica; ha segno positivo se elica è destrorsa) e il writhe (Wr) che rappresenta il numero di volte in cui l'asse della doppia elica incrocia sé stesso nello spazio (superavvolgimenti). In una molecola di DNA covalentemente chiusa si verifica l'equazione:

$$Lk = Tw + Wr$$

In una molecola di DNA rilassato $Tw=0$ e $Wr=0$ per cui il numero di legame sarà uguale a 0 ($LK=0$ o LK_0)

Il numero di legame può cambiare solo mediante rottura e riformazione dei legami fosfodiesterici tra le basi di una o entrambe le eliche. L'entità di cambiamento è data dalla differenza di LK con LK_0 secondo l'equazione

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr = Lk - Lk_0$$

Tale valore può essere negativo se si ha l'introduzione di superavvolgimenti negativi e/o minor numero di avvitementi dell'elica; o positivo se si ha l'introduzione di superavvolgimenti positivi e/o maggior numero di avvitementi dell'elica.

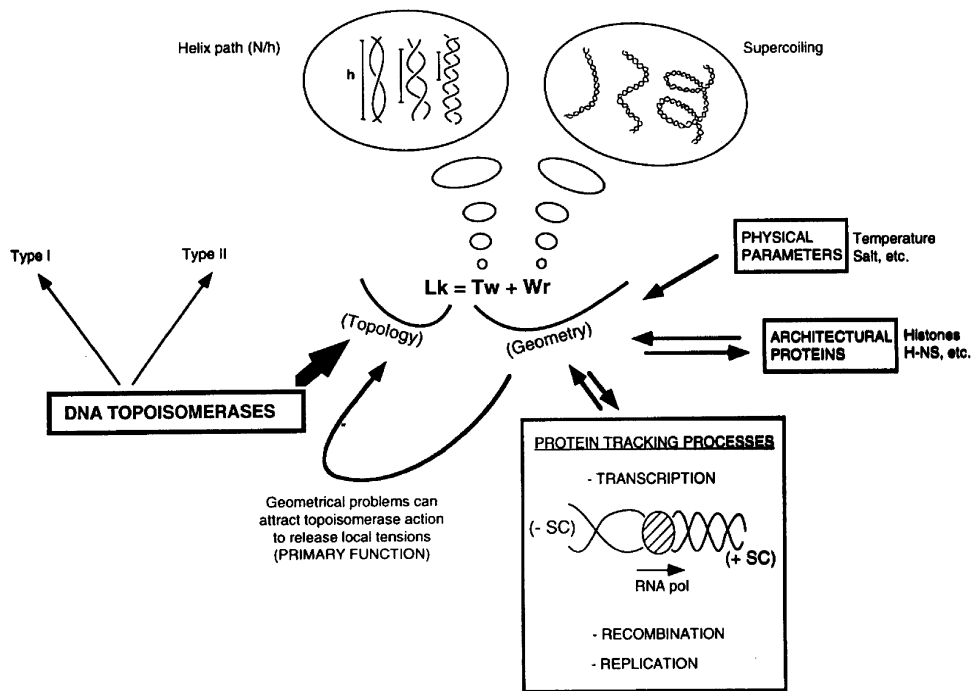


Fig. 5.1: Fattori che influenzano i parametri geometrici e topologici del DNA, in relazione all'equazione centrale $Lk = Tw + Wr$. -SC:negative supercoiling; +SC: positive supercoiling (Lopez-Garcia, 1998).

Una molecola di DNA superavvolta è soggetta ad una certa tensione, ma a parità del numero di superavvolgimenti (Wr) la tensione sarà tanto maggiore quanto più la molecola è piccola perché la tensione viene ripartita su un minor numero di basi. Per questo motivo normalmente il numero dei superavvolgimenti viene normalizzato rispetto al numero di basi definendo la differenza specifica del numero di legame (σ) che viene usata per rapportare la tensione in molecole di DNA di diversa lunghezza.

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

dove Lk_0 corrisponde al Tw per una determinata molecola e cioè al numero di giri d'elica teorici (Store e Baldwin, 1983).

L'aspetto fondamentale del numero di legame è che questo parametro è una proprietà invariabile in una molecola chiusa di DNA, e per questo ogni cambio nel Tw deve essere accompagnato da un uguale ed opposto cambio nel Wr e viceversa. Questo è particolarmente importante se si considera l'interazione tra DNA e proteine: molte

proteine che legano il DNA possono influenzarne la conformazione inducendo deformazioni strutturali di vario tipo (*unwinding, overwinding, bending, etc.*). Tuttavia, in nessun caso il legame di queste proteine può modificare il Lk, ma solo il Tw, provocando un cambio di uguale intensità ma di segno opposto nel Wr (o viceversa) (Fuller, 1978). La variazione permanente del numero di legame del DNA in una molecola chiusa richiede la rottura e risaldatura dei legami covalenti.

Per quanto riguarda le implicazioni funzionali delle variazioni topologiche del DNA bisogna sottolineare che un DNA superavvolto negativamente presenta un numero di giri d'elica inferiore alla corrispondente molecola lineare, e rappresenta una forma più suscettibile alla denaturazione poiché l'energia richiesta per la separazione delle due eliche è minore. Questa proprietà facilita processi che necessitano della denaturazione, come replicazione, trascrizione e ricombinazione. Al contrario quando il DNA è superavvolto positivamente presenta più giri d'elica della corrispondente molecola lineare, per cui risulta più resistente alla denaturazione e quindi più stabile.

6. Le proteine implicate nella regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA

Oltre alle topoisomerasi, altri componenti essenziali implicati nella regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA sono le proteine che legano il DNA in modo non sequenza-specifico: istoni e proteine simili (*histone-like*).

Negli *Archaea*, la cromatina presenta due distinti sistemi di organizzazione. Gli *Euryarchaea* presentano le proteine HMf e HTa, rispettivamente isolate da *Methanothermus fervidus* e *Thermoplasma acidophilum*, probabilmente coinvolte nel compattamento del DNA.

Nei *Crenarchaeota* (come ad esempio *Sulfolobus*) finora caratterizzati sono state isolate piccole proteine strutturali abbondanti che legano il DNA, quali Alba e le proteine della famiglia Sul7d. Alba è una proteina molto abbondante (rappresenta il 4-5% delle proteine totali), lega il DNA a doppio filamento e non mostra preferenze per specifiche sequenze di DNA (Xue *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 2002). Studi di spettrometria di massa su Alba purificata hanno dimostrato che questa proteina si presenta in forma acetilata:

l'acetilazione induce variazioni delle proprietà di legame al DNA: la forma acetilata mostra una ridotta affinità di legame al DNA. Inoltre è stato dimostrato che tale proteina, funziona come repressore generalizzato della trascrizione. (Bell *et al.*, 2002).

Un'altra proteina piccola e abbondante che interagisce con il DNA in *S. solfataricus* è Sul7d. Tale proteina cromosomale stabilizza la doppia elica opponendosi alla denaturazione termica, promuove l'appaiamento dei filamenti di DNA complementari al di sopra del punto di fusione della doppia elica (Guagliardi *et al.*, 1997), induce ripiegamenti sul DNA, la compattazione e superavvolgimenti negativi (Napoli *et al.*, 2002). La struttura tridimensionale di Sul7d da sola (Baumann *et al.*, 1995) e complessata con il DNA (Robinson *et al.*, 1998) è stata risolta all'NMR e ai raggi X, dimostrando che il legame di questa proteina altera la conformazione del DNA inducendo curvatura e svolgimento dell'elica. E' stato inoltre dimostrato che Sul7d inibisce l'attività di superavvolgimento positivo della girasi inversa e che questa inibizione è inversamente proporzionale alla temperatura. Tale inibizione potrebbe avere un ruolo nel controllo della topologia nei *Sulfolobales*, nei quali alle più alte temperature è necessario che il DNA aumenti i superavvolgimenti positivi al fine di contrastare l'effetto denaturante della temperatura: l'effetto inibitorio di Sul7d deve essere annullato e la girasi inversa deve funzionare attivamente (Napoli *et al.*, 2002).

Mentre Sul7d è una proteina molto abbondante, poco abbondante risulta Smj12, un'altra piccola proteina che lega il DNA e, in contrasto con quelle fino ad ora citate, induce superavvolgimenti positivi (Napoli *et al.*, 2001). Smj12 è un membro della famiglia conservata di proteine *Helix-turn-helix* ed è stato ipotizzato che potrebbe essere coinvolta nel mantenimento del superavvolgimento positivo locale durante la replicazione, la ricombinazione e il riparo.




Un'altra proteina abbondante in *S. solfataricus* è la *single strand binding protein* SSB; tale proteina interagisce con l'RNA polimerasi stimolando la trascrizione *in vitro*, induce la denaturazione di regioni ricche in AT ed interferisce con la repressione della trascrizione mediata da Alba (Richard *et al.*, 2004). Inoltre SSB stimola l'attività dell'elicasi replicativa MCM di *S. solfataricus*, e le due proteine interagiscono anche fisicamente (Carpentieri *et al.*, 2002).

7. Agenti genotossici: il danno e il riparo

L'integrità genomica può essere compromessa sia da agenti di natura endogena, quali specie reattive dell'ossigeno ed altri intermedi del metabolismo cellulare, oltre che dall'infedeltà delle polimerasi durante la replicazione del DNA, sia da agenti di natura esogena, quali radiazioni ultraviolette, ionizzanti e agenti chimici.

Lesioni al DNA possono interferire con i processi di trascrizione e replicazione dando origine a mutazioni e aberrazioni cromosomiche che possono causare, negli organismi superiori, patologie congenite, cancro e morte cellulare. Per prevenire l'insorgenza di tali alterazioni, l'evoluzione ha equipaggiato gli organismi con un'intricata rete di vie riparative che coinvolge complessi sistemi in grado di riconoscere ed eliminare molti tipi di lesione.

I numerosi e vari meccanismi enzimatici di riparazione possono essere classificati in varie classi in base al loro meccanismo d'azione:

-  riparazione diretta: implica la reversione o la semplice rimozione del danno. Un tipico esempio è rappresentato dalle metiltransferasi che fungono da proteine accettrici del gruppo alchilico legato ai siti nucleofili delle basi azotate o dello scheletro zucchero-fosfato
-  riparazione ricombinativa (RER): implica lo scambio di materiale genetico tra i cromosomi omologhi ad opera di proteine (RecA/RadA) altamente conservate in tutti e tre i domini della vita (Aravind *et al.*, 1999b);
-  riparazione per escissione: include essenzialmente tre diverse vie riparative: NER (riparo per escissione di nucleotidi), BER (riparo per escissione di basi) e MMR (correzione dell'appaiamento errato) che ripristinano l'integrità genomica mediante un meccanismo di “taglia e cuci”, che rimuove la sequenza comprendente il danno e successivamente ricostituisce la regione recisa mediante la sintesi di un nuovo frammento (Aravind *et al.*, 1999b; Cline & Hanawalt, 2003).

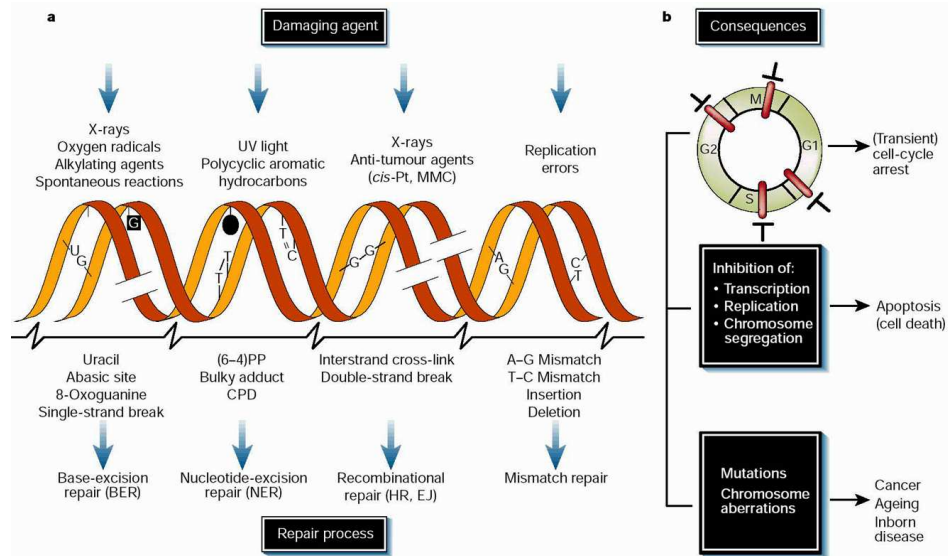


Fig. 7.1: Principali lesioni che ledono l'integrità genomica con i relativi sistemi di riparazione e le relative conseguenze biologiche

Negli *Archaea* sono stati identificati geni omologhi ai fattori eucariotici del sistema riparativo NER come le elicasi XPB e XPD, e le nucleasi XPG e XPF, ma anche geni coinvolti nel BER e nel riparo per ricombinazione (Aravind et al., 1999). Sebbene alcuni di questi geni siano stati caratterizzati sia dal punto di vista biochimico che da quello strutturale (Kelman et al., 2005 White et al 2003), non è del tutto chiarita la loro implicazione funzionale nelle vie riparative (Rudolf *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2006). Tuttavia è stato dimostrato che nel *crenarchaeon S. solfataricus*, l'esposizione alla luce UV induce un aumento considerevole dei livelli trascrizionali del gene SsXpb-I e un moderato incremento trascrizionale dei geni SsXpf ed SsXpg (Salerno *et al.*, 2003), suggerendo così un loro eventuale coinvolgimento nei sistemi di riparazione. Negli eucarioti alcune di queste proteine sono coinvolte anche in altre funzioni cellulari; ad esempio, XPG riveste un ruolo centrale nel processamento dei frammenti di Okazaki e nel BER, mentre XPB ed XPD fanno parte del fattore trascrizionale TFIIF e quindi coinvolte oltre che nel NER anche nell'inizio della trascrizione.

8. I danni da alchilazione

Gli agenti alchilanti sono composti genotossici dotati di un elevato potere mutagenico, cancerogenico e citotossico, e questa proprietà è sfruttata nel trattamento di molte forme di cancro. Costituiscono la classe di antitumorali più antichi e comprendono un'ampia varietà di farmaci accomunati dalla loro capacità di alchilare i siti nucleofili, quali gruppi amminici, sulfidrilici ed atomi di ossigeno, presenti nelle macromolecole biologiche (DNA, RNA, lipidi e proteine). Sebbene questi composti siano in grado di indurre danni a tutti i costituenti cellulari, i loro principali effetti biologici, quali citotossicità e mutagenesi, sono ascrivibili principalmente alle lesioni inflitte al DNA. Gli agenti alchilanti possono reagire con il DNA direttamente o attraverso composti secondari derivanti dall'attivazione metabolica o dalla degradazione chimica spontanea delle sostanze originarie. I principali target nel DNA sono gli atomi di ossigeno e di azoto presenti nelle basi puriniche/pirimidiniche e gli atomi di ossigeno nello scheletro fosfodiesterico da cui si possono originare ben 12 differenti addotti. La quantità relativa di ciascun addotto dipende maggiormente dalla natura chimica del composto ma anche dalla reattività del sito target: le posizioni N7 ed O6 della guanina e N3 dell'adenina rappresentano i principali siti bersagli degli agenti alchilanti, anche se la reattività di ciascuna base è influenzata dalla sequenza in cui è posta; ad esempio basi puriniche fiancheggiate da altre basi puriniche sono generalmente più danneggiate.

Gli agenti alchilanti sono ubiquitari: sono prodotti durante il normale metabolismo cellulare oppure si trovano negli alimenti, nell'acqua e nell'aria, seppure a concentrazioni molto basse. Tra i composti endogeni quello meglio caratterizzato è l'S-adenosilmetionina, un donatore di metili implicato in molte reazioni biochimiche che funge anche da debole agente alchilante inducendo lesioni al DNA, quali 7-meG e 3-meG (Rydberg & Lindahl, 1982). Potenti mutageni, quali nitrosammine e idrossilammine sono sintetizzati nell'uomo come risultato dei normali processi metabolici e spesso in considerevoli quantità (Marnett & Burcham, 1993). Alle fonti endogene si aggiungono quelle esogene, quali fumo di sigaretta, scarichi industriali, prodotti utilizzati in agricoltura e chemioterapici.

Nella chemioterapia si utilizzano principalmente agenti bifunzionali capaci di reagire con due siti nucleofili contemporaneamente, generando così legami crociati tra due catene di DNA o all'interno della stessa catena (es. tomozolamide e streptozotocina, le nitrosouree come la carmustina, lomustina e fotomustina o le mostarde azotate come la ciclofosfamide e il clorambucile); le lesioni risultanti interferiranno sia con la trascrizione sia con la replicazione.

Gli agenti alchilanti, in generale, si possono suddividere in due classi in base alla reazione chimica che porta all'alchilazione del target:

Monofunzionali (come il metilmetansulfonato, MMS) possiedono un gruppo alchilico che viene trasferito principalmente agli atomi di azoto mediante una reazione di tipo S_N2 ;

Bifunzionali (come l'N-metil-N-nitrosourea, MNU, e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, MNNG) possiedono due gruppi alchilici che possono essere trasferiti sia ad atomi di ossigeno sia di azoto mediante una reazione di tipo S_N1

Al fine di preservare l'integrità cellulare, in risposta al danno da alchilazione, gli organismi attivano una serie di *checkpoints* del ciclo cellulare che riconoscono le lesioni, rimuovono il danno e favoriscono la ripresa corretta del ciclo cellulare (Begley et al., 2004; Sedgwick et al., 2004).

Le lesioni primarie inflitte da agenti alchilanti monofunzionali possono essere rimosse attraverso l'intervento di quattro sistemi di riparazione:

Riparazione diretta ad opera di metiltransferasi (Olsson & Lindahl, 1980);

Riparazione diretta ad opera di demetilasi ossidative (Aas *et al.*, 2003; Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002, Duncan *et al.*, 2002);

Riparazione per escissione della base (BER);

Riparazione per escissione dei nucleotidi (NER) (Memisoglu & Samson, 2000; Plosky et al., 2002).

Resta da determinare quali meccanismi siano maggiormente implicati nella riparazione in seguito all'esposizione ad agenti alchilanti, anche se, in linea di massima, si assume che le alchiltransferasi intervengono nella riparazione delle O-alchilazioni, mentre il BER e le demetilasi ossidative riparano le N-alchilazioni

CAPITOLO I

Produzione e caratterizzazione della Girasi Inversa dell'archaeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* in forma nativa. Espressione eterologa, purificazione e caratterizzazione delle due isoforme della Girasi Inversa di *S. solfataricus* *TopR1* e *TopR2*

SOMMARIO:

La *Girasi Inversa* è una DNA topoisomerasi complessa ed unica nella sua struttura e funzione. Presenta un'organizzazione bi-modulare costituita da un dominio topoisomerasico C-terminale e da un dominio N-terminale che contiene motivi tipici delle elicasi: i due domini, in seguito ad idrolisi di ATP, cooperano per introdurre superavvolgimenti positivi in molecole di DNA covalentemente chiuse. In assenza di ATP, la *Girasi Inversa* si comporta come una topoisomerasi di tipo IA, e pertanto è in grado di rilassare superavvolgimenti negativi del DNA.

Allo scopo di studiare la *Girasi Inversa* dell'archaeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* ho isolato l'enzima da un estratto proteico di cellule di *S. solfataricus*, mediante l'utilizzo di una combinazione di tecniche cromatografiche.

La *Girasi Inversa* nativa, avente un peso molecolare di 130 KDa è stata purificata in forma omogenea per più del 95%. Sebbene sia stata preparata un'elevata quantità di biomassa (8 litri di coltura cellulare) da cui estrarre il pool di proteina, in seguito agli step di purificazione necessari all'isolamento della *Girasi Inversa*, sono stati ottenuti solo 4 µg totali di proteina: questo dato suggerisce che, nella cellula, la *Girasi Inversa* sia presente a bassi livelli. La caratterizzazione enzimatica della *Girasi Inversa* ha messo in evidenza che l'enzima purificata in forma attiva conserva le sue proprietà enzimatiche: in presenza di ATP è in grado di introdurre superavvolgimenti positivi del DNA ed, in assenza del cofattore, rilassa il DNA come una topoisomerasi di tipo IA. L'attività enzimatica risulta maggiore all'aumentare della temperatura (la massima attività si ottiene incubando l'enzima

ad 80°C), indicando che la Girasi Inversa mantiene le caratteristiche di un enzima termofilo, la cui struttura ed attività sono favorite dalle alte temperature.

Sebbene sia stato ottenuto un enzima puro e funzionale, la scarsa quantità prodotta e la complessità delle procedure di purificazione ha evidenziato l'esigenza di esprimere la proteina in forma ricombinante in un sistema eterologo, al fine di poterne disporre di maggiori quantità necessarie alle manipolazioni sperimentali.

In *S. solfataricus* sono presenti due geni che codificano per due isoforme della *Girasi Inversa*: *TopR1* e *TopR2*. Non ci sono dati attualmente disponibili in letteratura riguardo l'espressione delle due proteine in un sistema eterologo.

I tentativi di clonaggio di entrambi i geni nei classici ceppi di *E. coli* utilizzati per trasformazioni di geni eterologhi, hanno dato esiti negativi. Il clonaggio dei geni *TopR1* e *TopR2* è stato possibile solo nel ceppo Able C, che ha la caratteristica di aumentare la probabilità di acquisizione, da parte della cellula ospite, di geni tossici, attraverso la riduzione del numero di copie del plasmide. Lo stesso ceppo è stato utilizzato per l'espressione delle proteine. Le proteine *TopR1* e *TopR2* in forma ricombinante, sono state purificate all'omogeneità; entrambe le isoforme conservano le caratteristiche enzimatiche dell'enzima nativo.

La necessità di utilizzare il ceppo Able C che favorisce l'espressione di proteine tossiche ha suggerito l'ipotesi che l'enzima potrebbe interferire con il metabolismo cellulare dell'organismo ospite. È stato osservato, infatti, che entrambe le isoforme della Girasi Inversa sono instabili in *E. coli* e tendono facilmente a proteolizzarsi; inoltre, l'espressione eterologa delle due proteine induce un rallentamento della crescita cellulare di *E. coli*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'espressione della Girasi Inversa in *E. coli* è dannosa, suggerendo l'ipotesi che la proteina potrebbe interferire con processi vitali per la cellula come replicazione, trascrizione o ricombinazione.

Le proteine *TopR1* e *TopR2* in forma ricombinante, sono state purificate all'omogeneità, mediante tecniche cromatografiche; di entrambe è stata caratterizzata l'attività: le due isoforme conservano le caratteristiche enzimatiche dell'enzima nativo.

RISULTATI

Parte I

Purificazione e caratterizzazione della Girasi Inversa di *S. solfataricus* in forma nativa

1. Purificazione della Girasi Inversa in forma nativa

La *Girasi Inversa* è presente in tutti gli organismi ipertermofili, sia batteri che *Archaea*. L'enzima in forma nativa è stato precedentemente isolato da *Sulfolobus acidocaldarius* (Nadal et al., 1988) e da *Sulfolobus. Shibate* (Nadal et al., 1994); attualmente non sono disponibili dati pubblicati riguardo la *Girasi Inversa* purificata in forma nativa da *S. solfataricus*. Allo scopo di studiare la *Girasi Inversa* di quest'ultimo microrganismo, ho isolato l'enzima in forma nativa da un estratto proteico di cellule di *S. solfataricus*, mediante l'utilizzo di una combinazione di tecniche cromatografiche.

L'estratto proteico è stato sottoposto ai seguenti step cromatografici effettuati mediante *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC):

1. Cromatografia di affinità su supporto di Eparina, sfruttando la capacità di legare il DNA da parte della *Girasi Inversa*.
2. Cromatografia ad interazione idrofobica (Phenyl Sepharose).

La *Girasi Inversa* nativa, avente un peso molecolare di 130 KDa, è stata purificata in forma omogenea per più del 95% (Fig.1). Sebbene sia stata preparata un'elevata quantità di biomassa (8 litri di coltura cellulare) da cui estrarre il pool di proteine, in seguito ai due step di cromatografici, sono stati ottenuti solo 4 µg totali di *Girasi Inversa*: questo dato suggerisce che, nella cellula, la *Girasi Inversa* sia presente a bassi livelli.

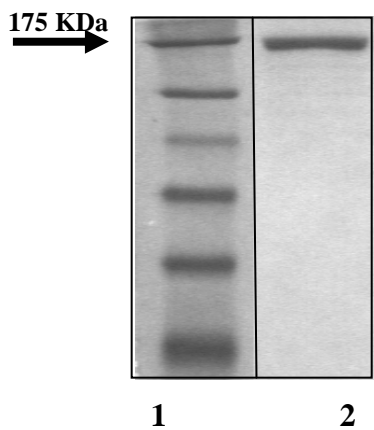


Fig. 1: SDS-PAGE della *GIRASI INVERSA* purificata in forma nativa (Corsia 2); Corsia1 Marker di peso molecolare

Caratterizzazione dell'attività enzimatica della *Girasi Inversa* nativa

L'attività *supercoiling positivo* della girasi inversa purificata in forma nativa è stata saggiata utilizzando come substrato il plasmide pGEM3 superavvolto negativamente. La miscela di reazione standard contiene, oltre alla proteina purificata e al plasmide, altri due componenti che sostengono l'attività catalitica della *Girasi Inversa*: l'ATP (1mM) e il magnesio (1mM). La miscela di reazione così preparata viene poi incubata per 10' a 70°C quindi la reazione viene bloccata con l'aggiunta di SDS all'1%. La formazione di molecole rilassate o positivamente superavvolte viene poi visualizzata dopo elettroforesi bidimensionale su gel di agarosio. In questo tipo di gel la prima dimensione, in cui non vengono utilizzati agenti intercalanti, separa forme di plasmide, definite topoisomeri, che differiscono per il loro numero di legame (ΔLK). Nella seconda dimensione la presenza di basse concentrazioni (10 ng/ml) di bromuro di etidio rallenta la migrazione dei topoisomeri negativamente superavvolti rispetto a quelli positivi rendendoli quindi tra loro distinguibili. (**Fig. 2.1**)

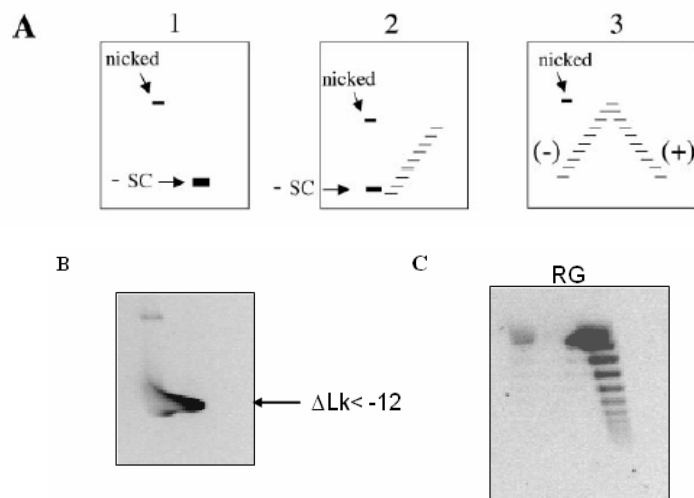


Fig. 2.1: **A.** Schema di un gel bidimensionale. I topoisomeri negativi migrano nella parte sinistra del gel, quelli positivi nella parte destra. **B.** Gel bidimensionale: migrazione del DNA substrato (200 ng di plasmide pGEM3 superavvolto negativamente) in assenza di *Girasi Inversa*. **C.** Attività di superavvolgimento positivo della *Girasi Inversa*: il plasmide pGEM3 (200 ng) è stato incubato a 70° per 10' con la *Girasi Inversa* purificata

Come si può osservare in Fig. 2.2. la presenza della *Girasi Inversa* in un estratto proteico di *S. solfataricus* determina un cambio topologico del plasmide substrato negativamente superavvolto che viene superavvolto positivamente. La proteina purificata in forma nativa mostra la sua attività di supercoiling positivo in presenza di ATP come quella osservata nell'estratto proteico di *S. solfataricus*.

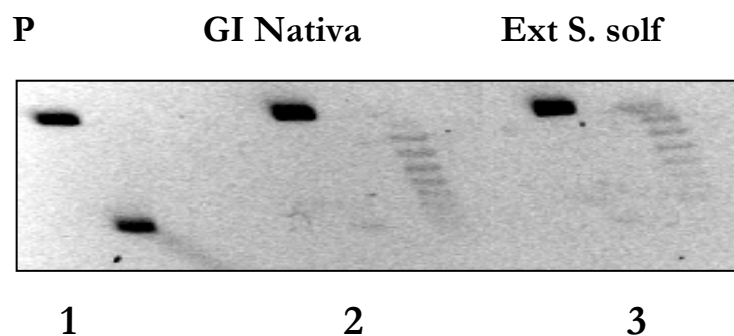


Fig. 2.2: Saggio di attività di supercoiling positivo effettuato in condizioni standard utilizzando la *Girasi Inversa* nativa purificata (120 ng, corsia 2) o un estratto proteico di *S. solfataricus* (5 µg, corsia 3). P: plasmide

L'attività di supercoiling positivo della *Girasi Inversa* dipende dalle concentrazioni di enzima utilizzate. Come si può osservare nella Fig.2.3, aumentando la concentrazione di enzima si ottiene una riduzione del substrato non processato fino ad arrivare alla totale

scomparsa dello stesso ed uno spostamento della distribuzione dei topoisomeri da negativi verso i positivi.

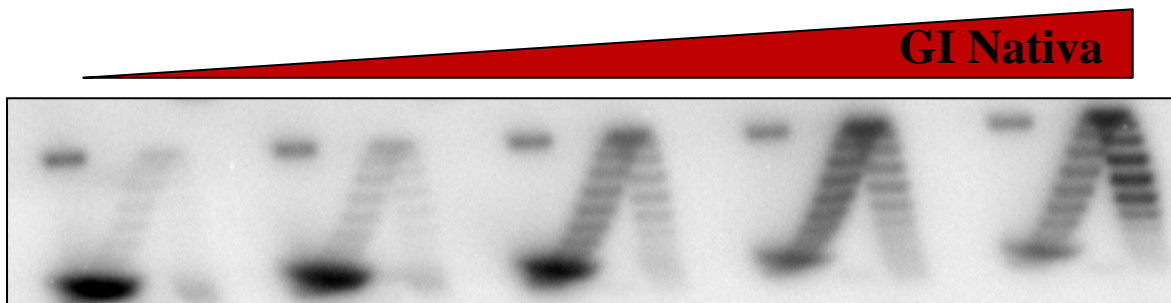


Fig. 2.2: Saggio di attività di supercoiling positivo effettuato in condizioni standard utilizzando concentrazioni crescenti di *Girasi Inversa* nativa purificata (da sinistra a destra 10-20-40-80-100 ng)

La Girasi Inversa è un enzima termofilo e come tale la sua attività enzimatica è strettamente dipendente dalla temperatura. L'attività di supercoiling della Girasi Inversa nativa aumenta all'aumentare della temperatura: come si può osservare in Fig. 2.3 alla temperatura di 80°C l'enzima è in grado di utilizzare quasi tutto il substrato producendo topoisomeri ad elevato ΔLK (+1/+8).

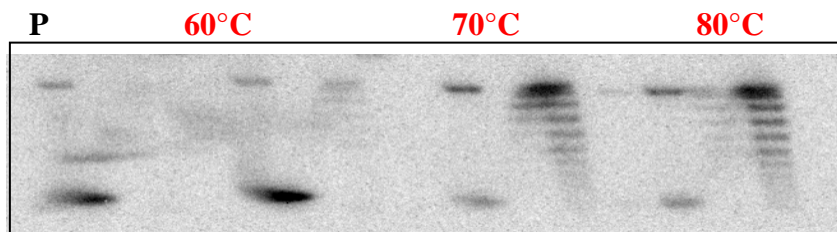


Fig. 2.3: Dipendenza dalla temperatura dell'attività di supercoiling positivo della girasi inversa: il plasmide PGEM3 è stato incubato con la Girasi Inversa purificata (100 ng) per 10' alle indicate temperature.

Il dominio C-terminale della girasi inversa presenta il 30% di similarità con le topoisomerasi di tipo IA che rilassano molecole di DNA superavvolto in maniera indipendente dall'ATP. Per la Girasi Inversa di *S. acidocaldarius* è stato dimostrato che sia il dominio C-terminale che la proteina intera sono in grado di rilassare i superavvolgimenti negativi del DNA in assenza di ATP.

Abbiamo testato l'attività di rilassamento della Girasi Inversa su un plasmide negativamente superavvolto confermando che l'enzima, in assenza di ATP, rilassa il DNA ma non è in grado di indurre superavvolgimenti positivi.



2.3: Effetto dell'ATP sull'attività della Girasi Inversa: in assenza di ATP la Girasi Inversa purificata (120 ng) rilassa il DNA mentre in presenza di ATP introduce superavvolgimenti positivi in presenza di ATP. Il saggio è stato effettuato a 70°C per 10'.

In conclusione, la caratterizzazione enzimatica della Girasi Inversa ha messo in evidenza che l'enzima purificato in forma nativa conserva le sue proprietà enzimatiche: in presenza di ATP è in grado di introdurre superavvolgimenti positivi del DNA mentre in assenza del cofattore rilassa il DNA come una topoisomerasi di tipo I. L'attività enzimatica risulta maggiore all'aumentare della temperatura, indicando che la Girasi Inversa mantiene le caratteristiche di un enzima termofilo la cui attività è favorita dalle alte temperature più vicine a quelle fisiologiche.

Parte II

Espressione eterologa delle due isoforme della Girasi Inversa di *S. solfataricus* TopR1 e TopR2: purificazione e caratterizzazione dell'attività enzimatica

1. Clonaggio ed espressione dei geni *TopR1* e *TopR2* in *E. coli*

Come osservato nella Parte I di questo Capitolo, in seguito alla purificazione della Girasi Inversa da un estratto proteico di *S. solfataricus*, è stata prodotta una bassa quantità di proteina. Al fine di disporre di maggiori quantità di proteina da utilizzare per le manipolazioni sperimentali, è stato necessario ricorrere alla produzione della Girasi Inversa in forma ricombinante.

Nell'archeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* sono presenti due geni che codificano per due isoforme della Girasi Inversa: TopR1 e TopR2 (She et al., 2001). Entrambi i geni sono stati clonati all'interno del vettore, pQE31 (Qiagen) utilizzato anche come vettore di espressione in quanto possiede il promotore per l'operone Lac ed una breve sequenza genica che codifica per sei istidine. Le sequenze codificanti per *TopR1* e *TopR2* sono state inserite in modo da poter esprimere, dopo induzione del promotore, proteine di fusione aventi una coda di istidine all'estremità N-terminale, successivamente sfruttata per la purificazione.

I tentativi di clonaggio dei geni *TopR1* e *TopR2* nei classici ceppi di *E. coli* utilizzati per trasformazioni di geni eterologhi (DH5 α , BL21, JM109) hanno dato esiti negativi. Il clonaggio di entrambi i geni è stato ottenuto solo nel ceppo di *Able C* che ha la caratteristica di aumentare la probabilità di acquisizione, da parte della cellula ospite, di geni tossici, attraverso la riduzione del numero di copie di plasmide. Inoltre il ceppo possiede l'allele *LacI^q* codificante per un super-repressore dell'operone Lac, che, in assenza di induttore, mantiene a livelli minimi l'espressione del gene controllato dal promotore Lac.

Le condizioni migliori per l'espressione di entrambe le proteine sono state ottenute incubando le cellule in presenza di induttore (isporopil-thio.galagtoside, IPTG) a 22°C: abbiamo infatti osservato che, a 37°C, temperatura fisiologica per *E. coli*, entrambe le isoforme sono maggiormente instabili in *E. coli*, e che la loro espressione ha un effetto negativo sul normale metabolismo dell'organismo ospite.

2. Effetto dell'espressione eterologa delle proteine TopR1 e TopR2 sulla crescita cellulare di *E. coli*

Come si può osservare dal grafico in Fig. 2.1, l'espressione di entrambe le isoforme induce un rallentamento della crescita cellulare di *E. coli*: tale effetto è maggiore nelle cellule che esprimono l'isoforma TopR1 rispetto a quelle che esprimono la TopR2. Inaspettatamente, tra le colture cellulari indotte e non indotte non si osservano sostanziali differenze, probabilmente la minima quantità prodotta in assenza di induttore è sufficiente ad esplicare l'azione.

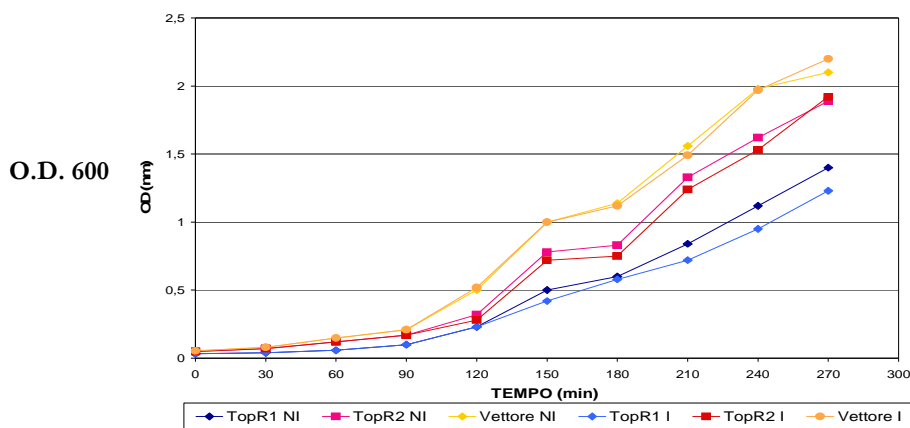


Fig. 2.1: Curva di crescita di cellule appartenenti al ceppo Able C di *E. coli* incubate a 37°C. Le cellule sono state trasformate con i plasmidi indicati. I: colture a cui è stato aggiunto l'induttore; NI: colture a cui non è stato aggiunto l'induttore

L'incubazione delle colture cellulari ad una temperatura inferiore a quella fisiologica (22°C), induce una sostanziale riduzione dell'effetto negativo dell'espressione della TopR1 e della TopR2 sulle crescite cellulari. Tuttavia si

osserva comunque un rallentamento della crescita dei ceppi che esprimono le proteine rispetto ai controlli ed anche in questo caso l'effetto di TopR1 è maggiore di TopR2.

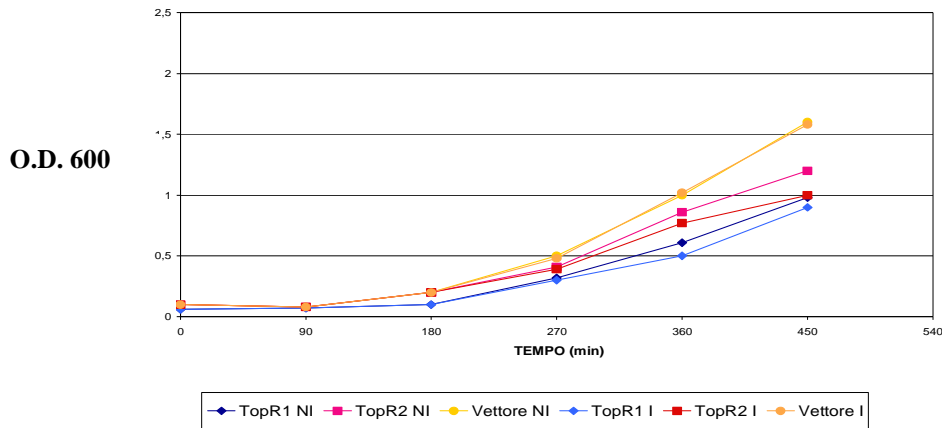


Fig. 2.2. Curva di crescita di cellule appartenenti al ceppo Able C di *E.coli* incubate a 22°C. Le cellule sono state trasformate con i plasmidi indicati. I: colture a cui è stato aggiunto l'induttore; NI: colture a cui non è stato aggiunto l'induttore

Il livello di espressione di *TopR1* e *TopR2* nelle diverse condizioni di crescita è stato analizzato mediante western blot di estratti proteici di cellule di *E. coli* incubate a 37°C (Fig.2.3).

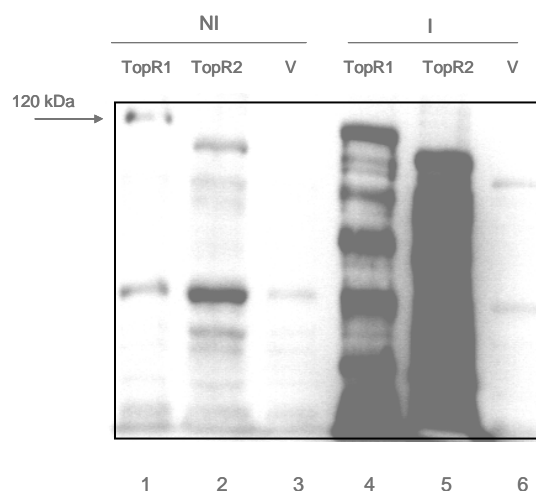


Fig. 2.3: Western blot di estratti proteici preparati da cellule di *E. coli* incubate a 37°C, in cui è stata indotta l'espressione di delle proteine indicate. Il filtro è stato cimentato con un anticorpo policlonale diretto contro la sequenza polistidinica. V: vettore da solo

Come si può osservare dalla Fig. 2.3, sia per la *TopR1* che per la *TopR2* si ottengono numerosi prodotti di degradazione; in particolare la *TopR2* si presenta quasi completamente proteolizzata. Un simile pattern degradativo si verifica incubando le cellule a 22°C, ma in questo caso si osserva una riduzione della proteolisi per entrambe le proteine.

La maggiore instabilità della *TopR2* rispetto alla *TopR1* e quindi la minore quantità di proteina intatta nella cellula, potrebbe essere responsabile della sua ridotta tossicità sulla crescita cellulare.

3. Purificazione delle proteine ricombinanti *TopR1* e *TopR2*

Culture cellulari di *E. coli* in cui è stata indotta l'espressione di *TopR1* o *TopR2* sono state utilizzate per la preparazione di estratti proteici. Tali estratti sono stati sottoposti a due passaggi cromatografici mediante FPLC:

- Cromatografia di affinità per le istidine (His-trap, Amersham)
- Cromatografia idrofobica (Phenyl Sepharose, Amersham)

Le proteine *TopR1* e *TopR2* ricombinanti aventi un peso molecolare uguale a quello atteso, sono state purificate in forma omogenea per più del 95% (Fig.2). Partendo da colture di 3 litri sono stati ottenuti 2 mg di proteina *TopR1* e soltanto 150 µg di *TopR2*.

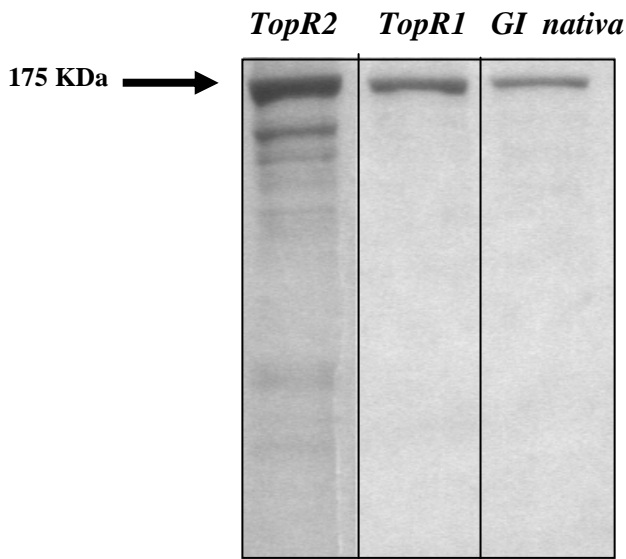


Fig.3: SDS-PAGE delle proteine *TopR2* (1 μ g), *TopR1* (1 μ g) e Girasi Inversa nativa (500 ng) purificate

La produzione di una scarsa quantità di TopR2 è probabilmente attribuibile all'instabilità della proteina: i frammenti osservati a più basso peso molecolare sono prodotti di degradazione (presentano la coda di istidine) ed indicano che l'enzima in forma intera non è stabile e tende facilmente a proteolizzarsi. Inoltre sia la TopR2 che la TopR1 purificate tendono a degradarsi in seguito a scongelamento e ricongelamento. Sebbene sia evidente che la *Girasi Inversa* sia particolarmente soggetta a degradazione, non è ancora chiaro a cosa sia imputabile la sua elevata instabilità.

4. Caratterizzazione dell'attività enzimatica delle proteine ricombinanti *TopR1* e *TopR2*

Al fine di caratterizzare l'attività enzimatica delle due isoforme della Girasi Inversa abbiamo saggiato l'attività di supercoiling positivo delle proteine su gel di agarosio bidimensionale in condizioni standard (si veda Parte I). Come si può osservare dalla Fig. 4.1 (A e B) entrambe le proteine ricombinanti sono attive e la loro attività dipende dalle concentrazioni di proteina utilizzate. All'aumentare della concentrazione di enzima si osserva una riduzione del substrato non processato ed uno spostamento della distribuzione dei topoisomeri da negativi verso i positivi: la maggiore produzione dei topoisomeri positivi indica una maggiore efficienza dell'attività enzimatica.

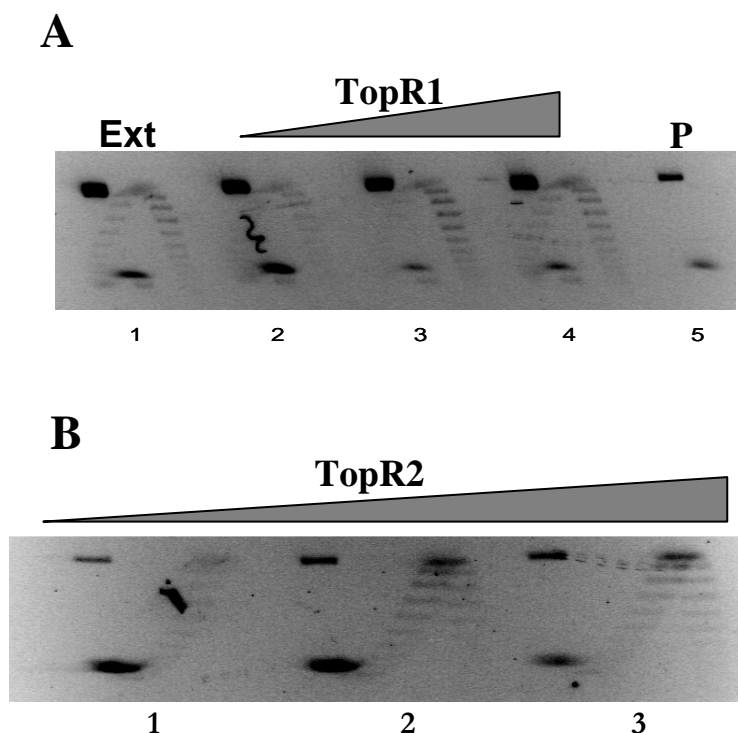


Fig. 4.1. Attività di positive supercoiling delle proteine TopR1 (A) e TopR2 (B) ricombinanti sul plasmide *PGEM3* negativamente superavvolto: A. Il plasmide *PGEM3* è stato incubato per 10' a 70°C con un estratto proteico di *S.solfataricus* (5 µg, corsia 1); e con *TopR1* purificata: 10ng (corsia 2); 20 ng (corsia 3); 40 ng (corsia 4); P: plasmide da solo; B. Il plasmide *PGEM3* è stato incubato per 10' a 70°C con differenti quantità di *TopR2*: 50ng (corsia 1); 100 ng (corsia 3); 200 ng (corsia 4);

E importante notare che l'isoforma *TopR1* è più attiva della *TopR2*; infatti nel caso di *TopR1* riusciamo a visualizzare l'attività anche con solo 10 ng di proteina, mentre un'attività paragonabile si ottiene con una quantità cinque volte maggiore di *TopR2*. Non è attualmente chiaro se questa differenza debba ascrivarsi alla già citata maggiore instabilità di *TopR2* o ad una differente attività delle due isoforme.

L'attività ATP-dipendente della *TopR1* è stata paragonata con l'attività enzimatica della Girasi Inversa in forma nativa. Come si può osservare in Fig.4.2, ad alte concentrazioni di proteina utilizzate entrambi gli enzimi consumano tutto il substrato generando topoisomeri positivi. Tuttavia, nelle condizioni utilizzate, la proteina nativa genera topoisomeri con un maggiore grado di superavvolgimento (più positivi), rispetto a quelli prodotti dalla proteina ricombinante, indicando che la forma nativa ha una maggiore attività rispetto alla forma ricombinante, probabilmente perché più stabile.

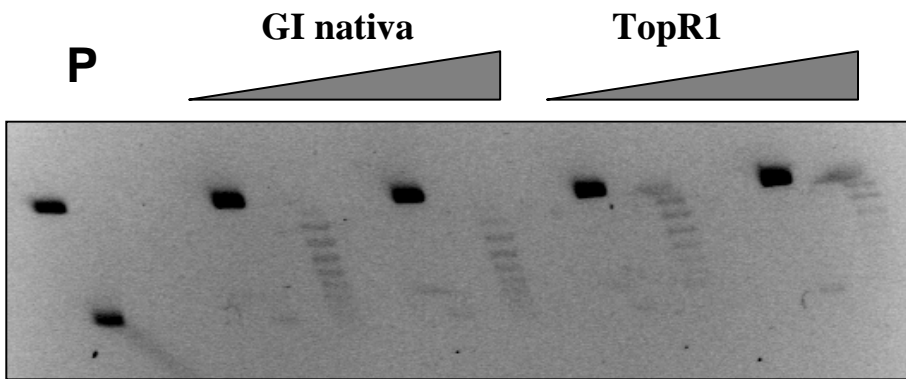


Fig. 4.2: Attività di supercoiling della Girasi Inversa nativa (120 ng e 240 ng) e della TopR1 ricombinante (120 ng e 240 ng) sul plasmide *PGEM3* superavvolto positivamente.

La Girasi Inversa è un enzima termofilo e come tale la sua attività enzimatica è strettamente correlata alla temperatura. L'attività di supercoiling positivo di entrambe le isoforme aumenta all'aumentare della temperatura: come si può osservare in Fig. 4.3 per la TopR1

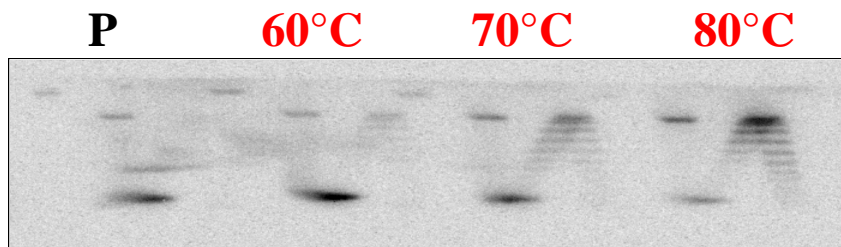


Fig. 4.3: Dipendenza dalla temperatura dell'attività di supercoiling positivo della girasi inversa: il plasmide *PGEM3* è stato incubato con la TopR1 purificata (40 ng) per 10' alle indicate temperature.

Abbiamo infine testato l'attività topoisomerasica in assenza di ATP delle isoforme ricombinanti: entrambe le isoforme, in assenza del cofattore, si comportano come una topoisomerasi di tipo IA, per cui rilassano il DNA negativamente superavvolto, come dimostrto in Fig. 4.4 per la TopR1.

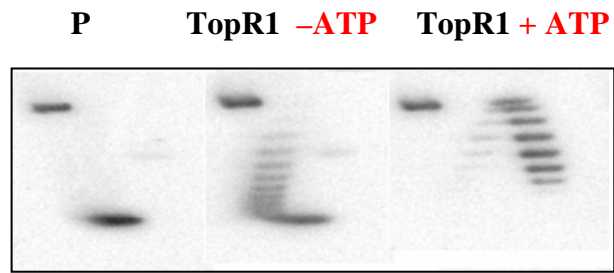


Fig.3.4: Effetto dell'ATP sull'attività della TopR1: in assenza di ATP la proteina purificata (80 ng) rilassa il DNA mentre in presenza di ATP introduce seperavvolgimenti positivi in presenza di ATP. Il saggio è stato effettuato a 70°C per 10'.

CAPITOLO II

Interazione fisica e funzionale della Girasi Inversa e della *Single strand binding protein* SSB in *Solfataricus*

SOMMARIO

La *Girasi Inversa*, pur essendo unica nella sua struttura e funzione, rappresenta un modello di cooperazione tra due classi di enzimi: le elicasi e le topoisomerasi. Studi precedentemente effettuati hanno messo in evidenza alcuni esempi di interazione tra topoisomerasi ed elicasi, sia nell'uomo che in organismi meno complessi, ed hanno suggerito una potenziale cooperazione tra le due classi di enzimi nei processi metabolici del DNA che comprendono la progressione della forza replicativa, la segregazione dei cromosomi, il superavvolgimento del DNA, la ricombinazione e il riparo. In particolare la Topoisomerasi III interagisce con le elicasi della famiglia RecQ: tale interazione è evolutivamente conservata e gioca un ruolo nella risposta ai danni al DNA e nel mantenimento dell'integrità del genoma. E' stato dimostrato che, nell'uomo, alterazioni nei geni che codificano per le elicasi della famiglia RecQ sono responsabili dell'insorgenza di gravi patologie che provocano aberrazioni cromosomiche, invecchiamento precoce e maggiore predisposizione al cancro.

Più di recente è stato dimostrato che l'attività delle elicasi e dei complessi topoisomerasi-elicasi viene influenzata dall'interazione con altre proteine, come le *DNA Single Strand Binding Protein* anch'esse implicate in molteplici processi che riguardano il metabolismo del DNA.

Sulla base di tali evidenze sperimentali si può ipotizzare che la *Girasi Inversa*, come i complessi topoisomerasi-elicasi, potrebbe intervenire nei processi metabolici coinvolti nel mantenimento della integrità del genoma, mediante l'interazione fisica e funzionale con proteine che legano il DNA.

La girasi inversa è l'unica topoisomerasi in grado di introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA: il substrato preferito per la sua attività è rappresentato da una regione a singolo filamento fiancheggiata da un doppio filamento suggerendo l'ipotesi che l'enzima necessiti di regioni parzialmente denaturate per esplicare la sua funzione.

Nel lavoro sperimentale presentato in questo capitolo è stato dimostrato che la *DNA Single Strand Binding Protein* SSB di *S. solfataricus* stimola l'attività di supercoiling positivo della Girasi Inversa. Dall'analisi dei singoli stadi della reazione di topoisomerizzazione è emerso che SSB, stabilizzando il DNA a singolo filamento, stimola il legame della Girasi inversa al DNA e di conseguenza tutti gli stadi successivi della reazione.

Attraverso tecniche di immunoprecipatazione è stata studiata l'interazione fisica delle due proteine in estratti proteici di *Sulfolobus solfataricus*. Da tali studi è emerso che le due proteine interagiscono fisicamente in presenza di DNA, ma non in sua assenza.

È stato inoltre dimostrato che SSB stimola l'attività di *supercoiling* positivo della *Girasi Inversa* anche in presenza della proteina cromosomale Sul7d, che invece ha un'effetto inibitorio sulla stessa attività. Da tali risultati si può ipotizzare che, *in vivo*, la modulazione dell'attività della girasi inversa mediante le due DNA binding proteins potrebbe giocare un ruolo nella regolazione delle dinamiche conformazionali della cromatina durante i molteplici processi metabolici del DNA.

Infine è stato dimostrato che SSB stimola il legame della Girasi inversa al DNA contenente lesioni indotte da radiazioni UV, suggerendo l'ipotesi che l'interazione funzionale tra le due proteine potrebbe avere una rilevanza biologica nei vari *pathways* metabolici coinvolti nella risposta ai danni indotti da UV.

Referenza:

A. Napoli, **A. Valenti**, V. Salerno, M. Nadal, F. Garnier, M. Rossi and Maria Ciaramella “*Functional interaction of reverse gyrase with single strand binding protein of the archaeon Sulfolobus solfataricus*”. **564–576 Nucleic Acids Research**, 2005, Vol. 33, No. 2

RISULTATI

1. Effetto della *DNA single strand binding protein* SSB sull'attività della girasi inversa

Allo scopo di analizzare l'effetto della proteina SSB sull'attività della girasi inversa, ho effettuato un saggio di supercoiling, in condizioni standard (si veda Capitolo I), utilizzando la *Girasi Inversa* purificata da *Sulfolobus shibate* B12 (Nadal et al 1988) e la SSB ricombinante espressa e purificata da *E. coli* (Wadsworth, R.I. and White, M.F. (2001).

Il DNA substrato utilizzato è il plasmide PGEM3 superavvolto negativamente.

Come atteso dalle sue proprietà biochimiche, la proteina SSB non genera variazioni topologiche del plasmide PGEM3 (**Fig.1.1**)

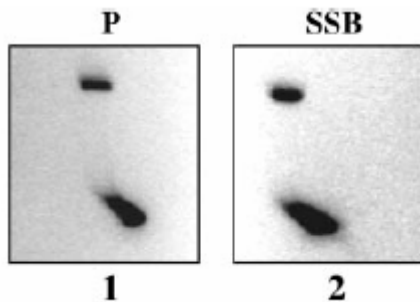


Fig.1.1: Effetto della proteina SSB sul plasmide PGEM3. 1. plasmide da solo; 2. plasmide incubato con SSB (3 μ g).

Al contrario, la Girasi Inversa induce un progressivo aumento del numero di legame del plasmide. L'attività di supercoiling positivo della *Girasi Inversa* dipende dalle concentrazioni di enzima utilizzate. Come si può osservare nella fig.1.2, aumentando la concentrazione di enzima si ottiene una riduzione del substrato non processato fino ad arrivare alla totale scomparsa dello stesso ed uno spostamento della distribuzione dei topoisomeri da negativi verso i positivi.

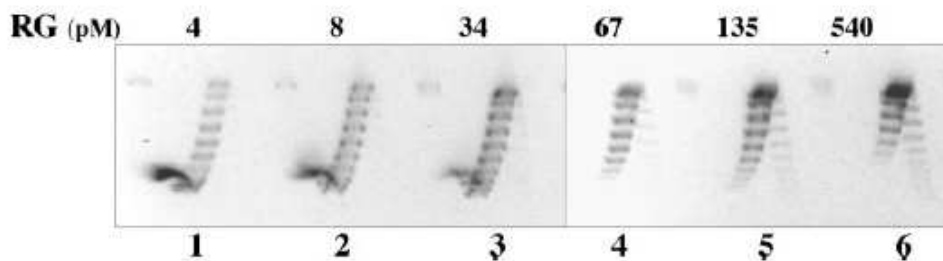


Fig.1.2: Saggio di attività della *Girasi Inversa*. Il saggio è stato effettuato in condizioni standard utilizzando concentrazioni crescenti di *Girasi Inversa* purificata (RG).

Questi dati evidenziano che l'enzima mostra un'elevata affinità per il substrato superavvolto negativamente e che i prodotti con un alto grado di superavvolgimento positivo vengono ottenuti alle più elevate concentrazioni di enzima utilizzate. Se a quantità basse di *Girasi Inversa* non in grado di indurre superavvolgimenti positivi, viene aggiunta la SSB, si ottiene una stimolazione dell'attività di supercoiling positivo della *Girasi Inversa* e tale stimolazione dipende dalle concentrazioni di SSB (Fig. 1.3).

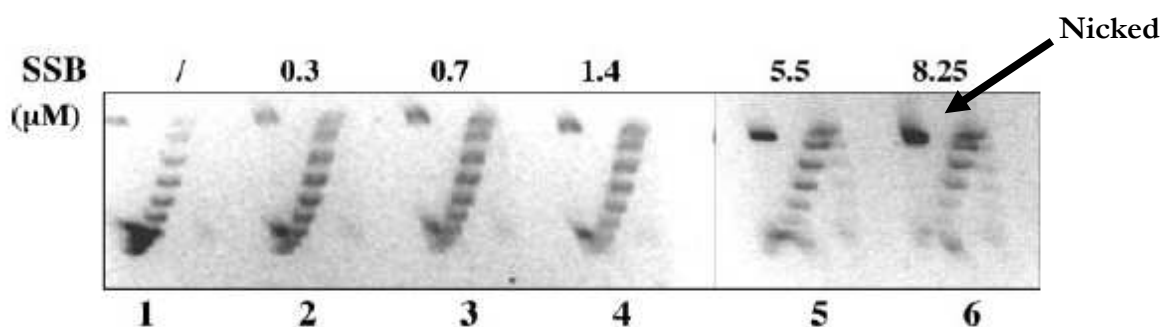


Fig.1.3. Effetto della proteina SSB sull'attività di positive supercoiling della *Girasi Inversa*. In ogni reazione sono presenti 300ng di plasmide PGEM3, 34 pmol di girasi inversa e concentrazioni crescenti di SSB come indicato. Nella prima corsia non è presente SSB.

Poiché è noto che il sito di legame al DNA di SSB occupa 5 nucleotidi, nelle condizioni utilizzate, SSB satura il substrato alla concentrazione di 2.5 μM . La stimolazione dell'attività di *positive supercoiling* della *Girasi Inversa* da parte di SSB si osserva in un ampio intervallo di concentrazione della proteina: dalla minima quantità pari a 0.3 μM (0.1 molecole per sito di legame), fino a concentrazioni superiori a 8.2 μM che corrispondono ad un eccesso molare di SSB di tre volte maggiore rispetto al suo sito di

binding. SSB è anche in largo eccesso rispetto alla Girasi Inversa: in questa reazione è presente una molecola di enzima per 148 molecole di plasmide.

La stimolazione dell'attività di *positive supercoiling* da parte di SSB si ottiene anche utilizzando maggiori concentrazioni di *Girasi Inversa* (1molecola di *Girasi Inversa*/ 37 molecole di DNA), (Fig.1.4)

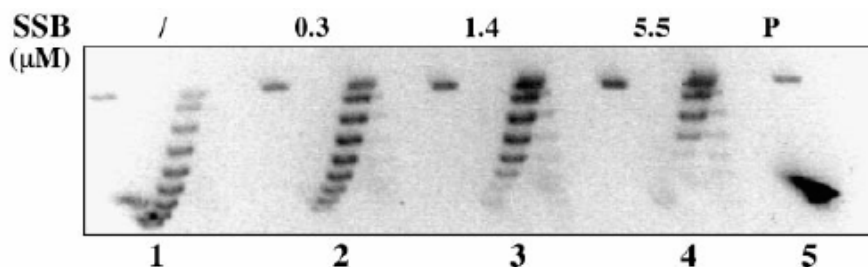


Fig.1.4. Saggio di attività di positive supercoiling come descritto in Fig.1.4, ma ogni reazione contiene 135 pmol di *Girasi Inversa* e le indicate quantità di SSB. Nella corsia 1 non è presente SSB e nella corsia 5 è presente il plasmide da solo.

I dati riportati dimostrano che all'aumentare della concentrazione di SSB si ottiene un aumento direttamente proporzionale dell'attività di *positive supercoiling* della *Girasi Inversa*: tale aumento si osserva nella riduzione di substrato non processato e nella concomitante variazione della tipologia dei topoisomeri che, alle concentrazioni più alte, risultano essere più positivi. La stimolazione si osserva anche quando viene utilizzata una maggiore concentrazione di enzima: in questo caso si ottiene un ulteriore aumento del grado di superavvolgimento dei topoisomeri dovuto ad una maggiore attività di base della *Girasi Inversa*.

I risultati ottenuti sono stati analizzati in modo quantitativo misurando, mediante densitometria, l'intensità delle bande corrispondenti a ciascun topoisomero prodotto nelle varie reazioni di topoisomerizzazione. I dati così ottenuti sono stati analizzati utilizzando due metodi. In Fig.1.5 vengono riportati i valori in percentuale relativi alla quantità totale dei topoisomeri prodotti (che risulta dalla somma dell'intensità di tutti i topoisomeri), rispetto alla quantità totale di DNA substrato presente in ogni reazione. A basse concentrazioni di *Girasi Inversa* in presenza di SSB alla concentrazione di 0.3 M si

osserva un notevole aumento dell'attività di positive supercoiling, che si riflette in una significativa variazione della quantità di DNA substrato utilizzato, che passa dal 58.7% (in assenza di SSB) al 94% in presenza di SSB.

	No SSB (%)	0.3 μ M SSB (%)	0.7 μ M SSB (%)	1.4 μ M SSB (%)	5.5 μ M SSB (%)	8.25 μ M SSB (%)
RG (34 pM)	58.7 \pm 1	94.0 \pm 1	96.2 \pm 2	97.0 \pm 2	97.2 \pm 2	97.7 \pm 2
RG (135 pM)	92.7 \pm 1	98.7 \pm 2	99.2 \pm 2	99.3 \pm 2	99.9 \pm 2	99.9 \pm 2

Fig.1.5: Analisi quantitativa dell'attività della *Girasi Inversa* in presenza di SSB. I dati riportati indicano le percentuali di substrato processato rispetto alla quantità totale di DNA. RG, girasi inversa.

Questo metodo utilizzato non ci permette però di avere dei risultati attendibili ad alte concentrazione di enzima. Pertanto, l'analisi quantitativa è stata effettuata con una differente metodologia, in cui vengono presi in considerazione i topoisomeri più abbondanti in ogni reazione e di questi vengono calcolati i valori dei sigma (σ) mediante la seguente formula:

$$\sigma = \Delta LK / LK_0$$

Dei σ ottenuti sono stati poi calcolati i valori medi (*mean σ*) e questi ultimi riportati in grafico in funzione delle concentrazioni di SSB utilizzate.

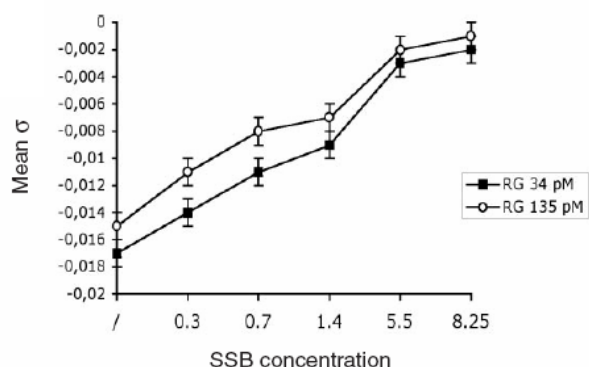


Fig.1.6: Analisi quantitativa dell'attività della *Girasi Inversa* in presenza di SSB.

I valori dei σ medi sono stati calcolati come descritto nel testo e riportati in grafico in funzione delle concentrazioni di SSB (da 0.3 a 8.25 μ M). Le due curve indicano la maggiore e la minore quantità di *Girasi Inversa* inversa utilizzata (34 e 135 pM rispettivamente).

Dal grafico si evince che sia alla più bassa che alla più alta concentrazione di Girasi Inversa utilizzata, la presenza di SSB induce, in modo concentrazione-dipendente, un progressivo aumento dei valori dei σ medi e quindi una stimolazione dell'attività di positive supercoiling della Girasi Inversa. Dall'osservazione dei risultati sperimentali ottenuti (Fig. 1.3-1.4) si nota che all'aumentare delle concentrazioni di SSB utilizzate si osserva un aumento del plasmide nella forma "nicked". Tale forma rappresenta il DNA tagliato, ma non rilegato dall'enzima ed indica che la reazione di topoisomerizzazione si è bloccata allo step di formazione del complesso covalente. Questa osservazione ha suggerito la possibilità che la stimolazione da parte di SSB avvenga durante. I dati sperimentali fin qui mostrati non spiegano in che modo SSB sia in grado di indurre una stimolazione dell'attività della *Girasi Inversa*: SSB potrebbe favorire un maggior numero di cicli di topoisomerizzazione ogni volta che la *Girasi Inversa* lega il substrato, oppure potrebbe indurre più volte l'enzima ad associarsi e dissociarsi dal DNA substrato.

2. Effetto di SSB sull'attività di legame al DNA e di formazione del complesso covalente girasi inversa-DNA.

Allo scopo di determinare in quale momento della reazione di topoisomerizzazione della *Girasi Inversa* è coinvolta SSB, abbiamo analizzato i singoli stadi della reazione enzimatica.

È stato precedentemente dimostrato che la *Girasi Inversa* lega preferenzialmente regioni di DNA a singolo filamento fiancheggiate da regioni a doppio filamento (Rodriguetz A.C. 2002). Tali regioni parzialmente denaturate potrebbero essere necessarie all'enzima per effettuare locali aperture dell'elica per cui la presenza di SSB che stabilizza le regioni di DNA a singolo filamento potrebbe favorire il legame della *Girasi Inversa* al DNA. Abbiamo analizzato l'effetto di SSB sull'attività di legame al DNA della *Girasi Inversa* attraverso esperimenti di Electron Mobility Shift Assay (EMSA) utilizzando un oligonucleotide di 35 bp a doppio filamento (RGA) per il quale la *Girasi Inversa* ha un elevata affinità di binding (Napoli et al., 2004).

SSB forma un complesso stabile con l'oligo RGA; nella figura 2.1 si osserva infatti la formazione di un complesso proteina-DNA alle varie concentrazioni di SSB utilizzate (corsie 6-8).

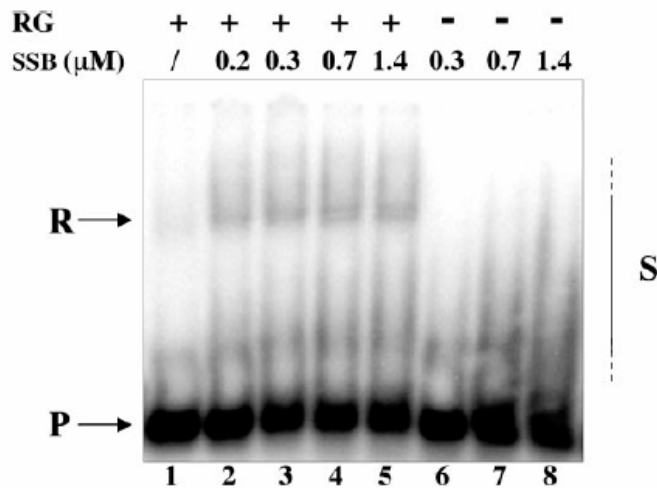


Fig. 2.1: Effetto di SSB sull'attività di binding della girasi inversa. L' oligonucleotide RGA marcato in 3' (2.4 nM; 4x10⁴cpm per corsia) è stato incubato con la girasi inversa purificata (1.4 μM) (**Corsie 1 -5**) e con concentrazioni crescenti di SSB (**corsie 2-5**). La banda radioattiva rappresenta il legame girasi inversa-RGA (R). Nelle corsie 6-8 si evidenzia lo shift (S) dovuto al legame di SSB al DNA. P, DNA non legato.

Il binding della Girasi Inversa sull'oligonucleotide RGA è molto debole ma, incubando la girasi inversa ed SSB si ottiene un aumento del binding dell'enzima al DNA, aumentando la concentrazione di SSB non si osserva un ulteriore miglioramento dell'affinità di legame al DNA. Risultati simili sono stati ottenuti per la Topoisomerasi I di *E.coli* il cui binding al DNA viene stimolato da SSB in modo indipendente dalla concentrazione. Tale dato sostiene l'ipotesi che il legame della *Girasi Inversa* al DNA sia di tipo cooperativo (Kampmann, M. and Stock, D. (2004).

Il ciclo di catalisi enzimatica delle topoisomerasi prevede la rottura del DNA, la rotazione del filamento rotto attraverso il taglio ed, in fine, la saldatura covalente dei filamenti precedentemente tagliati. Durante la reazione si forma un intermedio transiente caratterizzato da un legame fosfodiesterico tra un'estremità del DNA e un residuo di tirosina nel sito catalitico dell'enzima. La girasi inversa taglia il singolo filamento del DNA e forma un complesso covalente tra un'estremità 5' del DNA e la tirosina 809. E' stato precedentemente provato che la Girasi Inversa purificata può essere bloccata in un

complesso covalente con il DNA se la reazione viene eseguita in assenza di ATP e rapidamente bloccata con detergenti (Jaxel *et al.*, 1999); nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un saggio (CCA) per valutare l'efficienza di formazione del complesso covalente Girasi Inversa-DNA. In questo tipo di saggio il DNA utilizzato per la reazione è un oligonucleotide di 35bp (RGA) marcato terminalmente per cui, dopo autoradiografia, il complesso DNA-enzima viene visualizzato come una singola banda radioattiva, avente una massa molecolare all'incirca uguale quella della proteina: tale banda contiene la proteina e la porzione di DNA che l'enzima ha legato in modo covalente dopo il taglio (Fig. 2.2).

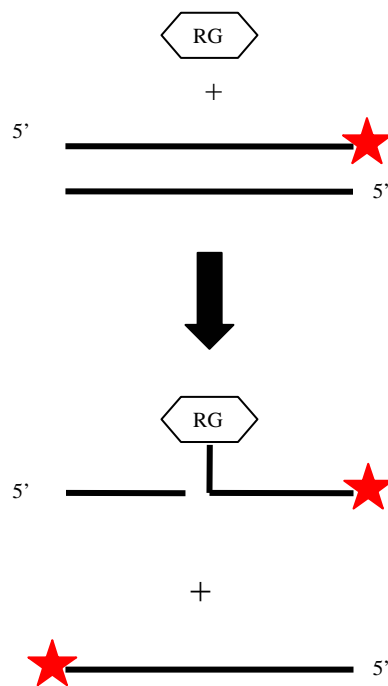


Fig.2.2: Rappresentazione della formazione del complesso covalente tra la girasi inversa e l'oligonucleotide RGA marcato in 3': il complesso è visibile dopo autoradiografia. La stella indica la marcatura in 3'.

Come si può osservare dalla figura 2.3 in presenza SSB (50 molecole proteiche per sito di binding) si osserva una significativa stimolazione dell'efficienza di formazione del complesso covalente enzima-DNA.

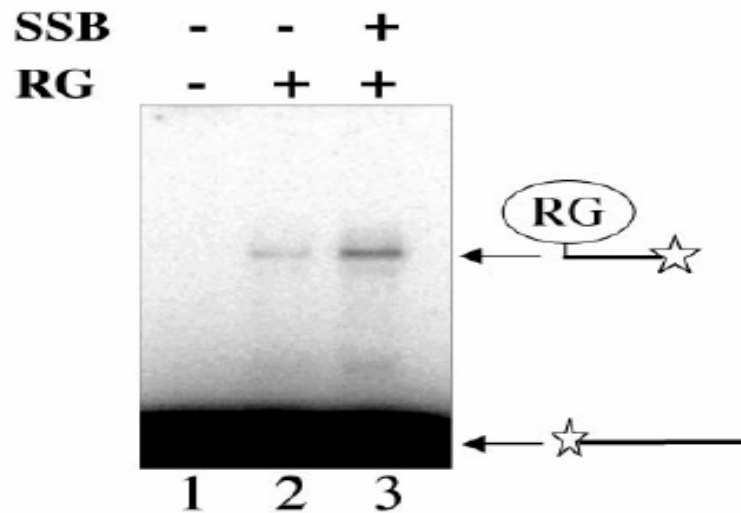


Fig. 2.3: Effetto di SSB sull'efficienza di formazione dei complessi covalenti *Girasi Inversa-RGA*. L'oligonucleotide marcato all'estremità 3' viene incubato e saggiato mediante CCA come descritto in materiali e metodi; corsia 1 oligo-RGA da solo. Corsia 2 *Girasi Inversa* purificata (1 ng, 350 pM). Corsia 3: come corsia 2, ma con 500 ng di SSB (1.4 μM).

3. SSB non induce l'attività elicastica della *Girasi inversa*

La *Girasi Inversa* è costituita da un dominio topoisomerasico C-terminale e da un dominio N-terminale che contiene motivi conservati nelle elicasi, come il sito di legame per l'ATP. Tuttavia né il dominio N-terminale da solo né l'enzima intero hanno attività elicastica *in vitro*. È una caratteristica delle SSB degli organismi dei tre domini viventi la capacità di stabilizzare le zone di DNA parzialmente denaturate, stimolando l'attività enzimatica delle elicasi. SSB di *Sulfolobus* stimola l'attività elicastica di MCM (Carpentieri et al., 2002); SSB di *E. Coli* stimola la RecQ elicasi (Harmon et al 2003); la proteina A della replicazione umana (hRPA) stimola le elicasi della famiglia RecQ umane: RecQ1 (Cui et al 2002; Cui et al., 2003e WRN (Brosh et al., 1999; Shen et al., 1998).

Sulla base di queste osservazioni ci siamo chiesti se anche SSB di *Sulfolobus* potesse promuovere l'attività elicastica della *Girasi Inversa*.

Per verificare questa ipotesi abbiamo utilizzato come substrato molecole di DNA circolare a singolo filamento del vettore M13 e oligonucleotidi di 40 basi complementari ad esso

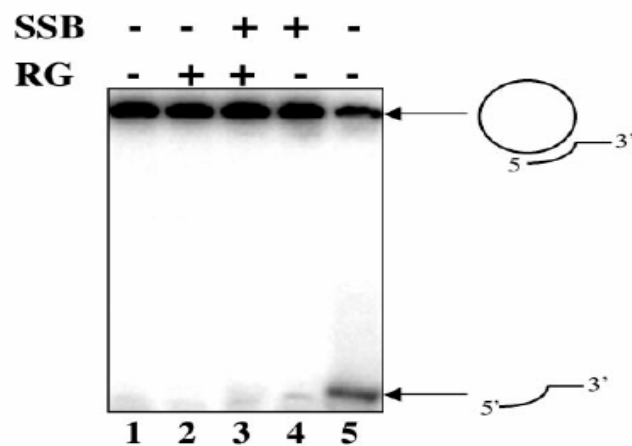


Fig.3: Saggio di attività elicastica. L'ibrido M13 con una coda all'estremità 3' non appaiata viene incubato per 10' a 70°C da solo (corsia 1), con la *Girasi Inversa* 540 pM (corsia 2), con la *Girasi Inversa* (540 pM) ed SSB (1.4 μM, che corrisponde a 0.5 molecole di proteina per sito di binding). In corsia 5 È presente il DNA substrato parzialmente denaturato. Nella parte superiore del gel si osserva il substrato di partenza, in quella inferiore l'oligonucleotide denaturato.

I risultati ottenuti dimostrano che, come atteso, la *Girasi Inversa* non ha attività elicastica ed inoltre la proteina SSB, nelle condizioni utilizzate, non promuove l'attività elicastica della *Girasi Inversa*; questo risultato non esclude, però, la possibilità che utilizzando differenti substrati (ad esempio strutture che mimino forche o bolle di replicazione) si possa osservare l'induzione dell'attività elicastica da parte della *Girasi Inversa* con/senza SSB.

4. Effetto di SSB sull'attività di rilassamento della *Girasi Inversa*

La reazione di *supercoiling* positivo della *Girasi Inversa* è guidata da ATP. In assenza di ATP l'enzima si comporta come una topoisomerasi di tipo I per cui rilassa molecole di DNA circolari. È stato dimostrato che l'attività di rilassamento del DNA da parte della Topo III di *E. coli* è stimolata da SSB dello stesso organismo e dalla RPA umana. Abbiamo, pertanto, deciso di valutare l'effetto di SSB sull'attività di rilassamento della *Girasi Inversa*. Come si può osservare dalla Fig.4 la presenza di SSB stimola l'attività di rilassamento della *Girasi Inversa* in modo dipendente dalla concentrazione di proteina usata: la massima stimolazione si osserva quando viene utilizzata una quantità di SSB

pari a 0.5 molecole proteiche per sito di binding (1.4 μM). È stato interessante notare che ad una concentrazione di SSB pari a 5 μM (2 molecole proteiche per sito di binding) si ottiene un'inibizione dell'attività di rilassamento della Girasi Inversa. Tale dato è in contrasto con quanto osservato per l'attività ATP-dipendente, la cui stimolazione viene promossa fino a concentrazioni di SSB 10 volte maggiori.

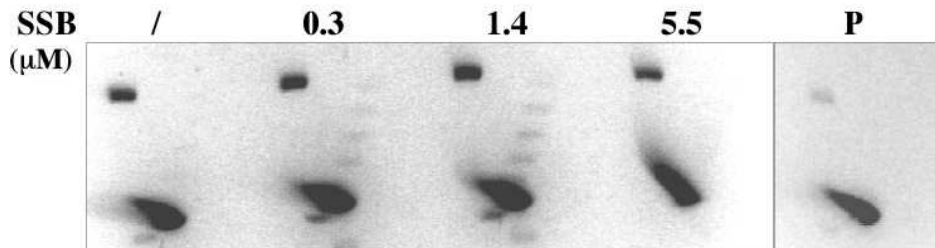


Fig. 4. Il saggio è stato effettuato in condizioni standard ma senza aggiungere ATP utilizzando la Girasi Inversa (135 pM) ed SSB alle concentrazioni indicate. P: plasmide PGEM 3 da solo.

5. Effetto dei componenti della cromatina sull'attività della *Girasi Inversa*

Sulfolobus presenta varie proteine che legano il DNA, tra le quali le più studiate sono Sul7d e Alba (White, M.F. and Bell, S.D. 2002). Sul7d è il componente più abbondante della cromatina in *S. solfataricus*. Studi precedenti hanno dimostrato che tale proteina stabilizza il DNA in vitro (Baumann et al., 1994), promuove l'appaiamento dei filamenti di DNA complementari al di sopra del punto di fusione (Gagliardi et al., 1997), induce curvatura e compattazione della doppia elica ed inibisce l'attività di *positive supercoiling* della *Girasi Inversa* probabilmente mediante compattazione della doppia elica rendendola quindi meno accessibile alla topoisomerasi (Napoli et al., 2002).

Poiché abbiamo dimostrato che SSB, al contrario di Sul7d, stimola l'attività della Girasi Inversa abbiamo considerato interessante testare l'effetto concomitante delle due proteine sull'attività della Girasi Inversa. Come si può osservare dalla Fig. 5.1, utilizzando differenti concentrazioni di Sul7d e SSB si ottiene una stimolazione

dell'attività della Girasi Inversa da parte di SSB anche in presenza di Sul7d, mentre Sul7d da sola, ha un effetto inibitorio sulla stessa.

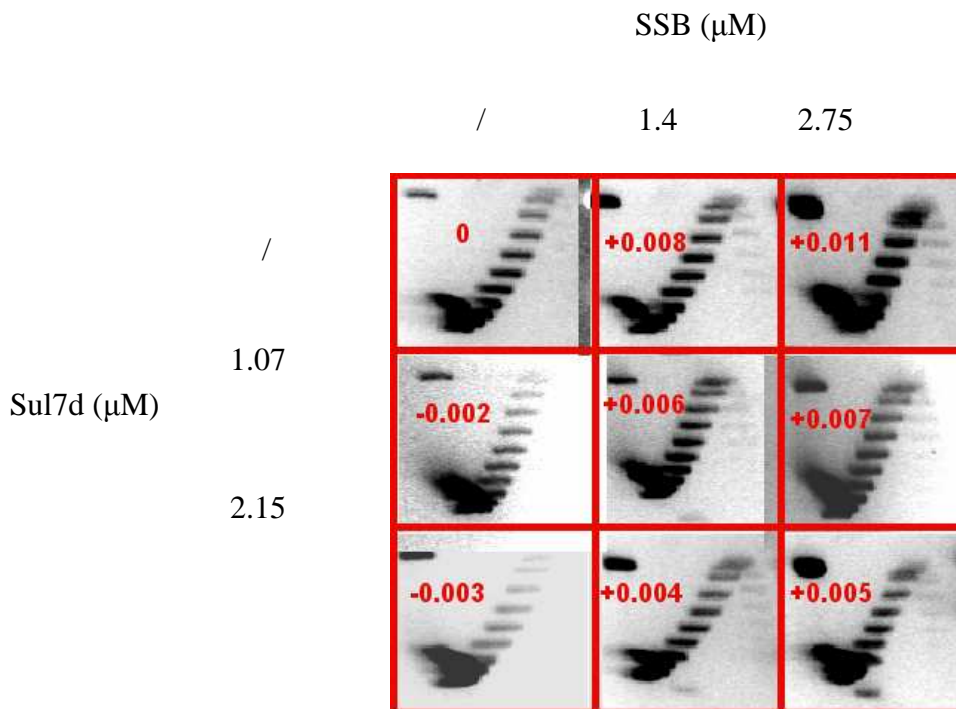


Fig 5.1. Effetto delle DNA binding proteins sull'attività della girasi inversa. il plasmide PGEM3 (200 ng) è stato incubato a 70° per 10' con la girasi inversa purificata (135pM) e con le quantità di SSB e Sul7d indicate. I numeri in rosso derivano dalla differenza tra il valore del σ medio ottenuto in ogni singola reazione e il valore del σ medio della girasi inversa da sola (al quale è stato assegnato il valore 0) (vedi Materiali e Metodi).

Abbiamo inoltre effettuato dei saggi di attività di positive *supercoiling* della Girasi Inversa in presenza delle DNA binding proteins in differenti condizioni. Come si può osservare dalla Fig. 5.2 la stimolazione dell'attività enzimatica è maggiore se SSB viene preincubata con il DNA e in seguito vengono aggiunte la Girasi Inversa e Sul7d.

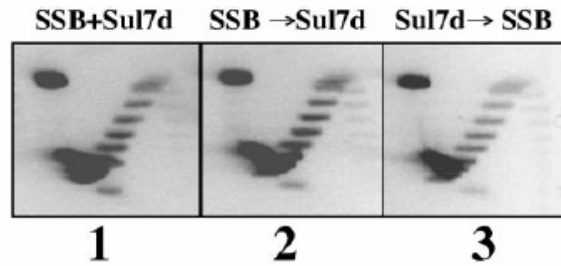


Fig.5.2. In ogni reazione sono presenti le tre proteine nelle seguenti concentrazioni: *Girasi Inversa*, 0.4ng (135 pM); SSB, 1µg; Sul7d 0.3 µg. Nella corsia 1 le tre proteine vengono incubate contemporaneamente con il DNA. Nella corsia 2 SSB viene preincubata con il DNA per 10' a 70°C e poi vengono aggiunte la *Girasi Inversa* e Sul7d. Nella corsia 3 viene preincubata Sul7d.

I dati sperimentali dimostrano che SSB contrasta l'effetto inibitorio di Sul7d sull'attività della *Girasi Inversa* e che tale effetto è maggiore quando la single strand binding protein si trova già legata al DNA. Da tali risultati si può ipotizzare che la modulazione dell'attività della *girasi inversa* mediante le due DNA binding proteins potrebbe giocare un ruolo nella regolazione delle dinamiche conformazionale della cromatina.

Allo scopo di verificare la specificità del fenomeno osservato abbiamo effettuato un saggio di attività di supercoiling positivo della *girasi inversa* in presenza di un altro componente della cromatina di *Sulfolobus solfataricus*: Smj12.

Tale proteina stabilizza la doppia elica e induce modificazioni conformazionali locali del DNA ed è stato dimostrato che in associazione con la topoisomerasi I induce superavvolgimenti positivi (27). Come si può osservare dalla Fig.5.3. SmJ12 non ha effetto sull'attività di ps della *Girasi Inversa*.

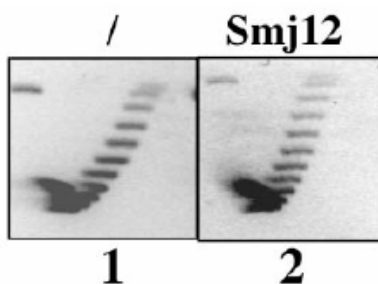


Fig.5.3: Effetto di Smj12 sull'attività della girasi inversa: Il saggio è stato effettuato in condizioni standard utilizzando la *girasi inversa* purificata (135 pM) in assenza (corsia 1) e in presenza di Smj12 (1.25 µM; corsia 2)

I risultati ottenuti sono stati analizzati in modo quantitativo e riportati in grafico (Fig. 5.4) ed evidenziano che SSB stimola l'attività di positive supercoiling della girasi inversa anche in presenza di un componente della cromatina che la inibisce: tale effetto è specifico in quanto in presenza di Smj12 non si verifica alcun effetto.

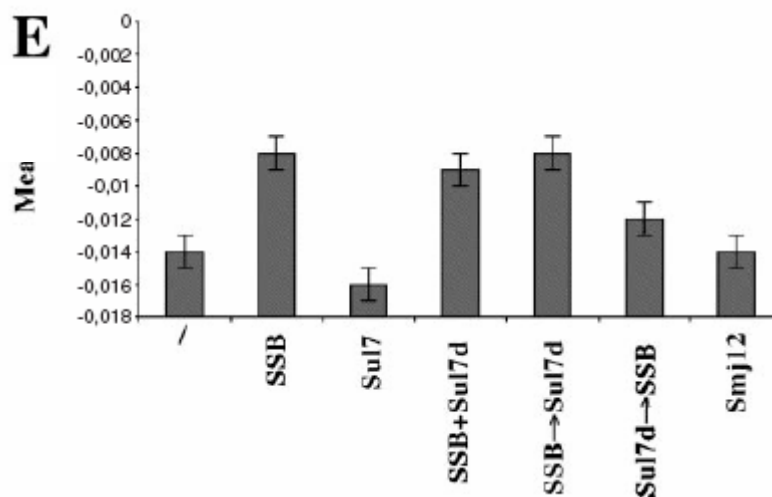


Fig.5.4: **Analisi quantitativa dell'attività della *Girasi Inversa* in presenza di componenti della cromatina** (dai dati sperimentali mostrati nelle Fig.4.1-2-3). I valori dei σ -medi sono stati calcolati come descritto nei materiali e metodi.

6. La girasi inversa coimmunoprecipita con SSB mediante il DNA

Avendo osservato un'interazione funzionale tra la girasi inversa ed SSB abbiamo considerato interessante verificare se le due proteine potessero interagire anche fisicamente. A tale scopo abbiamo effettuato degli esperimenti di co-immunoprecipitazione utilizzando la frazione solubile di un estratto proteico di *S. solfataricus* e un anticorpo policlonale diretto contro SSB. L'estratto immunoprecipitato è stato analizzato mediante western-blot utilizzando gli opportuni anticorpi, ed abbiamo osservato che l'anticorpo contro SSB immunoprecipita sia SSB che la Girasi Inversa indicando un'interazione tra le due proteine. Tale interazione è specifica per SSB e la Girasi Inversa in quanto né Smj12 né Sul7d co-immunoprecipitano con SSB (Fig. 6.1).

Ab-SSB

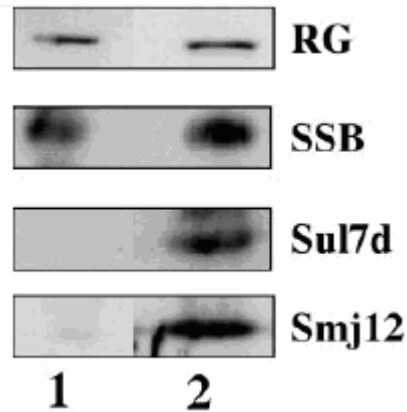


Fig.6.1. Co-immunoprecipitazione SSB-Girasi Inversa: Immunoprecipitazione di un estratto proteico di *Sulfolobus solfataricus* mediante un anticorpo diretto contro SSB. L'estratto immunoprecipitato è stato analizzato mediante western blot utilizzando gli anticorpi diretti contro le proteine indicate. Corsia 1. Estratto immunoprecipitato; corsia 2. Estratto proteico (200 µg).

Per un'ulteriore conferma della specificità dell'interazione abbiamo effettuato un'immunoprecipitazione dell'estratto proteico utilizzando un anticorpo contro Smj12: in queste condizioni la Girasi Inversa non immunoprecipita (Fig. 6.2)

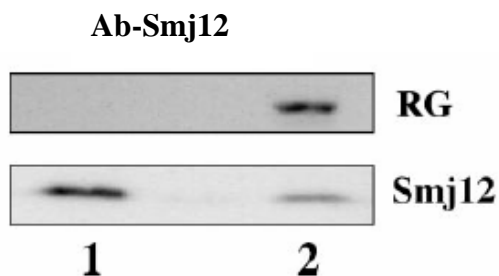


Fig 6.2. Immunoprecipitazione di un estratto proteico di *Sulfolobus solfataricus* mediante un anticorpo diretto contro Smj12. L'estratto immunoprecipitato è stato analizzato mediante western blot utilizzando gli anticorpi diretti contro le proteine indicate. Corsia1.Estratto immunoprecipitato; corsia 2. Estratto proteico (200 µg).

La frazione solubile di un estratto proteico di *Sulfolobus solfataricus* contiene in prevalenza proteine in soluzione ma trattiene anche modeste quantità di DNA frammentato, per cui abbiamo ipotizzato che l'interazione osservata tra le due proteine potrebbe essere mediata dal DNA. Per verificare questa ipotesi abbiamo pre- trattato l'estratto con il Bromuro di etidio, che, intercalandosi tra le basi del DNA, rompe le interazione DNA-proteine. In queste condizioni sperimentali non si osserva più la co-immunoprecipitazione SSB-Girasi Inversa (Fig.6.3).

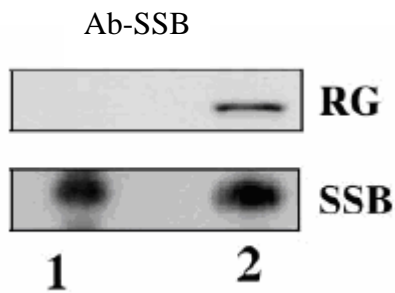


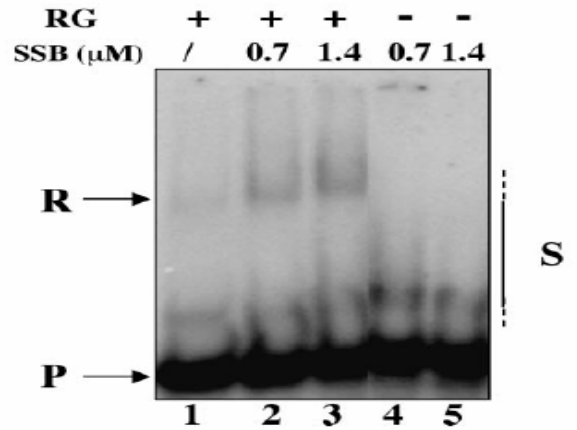
Fig. 6.3: Immunoprecipitazione di un estratto proteico di *S. solfataricus* trattato con Bromuro di etidio (50µg/ml), mediante un anticorpo diretto contro SSB. L'estratto immunoprecipitato è stato analizzato mediante western blot utilizzando gli anticorpi diretti contro le proteine indicate. Corsia 1. Estratto immunoprecipitato trattato con Bromuro di etidio; corsia 2. Estratto proteico (200 µg).

Lo stesso risultato è stato ottenuto preincubando l'estratto con DNase I confermando l'ipotesi che l'interazione tra la Girasi Inversa e SSB richiede la presenza di DNA (dati non mostrati).

7. Effetto di SSB sull'attività della Girasi Inversa in presenza di DNA danneggiato da radiazioni UV.

In studi precedentemente effettuati abbiamo dimostrato che, in vivo, l'esposizione di colture cellulari di *S. solfataricus* alle radiazioni ultraviolette induce la traslocazione della Girasi Inversa sul DNA. Osservando inoltre che nella porzione cromatinica l'enzima mantiene la sua attività, si è ipotizzato che la Girasi Inversa potrebbe avere un ruolo nei meccanismi di riparazione dai danni indotti da UV al DNA. L'attività della girasi inversa risulta invece inibita se viene utilizzato un plasmide contenente lesioni indotte da UV. Ci siamo chiesti se la presenza di SSB potesse influenzare l'attività della Girasi Inversa anche in condizioni di danno. SSB, *in vivo*, risulta ugualmente distribuita nei due compartimenti cellulari in seguito a danno indotto da UV (Napoli et al 2004), ed il suo legame al DNA non varia se viene utilizzato un substrato precedentemente irradiato da UV. Abbiamo valutato l'affinità di legare il DNA della Girasi Inversa utilizzando un oligonucleotide esposto a radiazioni UV: su tale substrato l'enzima mostra una modesta affinità di legame al DNA (simile al controllo non irradiato), ma in presenza di SSB si osserva una significativa stimolazione della sua attività di binding.

Fig.7.1: SSB stimola l'affinità di legame della Girasi Inversa al DNA esposto a radiazione UV (800 J/m²). L' oligonucleotide RGA marcato in 3' (2.4 nM; 4x10⁴cpm per corsia) è stato incubato per 10' con la girasi inversa purificata da sola 1.4 μM (Corsia 1), con 125ng SSB (0.7 μM corsia 2) e con 250 ng di SSB (1.4 μM corsia 3). Nella corsia 4 è presente SSB da sola (0.7 μM); nella 5 SSB 1.4 μM.



Al contrario la sua attività di *positive supercoiling* su un plasmide precedentemente esposto alle radiazioni UV risulta non subire evoluzioni in presenza di SSB ma, all'aumentare della concentrazione di SSB si osserva un proporzionale aumento del DNA in forma "nicked". (fig. 7.2).

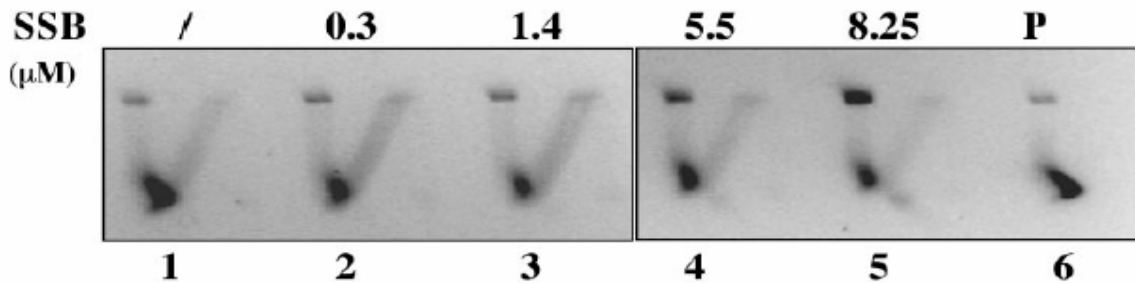


Fig 7.2. Effetto di SSB sull'attività di ps della Girasi Inversa su un plasmide esposto ad UV. L'attività della Girasi Inversa è stata saggiata utilizzando le condizioni standard ma il plasmide è stato precedentemente irradiato con una dose di UV pari a 800 J/m². In tutte le reazioni è presente la Girasi Inversa alla concentrazione di 34 pM (corsie 1-5) e le indicate concentrazioni di SSB. Il pannello 6 rappresenta il plasmide da solo irradiato (P).

Nel loro complesso i risultati ottenuti suggeriscono che SSB stimola il legame della Girasi Inversa al DNA irradiato ma non è in grado di completare la reazione di topoisomerizzazione probabilmente per la presenza di lesioni sul DNA che bloccano

l'enzima sul DNA e come risultato si ottiene un accumulo del plasmide nella forma *nicked*.

CAPITOLO III

Risposta ai danni da alchilazione in *S.solfataricus*

SOMMARIO

In tutti gli organismi viventi l'esposizione ad agenti genotossici fisici e chimici induce l'attivazione di fattori regolatori del ciclo cellulare che riconoscono il danno e possono indurre o alla morte della cellula o al reclutamento di fattori riparatori delle lesioni che favoriscono la ripresa del ciclo cellulare.

Gli agenti alchilanti sono dannosi agenti genotossici che, mediante l'alchilazione delle basi del DNA, ne compromettono la biosintesi e la normale funzionalità.

Il lavoro sperimentale presentato s'inquadra in un progetto volto allo studio degli eventi cellulari conseguenti all'induzione dei danni da alchilazione nell'archeon termofilo *Sulfolobus solfataricus*: in particolare è stato valutato l'effetto di tale danno sulla regolazione dell'enzima Girasi Inversa. La Girasi Inversa è una topoisomerasi caratteristica degli organismi termofili nei quali svolge la funzione di introdurre superavvolgimenti positivi nel DNA. Il ruolo della Girasi Inversa nei suddetti organismi non è ancora chiaro, tuttavia è stato dimostrato che l'enzima, *in vitro*, stabilizza il DNA contro la denaturazione termica, inoltre in precedenza noi abbiamo dimostrato che la *Girasi Inversa* viene reclutata al DNA dopo esposizione alle radiazioni ultraviolette. Tali studi fanno ipotizzare un potenziale coinvolgimento dell'enzima nel mantenimento della stabilità del genoma e nella risposta al danno al DNA.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che, in *S. solfataricus*, il trattamento delle cellule con l'agente alchilante Methyl methanesulfonate (MMS), induce specificamente la degradazione della *Girasi Inversa* probabilmente mediata da una proteasi metallo dipendente. Parallelamente alla scomparsa dell'enzima si osserva la degradazione del DNA genomico e la morte cellulare.

I dati riportati, valutati nel loro complesso, sostengono l'ipotesi di un potenziale coinvolgimento della *Girasi Inversa* nelle intricate e ancora poco conosciute vie della risposta al danno al DNA in *S. solfataricus*.

Referenza

Valenti A., . Napoli A., Ferrara M.C.,Nadal M., Rossi M. and Maria Ciaramella “*Selective degradation of reverse gyrase and DNA fragmentation induced by alkylating agent in the archaeon Sulfolobus solfataricus.*” **Nucleic Acids Research** 2006 Apr 14;34(7):2098-108

RISULTATI

Parte I

Risposta ai danni da alchilazione in *S. solfataricus*

1. Effetto dell'agente alchilante MMS sulla crescita cellulare di *Sulfolobus solfataricus*

Per studiare la risposta ai danni da alchilazione in *Sulfolobus solfataricus* abbiamo utilizzato l'agente chimico Methyl methanesulfonato (MMS) i cui effetti citotossici sono dovuti al trasferimento di un gruppo alchilico in posizione dell'N-7 della guanina e dell' N-3 dell'adenina nella catena di DNA.

L'effetto di agenti alchilanti sugli Archaea non è mai stato riportato.

Una coltura di *S. solfataricus* (ceppo P2) viene incubata ad 80°C fino al raggiungimento, dopo circa 24 h di incubazione, della fase esponenziale ($A_{600}=0.4$; il tempo di replicazione del ceppo è di circa 7 h). In questa fase di crescita le cellule vengono trattate con concentrazioni crescenti di MMS e ne viene valutato l'effetto monitorando l'andamento della crescita delle cellule trattate e di quelle non trattate. Come si può osservare dalla Fig. 1. dopo 24h dal trattamento si osserva l'arresto della crescita delle cellule trattate con concentrazione di MMS superiori a 0.17 mM. Per concentrazioni inferiori o pari a 0.35 mM il blocco della crescita è reversibile ed essa riparte dopo 48 h.

Concentrazioni superiori, invece, inducono l'arresto irreversibile della crescita cellulare.

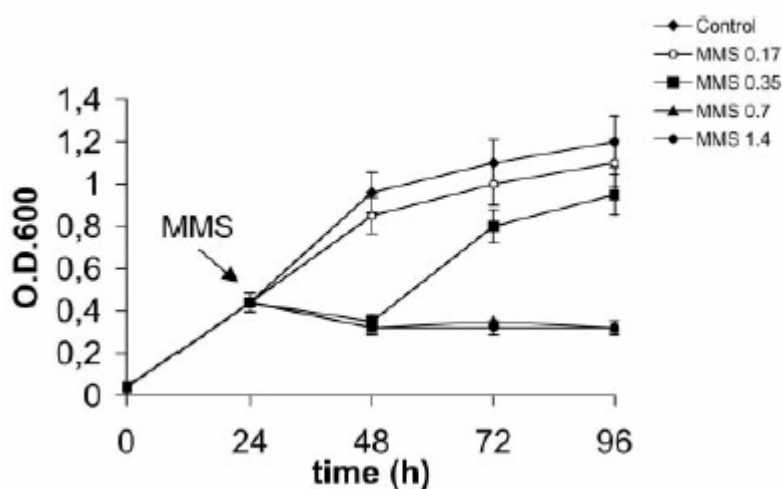


Fig.1. Effetto dell'MMS sulla crescita cellulare di *S. solfataricus*. Una coltura cellulare di *S. solfataricus* è stata incubata ad 80°C per 24 h. Raggiunta la fase esponenziale ($O.D._{600}=0.4$), aliquote di coltura sono state trattate con le indicate concentrazioni di MMS. Le curve di crescita sono state determinate riportando in grafico i valori di $O.D._{600}$ delle colture trattate e non con MMS, in funzione del tempo.

Confrontando i risultati ottenuti con dati presenti in letteratura, si può concludere che la sensibilità di *S. solfataricus* all'MMS è maggiore rispetto a quella degli organismi mesofili: ceppi di *E.coli* sono resistenti a concentrazioni di MMS pari a 1.5 mM e in *S. cerevisiae* l'effetto dell'MMS sulla crescita cellulare, si osserva a concentrazioni superiori a 5 mM (Dinglay,S., et al., 2000; Johnson,R.E., et al., 1998)

2. Effetto dell'MMS sulle proteine totali di *S. solfataricus*

Avendo osservato un effetto dell'MMS sulla crescita cellulare, abbiamo preparato estratti proteici da cellule di controllo e trattate con MMS per valutarne l'effetto sulle proteine totali. Come si osserva dalla Fig 2, l'MMS non genera evidenti variazioni in estratti proteici trattati con MMS.

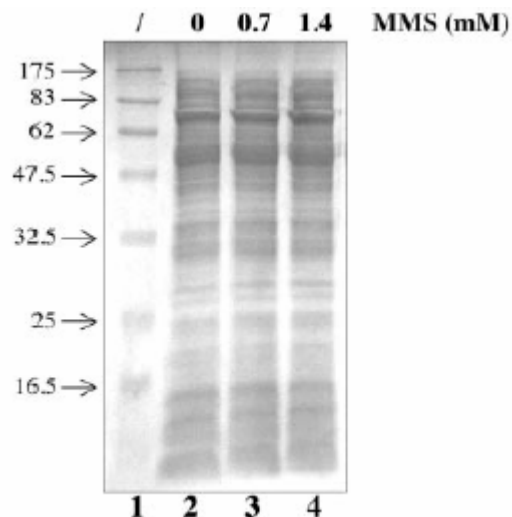


Fig.2 SDS-PAGE di estratti cellulari di *S. solfataricus*. In tutte le corsie sono presenti 60 µg di proteine totali. Gli estratti proteici sono stati preparati dopo 2h di trattamento delle cellule con MMS alle concentrazioni indicate. Corsia 1. Marker di peso molecolare.

3. L'MMS induce una massiva degradazione del DNA genomico

L'agente MMS induce preferenzialmente l'achilazione delle basi guanina e adenina nella catena di DNA: è stato dimostrato che le basi alchilate sono termosensibili, in quanto, incubate a 50°C inducono la rottura della doppia elica (Lundin et al., 2005)

Per studiare l'effetto del trattamento con l'MMS sul DNA genomico, abbiamo incubato le cellule ad 80°C con differenti concentrazioni di MMS ed estratto il DNA a vari tempi dall' incubazione. Come si può osservare dal gel di agarosio mostrato in Fig. 3.1, il DNA genomico viene degradato dopo 2h di trattamento con MMS a concentrazioni superiori a 0.35 mM e la degradazione è direttamente proporzionale alle dosi di MMS utilizzate: alla massima concentrazione di MMS testata (1.4 mM) la degradazione risulta evidente già dopo 30' di incubazione, dopo 2h risulta pressoché completa. (Fig. 3.1 A e B)

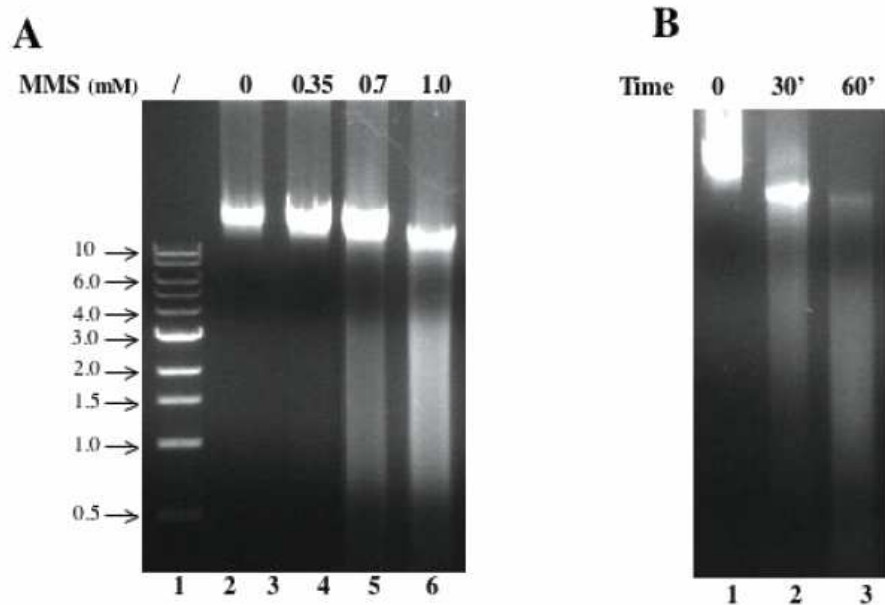


Fig. 3.1: **Effetto dell'MMS sul DNA genomico**; Il DNA genomico (500 ng in ogni corsia) è stato sottoposto ad elettroforesi gel di agarosio 1%. **A**: DNA genomico estratto da cellule di controllo (corsia 2) e trattate per 2h con MMS alle concentrazioni indicate; corsia 1, marker di peso molecolare **B**: DNA estratto da cellule di controllo (corsia 1) e trattate con MMS (1.4 mM) dopo gli indicati tempi di incubazione.

È importante sottolineare che, alla concentrazione di 0.35 mM di MMS, dopo 2 h di incubazione delle cellule con MMS, non si osservano processi degradativi del DNA, ma dopo 6h di incubazione è possibile rilevare una debole ma significativa degradazione. Tuttavia la degradazione risulta fortemente ridotta dopo 24h di incubazione (Fig. 3.2). Tale risultato correla con quanto osservato nelle curve di crescita, che evidenziano una ripresa della crescita cellulare a basse concentrazioni di MMS (0.35 mM), mentre a concentrazioni maggiori viene indotta la morte cellulare.

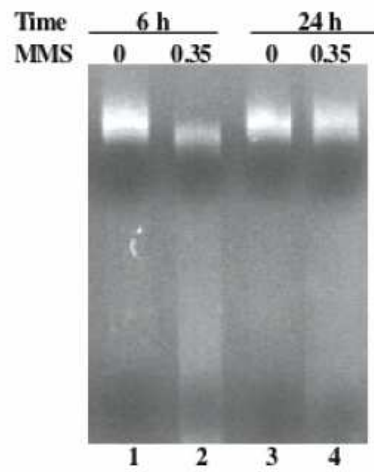


Fig. 3.2: DNA genomico estratto da cellule di controllo (Corsie 1 e 3) e da cellule trattate con MMS 0.35mM (corsie 2 e 4). Il DNA è stato preparato dopo 6 ore dal trattamento (corsie 1 e 2) e dopo 24h (corsie 3 e 4).

Parte II

Regolazione della Girasi Inversa in seguito a danno da alchilazione

1. Il trattamento con MMS induce la degradazione della Girasi Inversa.

Nel nostro laboratorio abbiamo precedentemente dimostrato che, in *S. solfataricus*, la Girasi Inversa viene reclutata al DNA in seguito ad esposizione alle radiazioni UV (Napoli et al., 2004): tale risultato suggerisce l'ipotesi di un potenziale coinvolgimento della Girasi Inversa nella risposta al danno al DNA.

Allo scopo di analizzare l'effetto dell'MMS sulla regolazione della Girasi Inversa in *S. solfataricus*, colture cellulari sono state trattate con differenti concentrazioni di MMS. Dopo 2 h dal trattamento, le cellule sono state prelevate e preparati gli estratti proteici. L'estratto proteico viene frazionato nella porzione solubile, ricca di proteine in soluzione, e nella frazione cromatinica che contiene DNA genomico e proteine ad esso legate (Napoli et al., 2004). La distribuzione della Girasi Inversa nei due compartimenti cellulari viene analizzata mediante western blot degli estratti frazionati, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la Girasi Inversa.

In condizioni normali la Girasi Inversa si distribuisce maggiormente nella frazione solubile dell'estratto (circa il 90%), mentre solo il 10% dell'enzima si trova nella frazione cromatinica. Una simile distribuzione si osserva trattando le cellule per 2h con una concentrazione di MMS pari a 0.35 mM, ma a concentrazioni di MMS più elevate si osserva una notevole riduzione della quantità di enzima (MMS=0.7 mM) fino ad ottenere la totale scomparsa alla più alta concentrazione di MMS utilizzata (MMS=1.4 mM); nella frazione cromatinica non si osservano significative variazioni. (Fig. 1.1).

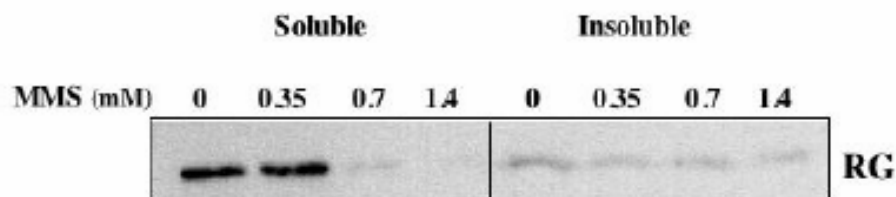


Fig. 1.1 Il trattamento delle cellule con MMS induce la scomparsa della Girasi Inversa. Analisi mediante western blot (utilizzando un anticorpo diretto contro la Girasi Inversa) di estratti di cellule trattate e non con MMS alle indicate concentrazioni. I due pannelli rappresentano i livelli di Girasi Inversa presenti nella frazione solubile e cromatinica dell'estratto. In ogni corsia sono presenti 200 μ g di proteine.

Per controllare la specificità del fenomeno osservato, lo stesso filtro è stato cimentato con anticorpi diretti contro altre proteine. Sono state scelte la topoisomerasi VI di *Sulfolobus*, una topoisomerasi di tipo II non correlata alla Girasi Inversa (Bergerat et al., 1997), e la β -prefoldina, uno chaperone molecolare di *S. solfataricus* (D'Amaro et al., dati non pubblicati). Per entrambe le proteine non si osservano significative variazioni della distribuzione in seguito a trattamento con MMS. (Fig.1.2).



Fig. 1.2. Il filtro mostrato in Fig. 2.1 è stato lavato e cimentato con anticorpi diretti contro la TopoVI e la β -prefoldina

La riduzione della Girasi Inversa dipende dal tempo di incubazione con l'MMS e dalle concentrazioni utilizzate: dopo 30' dal trattamento ad una concentrazione pari 0.7 mM, la quantità di *Girasi Inversa* si riduce del 20% rispetto al controllo, mentre ad 1mM la riduzione dopo 30' è di circa il 50%. (Fig. 1.3).

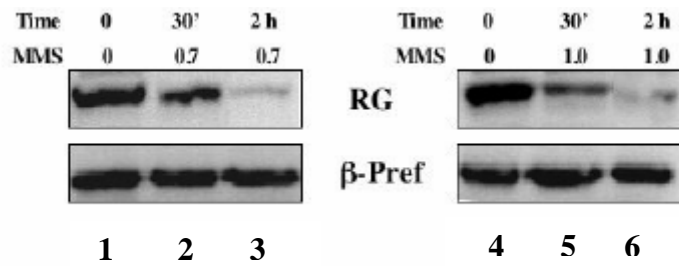


Fig. 1.3: Analisi mediante western blot di estratti proteici (200 μ g in ogni corsia) preparati dopo 30' e 2h di trattamento delle cellule trattate con le indicate concentrazioni di MMS. Nelle corsie 1 e 4 sono presenti estratti di cellule di controllo. Il filtro è stato cimentato prima con un'anticorpo diretto contro la Girasi Inversa (pannello RG); poi come controllo dell'esperimento, è stato lavato e cimentato con un anticorpo diretto contro la β -prefoldina.

Come osservato in Fig. 2.1, dopo 2h di trattamento delle cellule con una concentrazione di MMS pari a 0.35 mM non si osservano variazioni della quantità intracellulare di Girasi Inversa. Al contrario, analizzando la quantità di enzima presente nell'estratto proteico dopo 6 ore di trattamento con la medesima quantità di MMS, si osserva una significativa riduzione del livello di Girasi Inversa. Tale riduzione è transiente in quanto dopo 24 h vengono raggiunti nuovamente i livelli fisiologici di Girasi Inversa (Fig 1.4): questo risultato è in linea con quanto osservato per la crescita cellulare e per la degradazione del DNA genomico: in tutti e tre i casi alle basse concentrazioni di MMS (0.35 mM) si osserva un ripristino delle normali condizioni dopo 24 h dal trattamento (si veda discussione).

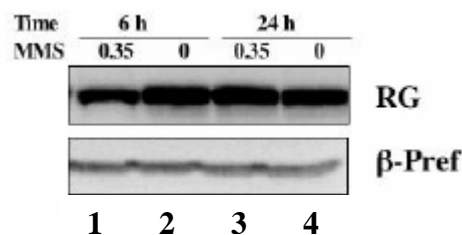


Fig. 1.4: Analisi mediante western blot di estratti proteici (200 μ g in ogni corsia) preparati dopo 6h e 24 h di trattamento delle cellule trattate con MMS alla concentrazione di 0.35 mM. Nelle corsie 2 e 4 sono presenti estratti di cellule di controllo. Il filtro è stato cimentato prima con l'anticorpo diretto contro la Girasi Inversa (pannello RG); poi, come controllo dell'esperimento, è stato lavato e cimentato con un anticorpo diretto contro la β -prefoldina.

2. Effetto dell'MMS sull'attività di *positive supercoiling* della Girasi Inversa

Essendo l'attività di *positive supercoiling* esclusiva della Girasi Inversa, è possibile valutare l'attività dell'enzima in un estratto preoteico di *S. solfataricus*: lo scopo è quello di stabilire se ad una riduzione dell'enzima conseguente al trattamento con MMS, corrispondesse una diminuzione dell'attività di positive supercoiling nella cellula. Per verificare tale ipotesi viene effettuato un saggio in condizioni standard (si veda Risultati Capitolo I) utilizzando estratti proteici di cellule trattate con MMS e di controllo.

A basse concentrazioni di MMS (0.35), non si osservano variazioni dell'attività di *positive supercoiling* rispetto al controllo (Fig. 2.1); aumentando le quantità di agente alchilante, si ottiene una parallela riduzione dell'attività enzimatica che si annulla completamente alla massima concentrazione di MMS utilizzata (1 mM). Tale risultato dimostra che la riduzione dell'attività di *positive supercoiling* nell'estratto, dopo trattamento con MMS, è una conseguenza della riduzione dei livelli intracellulari di Girasi Inversa.

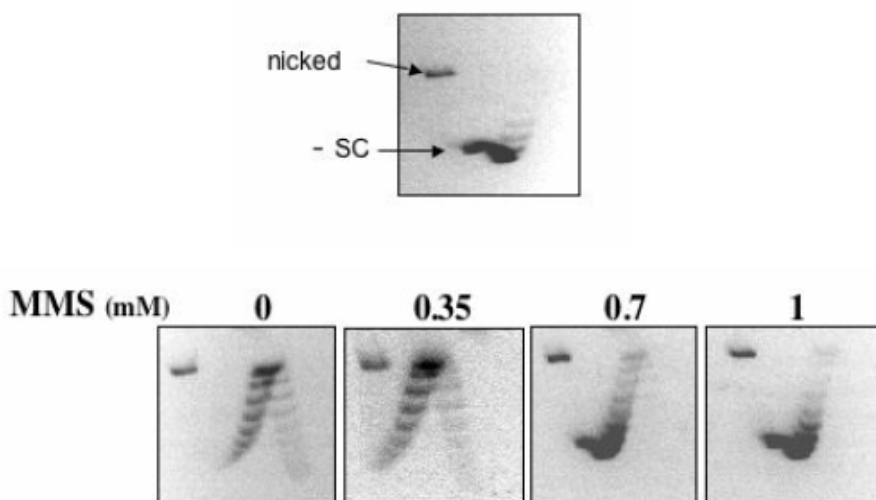


Fig 2. L'attività di positive supercoiling della Girasi Inversa in un estratto proteico di *S. solfataricus* si riduce in seguito a trattamento con MMS. A: migrazione del plasmide (PGEM3) substrato, su gel di agarosio bidimensionale: SC: plasmide negativamente superavvolto. B: Attività di positive supercoiling in estratti proteici di *S. solfataricus* preparati dopo 2h di trattamento con le indicate concentrazioni di MMS.

3. Effetto dell'MMS sulla distribuzione intracellulare di proteine coinvolte nella regolazione delle dinamiche strutturali della cromatina

Allo scopo di ottenere un quadro più ampio riguardante le variazioni indotte da MMS sui livelli di altre proteine associate alla cromatina, abbiamo valutato l'effetto dell'agente intercalante sulla regolazione delle già menzionate DNA binding proteins Sul7d ed SmJ12 (si veda Risultati Capitolo II). In condizioni fisiologiche, sia Sul7d che SmJ12 si distribuiscono preferenzialmente nella frazione cromatinica dell'estratto proteico. In seguito al trattamento delle cellule con MMS si osserva una riduzione di entrambe le proteine nella frazione cromatinica ed un parallelo aumento nella frazione solubile dell'estratto: tale traslocazione è direttamente proporzionale alla quantità di MMS utilizzata (Fig. 3).

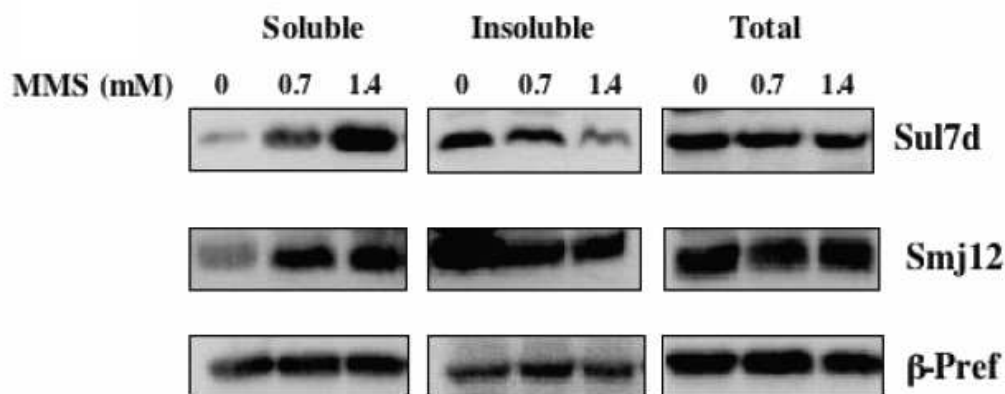


Fig. 3. Western blot di estratti proteici (200 µg) totali, solubili e non solubili (frazione cromatinica). Gli estratti sono stati preparati dopo 2h di trattamento con le indicate concentrazioni di MMS. Lo stesso filtro viene lavato e cimentato con gli anticorpi diretti contro le proteine indicate.

I risultati ottenuti suggeriscono interessanti prospettive sperimentali volte allo studio del coinvolgimento delle componenti cromatiniche nel danno da alchilazione. Riguardo all'attuale lavoro sperimentale confermano oltremodo l'ipotesi che la scomparsa della Girasi Inversa in seguito al trattamento con MMS riguardi specificamente questo enzima: l'effetto osservato non coinvolge, in generale, fattori implicati nella regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA.

4. L'idrossiurea induce l'arresto della crescita cellulare di *Sulfolobus solfataricus* ma non ha effetto sulla regolazione della *Girasi Inversa*.

Allo scopo di verificare la specificità dell'effetto osservato sulla Girasi Inversa in seguito a trattamento delle cellule con MMS, abbiamo utilizzato un altro agente chimico che, sebbene con un differente meccanismo d'azione, induce ugualmente l'arresto della crescita cellulare in *S. solfataricus*. L'idrossiurea (HU) blocca la conversione di ribonucleotidi in desossinucleotidi, inibendo la ribonucleoside difosfato reduttasi, sia batterica che eucariotica: come risultato si ottiene il blocco della replicazione del DNA. Non sono riportati dati riguardanti l'effetto dell'HU sul metabolismo cellulare degli organismi appartenenti al dominio degli *Archaea*. Noi abbiamo osservato che l'HU induce l'arresto della crescita cellulare di *S. solfataricus* ad una concentrazione pari a 10 mM (Fig. 4.1).

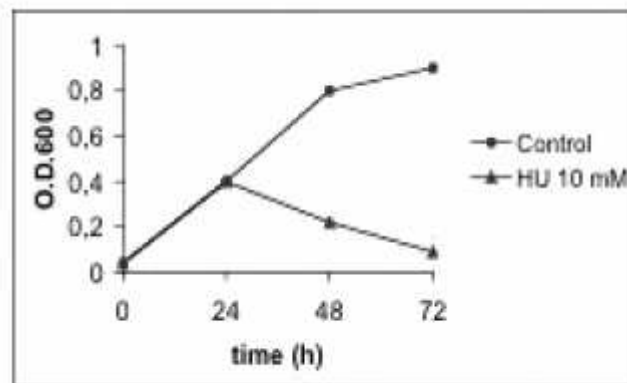


Fig. 4.1: Curva di crescita di cellule di *S. solfataricus* di controllo (Control) e trattate per 2 h con idrossiurea (HU)

Tuttavia non conseguono significative variazioni sul livello e sulla distribuzione della Girasi Inversa in cellule trattate con HU. Inoltre, l'HU non provoca alcun cambiamento dei livelli proteici di Sul7d, di Smj 12 e della topo-VI. (Fig.4.2)

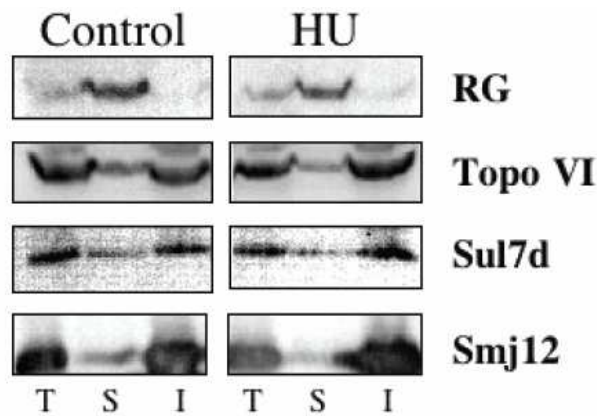


Fig. 4.2: Western blot di estratti proteici (200 μ g) totali (T), solubili (S) e non solubili (I). Gli estratti sono stati preparati dopo 2h di trattamento con HU (10 mM). Lo stesso filtro viene lavato e cimentato con gli anticorpi diretti contro le proteine indicate.

I risultati nel loro complesso sostengono l'ipotesi che la scomparsa della Girasi Inversa in seguito al trattamento con MMS non sia semplicemente la conseguenza di un blocco replicativo o più in generale della morte cellulare ma sia un effetto selettivo del tipo di danno.

5. La scomparsa della Girasi Inversa dipende da un'attività degradativa conseguente al trattamento delle cellule con MMS .

Allo scopo di comprendere se la scomparsa della Girasi Inversa possa essere dovuta ad una ridotta trascrizione in seguito a trattamento con MMS, abbiamo analizzato i livelli di mRNA della Girasi Inversa mediante Reverse Transcription PCR quantitativa in real time (RT-PCR) .

I c-DNA utilizzati per la reazione di RT-PCR sono stati preparati da RNA totali estratti da colture di *S.solfataricus* dopo 2 h di trattamento con differenti concentrazioni di MMS. Tali cDNA sono stati amplificati mediante PCR in real time utilizzando primer specifici per i due geni che codificano per la Girasi Inversa: *TopR1* e *TopR2* (She, et al 2001).

L'analisi quantitativa dei dati ha dimostrato che, in seguito a trattamento con MMS, non si evidenziano significative variazioni nei livelli trascrizionali dei geni *TopR1* e *TopR2*. (fig. 5.1).

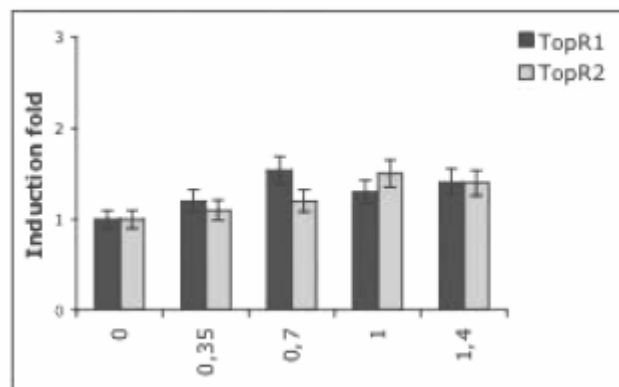


Fig . 5.1: I livelli trascrizionali degli mRNA dei geni *TopR1* e *TopR2* in seguito a 2h di trattamento delle cellule con MMS alle indicate concentrazioni, sono stati determinati mediante real time RT-PCR. I dati sono stati normalizzati rispetto ai livelli di trascrizione basale del 16S rRNA.

Allo scopo di comprendere i meccanismi molecolari coinvolti nella scomparsa della Girasi Inversa in seguito a trattamento con MMS, ci siamo chiesti se tale effetto potesse dipendere dalla neo-sintesi di fattori indotta da MMS. Per verificare tale ipotesi è stato necessario bloccare la sintesi proteica utilizzando la Puromicina che in precedenza avevamo dimostrato bloccare efficacemente la traduzione in *S. solfataricus*. Come si osserva in fig. 5.2, il trattamento con Puromicina induce l'arresto della crescita cellulare in *S. solfataricus* e non interfersisce con l'arresto della crescita indotto da MMS.

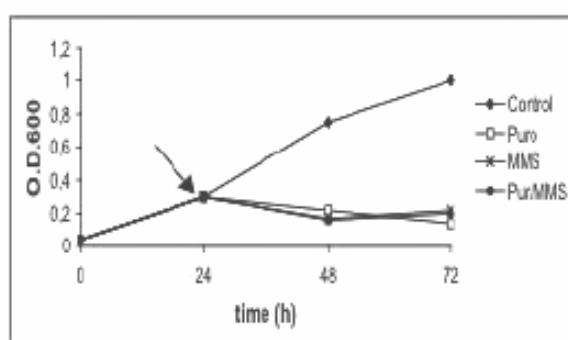


Fig. 5.2: Effetto della puromicina sulla crescita di colture cellulari di *S. solfataricus* trattate e non trattate con MMS. Le colture sono state incubate ad 80°C: raggiunta la fase esponenziale aliquote di coltura sono state trattate con puromicina (50 µg/ml) per 30', quindi è stato aggiunto l' MMS (1mM; curva PurMMS); la curva Pur rappresenta la crescita di colture trattate solo con puromicina (50 µg/ml); la curva MMS quelle trattate con MMS (1mM); la coltura di controllo non subisce alcun trattamento (curva control).

Dopo 2 h dal trattamento con la puromicina la Girasi Inversa è ancora presente nell'estratto proteico sebbene ridotta del 60% (Fig. 5.3). Tale risultato dimostra che l'emivita della Girasi Inversa in *S. solfataricus* è di circa 2h e suggerisce che la scomparsa dell'enzima dopo 2h di trattamento con MMS non è dovuta al semplice turnover della proteina ma potrebbe dipendere da un'attività degradativa.

Per verificare se nella degradazione della Girasi Inversa fossero implicati fattori neo-sintetizzati in seguito a trattamento con MMS, abbiamo bloccato la sintesi proteica con puromicina per 30', prima del trattamento con MMS per 2h. Come si può osservare in Fig. 5.3, l'inibizione della sintesi proteica non impedisce la degradazione della Girasi Inversa suggerendo l'ipotesi che tale degradazione non sia dovuta alla sintesi di fattori indotta da MMS.

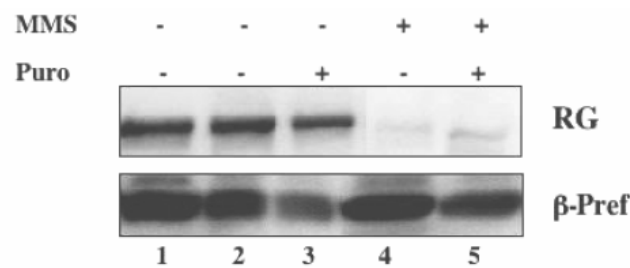


Fig. 5.3. Western blot di estratti proteici (200 µg) in ogni corsia) di cellule trattate e non trattate con gli agenti chimici indicati; corsia 1: estratto di controllo di cellule prelevate prima del trattamento con puromicina; corsia 2: estratto di controllo di cellule prelevate prima del trattamento con puromicina; corsia 3: estratto di controllo di cellule prelevate dopo 2.5 h dai trattamenti; corsia 3: estratto di cellule trattate per 30' con puromicina; estratto di cellule trattate per 2h con MMS (1mM); corsia 3; estratti di cellule incubate con puromicina per 30' a cui segue il trattamento con MMS (1mM) per 2h. Il filtro è stato lavato e cimentato con gli anticorpi indicati.

6. La Girasi Inversa viene degradata da una proteasi metallo-dipendente

I risultati finora ottenuti suggeriscono due possibili ipotesi per spiegare quanto osservato: il trattamento con MMS potrebbe indurre modifiche chimiche sull'enzima (ad esempio la metilazione), rendendolo più sensibile alla degradazione, oppure potrebbe favorire l'attivazione di fattori pre esistenti che degradano la Girasi Inversa.

Per verificare la prima ipotesi abbiamo simulato, *in vitro*, la degradazione della Girasi Inversa, incubando ad 80°C un estratto proteico di cellule di controllo con MMS (1mM). Come si può osservare dalla figura 6.1, nelle condizioni utilizzate non si osservano processi degradativi della Girasi Inversa; suggerendo che quanto osservato, *in vivo*, potrebbe non dipendere da modifiche chimiche indotte direttamente dall'MMS sull'enzima.

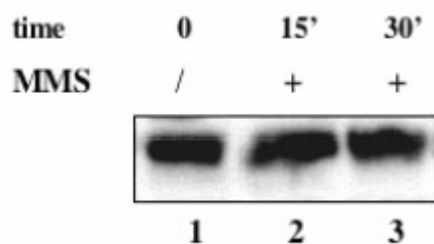


Fig. 6.1: La frazione solubile di un estratto proteico (200 µg) preparato da cellule di controllo, è stata incubata ad 80°C senza MMS (corsia 1) e con MMS 1mM (corsia 2 e 3) per i tempi indicati. La quantità di Girasi Inversa è stata analizzata mediante western blot.

Abbiamo inoltre effettuato un esperimento in cui un estratto proteico di cellule di controllo (contenente la Girasi Inversa) è stato incubato per 30' a 70°C con un estratto di cellule trattate per 1 h con MMS 1mM che contiene ridotte quantità di enzima. Analizzando la miscela mediante western blot, si osserva una notevole riduzione della Girasi Inversa (Fig. 6.2, corsia 2): tale risultato sostiene l'ipotesi che il trattamento con MMS induce l'attivazione di ipotetici fattori implicati nella degradazione della Girasi Inversa. È stato interessante osservare che, perincubando la miscela di reazione con inibitori di proteasi quali l'EDTA e l'1-10 phenantrolina, non si osserva la degradazione; al contrario, la proteolisi persiste se viene utilizzato come inibitore di proteasi il phenylmethsulfonyl fluoride (PMSF).

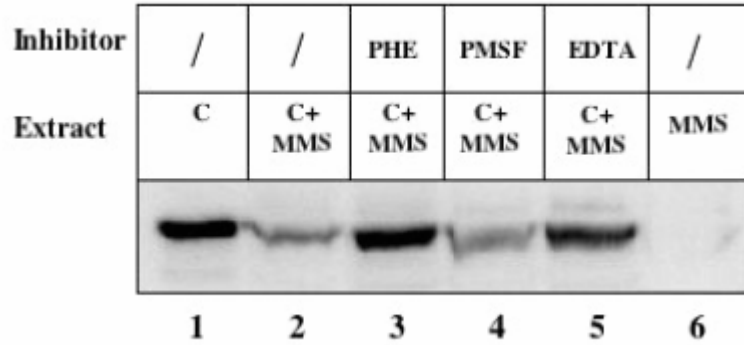


Fig. 6.2: Effetto degli inibitori di proteasi sulla degradazione della Girasi Inversa: Western blot di estratti proteici (200 μ g in ogni corsia). Corsia1: estratto di cellule di controllo incubato per 30' a 70°C. Corsie 2-5: estratti di controllo incubati per 30' con estratti di cellule trattate con MMS (1.4 mM per 2h) in presenza degli inibitori indicati.

I risultati ottenuti sostengono l'ipotesi che la degradazione della girasi inversa in seguito a trattamento con MMS, dipende da una proteasi metallo dipendente.

Abbiamo inoltre dimostrato che la degradazione non viene bloccata in presenza di DNA trattato o non trattato con MMS (Fig. 6.3).

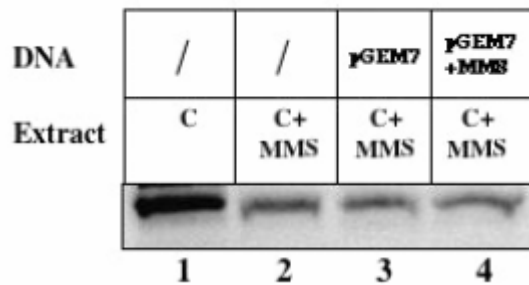


Fig. 6.3: Corsia1: estratto di cellule di controllo incubato per 30' a 70°C. Corsie 2-4: estratti di controllo incubati per 30' con estratti di cellule trattate con MMS (1.4 mM per 2h) in assenza (corsia 2) e in presenza (corsia 3) del plasmide pGem7 (500 ng); corsia 4: come la 3 ma il plasmide PGEM7 viene pre-incubato con per 15' con l'MMS. In ogni corsi sono presenti 200 μ g di proteine.

Sulla base dei dati sperimentali ottenuti è possibile affermare che l'attivazione di processi degradativi che coinvolgono la Girasi Inversa in seguito a trattamento con MMS potrebbe implicare una proteasi metallo-dipendente attivata in seguito all'induzione di

danni da alchilazione e che la presenza di DNA non protegge l'enzima da tale attività proteolitica.

DISCUSSIONE

Il mio lavoro sperimentale ha riguardato principalmente lo studio della Girasi Inversa termofila e degli eventi cellulari in cui essa è coinvolta.

Gli Archaea ipertermofili come *Sulfolobus solfataricus* sono soggetti a numerosi studi rivolti alla comprensione dei meccanismi di stabilizzazione delle loro proteine e del DNA che ne permettono la vita alle alte temperature. Come più volte sottolineato, una caratteristica comune a tutti gli organismi ipertermofili è la presenza del gene che codifica per la Girasi inversa, l'unico presente invariabilmente nei genomi di tutti gli ipertermofili, ma assente nei genomi di mesofili attualmente sequenziati

Diversamente dalle altre topoisomerasi la Girasi Inversa introduce superavvolgimenti positivi nel DNA. Il superavvolgimento positivo è considerato un elemento chiave per l'adattamento alle alte temperature in quanto stabilizza la doppia elica prevenendo locali aperture e favorisce una rapida rinaturazione dopo il passaggio dei complessi trascrizionali e replicativi. Sebbene il ruolo *in vivo* della *Girasi Inversa* non sia ancora chiaro, si è ipotizzato che essa potrebbe svolgere un ruolo nel mantenimento della stabilità del genoma alle alte temperature (Forterre 2002). Studi recenti hanno dimostrato che la *Girasi Inversa* potrebbe essere coinvolta nella risposta al danno al DNA: 1) *in vitro*, l'enzima previene la denaturazione termica del DNA e induce l'aggregazione del doppio filamento (Kampmann, M. and Stock, D. 2004); 2) in *S. solfataricus*, la Girasi Inversa viene specificamente reclutata sul DNA dopo esposizione delle cellule alle radiazioni UV (Napoli et al 2004); 3) nello stesso organismo, l'induzione di danni da alchilazione provoca, in modo specifico, la degradazione della Girasi Inversa, (Valenti et al., 2006; Capitolo III). Tali studi sostengono l'ipotesi che la Girasi Inversa potrebbe essere coinvolta, direttamente o indirettamente, nel riparo e/o nella protezione del DNA.

Le suddette osservazioni suggeriscono, quindi, che lo studio della Girasi Inversa e del suo coinvolgimento nei vari pathways metabolici potrebbe dare un utile contributo alla comprensione dei sistemi utilizzati dagli organismi viventi per preservare l'integrità genomica.

Al fine di studiare la Girasi Inversa dell'archeon termofilo *Sulfolobus solfataricus* ho isolato l'enzima in forma nativa da un estratto proteico di cellule di *S. solfataricus*, mediante l'utilizzo di una combinazione di tecniche cromatografiche. La caratterizzazione dell'attività enzimatica della Girasi Inversa ha messo in evidenza che l'enzima purificato in forma nativa conserva le sue proprietà enzimatiche: in presenza di ATP è in grado di introdurre superavvolgimenti positivi del DNA e in assenza del cofattore rilassa il DNA come una topoisomerasi di tipo IA.

La Girasi Inversa è un enzima termofilo e, come tale, la sua attività enzimatica è influenzata dalla temperatura: ad 80°C si ottiene l'attività di supercoiling positivo risulta più efficiente rispetto alle più basse temperature utilizzate (70°C e 60°C).

La scarsa quantità di Girasi Inversa nativa prodotta (solo 4 µg partendo da 8 litri di coltura cellulare) ha suggerito che, in *S. solfataricus*, la proteina è presente a bassi livelli per cui, al fine di disporre di maggiori quantità di proteina da utilizzare per le manipolazioni sperimentali, è stato utile ricorrere alla produzione della Girasi Inversa in forma ricombinante.

A tale scopo le due isoforme della Girasi Inversa di *S. solfataricus* TopR1 e TopR2 sono state espresse nel ceppo Able C di *E. coli* purificate all'omogeneità per più del 95%, e caratterizzate: entrambe le proteine conservano le proprietà enzimatiche dell'enzima nativo.

La necessità di utilizzare il ceppo Able C che favorisce l'espressione di proteine tossiche, e l'impossibilità di clonare i geni TopR1 e TopR2 in altri ceppi di *E. coli*, ha suggerito l'ipotesi che l'enzima potrebbe interferire negativamente sul metabolismo cellulare dell'organismo ospite. È stato osservato, infatti, che l'espressione eterologa delle due proteine induce un rallentamento della crescita cellulare di *E. coli*. Tale effetto è più marcato quando le cellule vengono incubate a 37°C, temperatura fisiologica per *E. coli*, mentre a temperature inferiori (22°C), la presenza della girasi inversa è maggiormente tollerata. In entrambi i casi risulta quindi evidente che l'enzima è dannoso per l'organismo ospite e che tale effetto potrebbe essere conseguenza dell'over-espressione della proteina, del legame al DNA o potrebbe essere dovuta ad un'attività (non necessariamente topoisomerasica) che va ad interferire con processi vitali per la cellula come replicazione trascrizione o ricombinazione.

Inoltre è importante sottolineare che sia la TopR1 che la TopR2 sono instabili e tendono a degradarsi sia alla temperatura fisiologica che alla temperatura inferiore: tuttavia la bassa temperatura preserva maggiormente l'integrità delle due proteine.

E' stato osservato che l'espressione dell'isoforma *TopR1* in *E. coli* è più dannosa rispetto alla TopR2. Tale discrepanza potrebbe essere dovuta alla differente stabilità delle due proteine nell'organismo ospite: l'isoforma TopR2 che si presenta quasi completamente proteolizzata risulterebbe per questo motivo meno tossica; al contrario la TopR1, conservando maggiormente la forma intatta, potrebbe avere un più rilevante effetto negativo sul metabolismo cellulare di *E. coli*.

Sebbene sia evidente che la *Girasi Inversa* sia particolarmente soggetta a degradazione in *coli* non è ancora chiaro a cosa sia imputabile la sua elevata instabilità.. Si può ipotizzare che la degradazione delle proteine potrebbe essere conseguenza di un meccanismo di difesa attuato dall'organismo ospite per impedire l'interferenza di tale enzima nei processi cellulari fondamentali per la sua sopravvivenza. Tuttavia, la tendenza alla degradazione delle proteine si osserva anche in seguito alla loro purificazione: entrambe le isoforme si proteolizzano in seguito a scongelamento e ricongelamento suggerendo che la *Girasi Inversa* potrebbe presentare legami peptidici particolarmente esposti alla degradazione spontanea o possedere un'attività autoproteolitica. Per verificare le suddette ipotesi saranno necessari ulteriori prove sperimentali.

Le DNA single strand binding protein rappresentano un'altra classe di proteine coinvolte nei processi cellulari DNA dipendenti. Tali proteine, stabilizzando il DNA a singolo filamento, giocano un ruolo essenziale nei meccanismi di trascrizione, replicazione, ricombinazione e riparo.

Numerosi dati presenti in letteratura mettono in evidenza che le *single strand binding proteins* influenzano l'attività di altre proteine o complessi proteici mediante l'interazione diretta proteina-proteina o, interagendo indirettamente con esse tramite il DNA. In particolare è stato dimostrato che le single strand binding interagiscono con i complessi topoisomerasi-elicasi coinvolti nei processi di ricombinazione e nel mantenimento della stabilità del genoma (Sikder,D. et al., 2001)

Il mio lavoro sperimentale ha dimostrato che, in *S. solfataricus*, la single strand binding SSB interagisce fisicamente con la Girasi Inversa mediante il DNA e ne influenza l'attività mediante la stimolazione di tutti gli stadi della reazione di topoisomerizzazione: il legame al DNA, il taglio e la formazione del complesso covalente enzima-DNA ed infine, la riligazione dei due filamenti.

La Girasi Inversa introduce superavvolgimenti positivi del DNA in presenza di ATP, ma in assenza del cofattore, l'enzima è in grado solo di rilassare il DNA. La SSB stimola entrambe le reazioni di topoisomerizzazione.

La Girasi Inversa lega preferenzialmente regioni di DNA a singolo filamento fiancheggiate da regioni a doppio filamento. Nel modello da noi proposto, SSB, stabilizzando le regioni di DNA parzialmente denaturate dalla debole attività di svolgimento dell'elica o semplicemente dalla denaturazione spontanea dovuta alle alte temperature, favorirebbe il reclutamento della Girasi Inversa in tali zone stimolando il binding dell'enzima DNA ed i successivi stadi della reazione di topoisomerizzazione (taglio del DNA, il passaggio del filamento attraverso il sito di taglio e la riligazione dei due filamenti). (Fig.1).

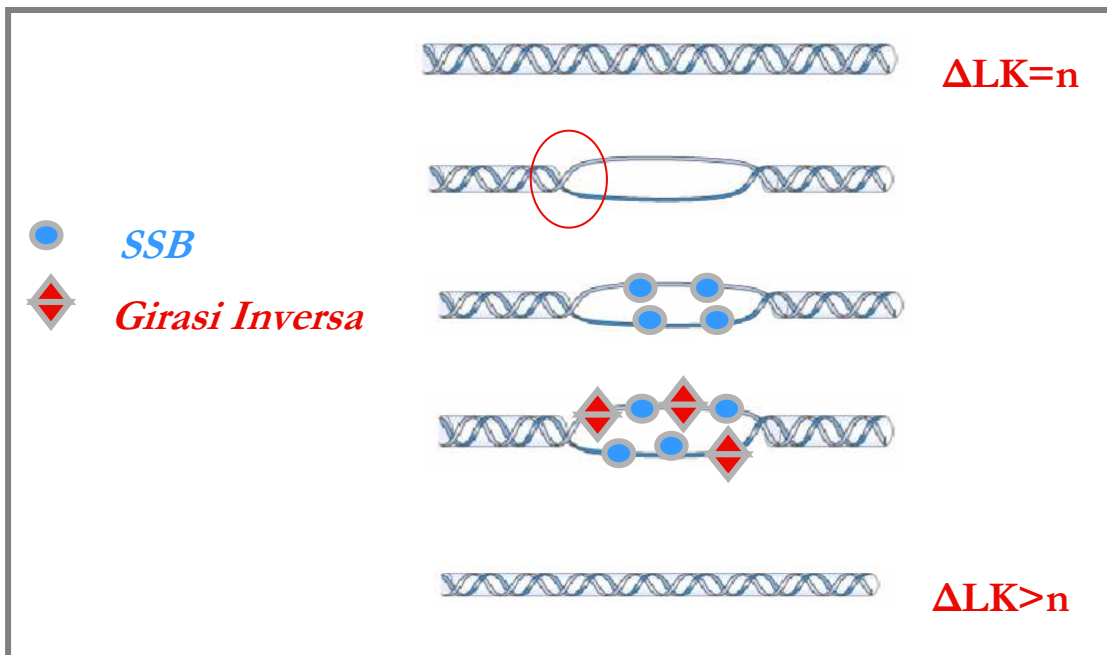


Fig.1: **Modello di interazione fisica e funzionale tra SSB e la Girasi Inversa.** La Girasi Inversa lega preferenzialmente regioni di DNA a singolo filamento fiancheggiate da regioni a doppio filamento. SSB, stabilizzando tali regioni, promuove il reclutamento della Girasi Inversa stimolando il binding dell'enzima DNA ed i successivi stadi della reazione di topoisomerizzazione (taglio del DNA, il passaggio del filamento attraverso il sito di taglio e la riligazione dei due filamenti). Per effetto dell'attività di supercoiling positivo della Girasi Inversa, si ottiene una molecola di DNA con un aumentato numero di legame

Al fine di determinare la rilevanza biologica dell'effetto osservato abbiamo testato l'attività della Girasi Inversa in presenza di altri componenti della cromatina di *S. solfataricus*. In precedenza è stato dimostrato che Sul7d, un componente molto abbondante della cromatina di *S. solfataricus* inibisce l'attività della Girasi Inversa (Napoli et al., 2002) suggerendo che, *in vivo*, entrambe le proteine potrebbero giocare un ruolo nella regolazione delle dinamiche conformazionali del DNA mediante la modulazione dell'attività della Girasi inversa.

In precedenza abbiamo dimostrato che, *in vivo*, la Girasi inversa viene reclutata al DNA in seguito ad esposizione alle radiazioni ultraviolette e che, *in vitro*, le lesioni indotte da

UV al DNA inibiscono l'attività di supercoiling positivo e favoriscono l'accumulo del complesso covalente enzima-DNA (Napoli et al., 2004). Tali studi suggeriscono che la rilocalizzazione della Girasi Inversa in seguito a danno da UV e la regolazione della sua attività enzimatica potrebbero giocare un ruolo nella risposta al danno da UV. A tal proposito abbiamo osservato che, *in vitro*, SSB stimola il legame e il taglio al DNA contenente lesioni indotte da UV ma non stimola l'attività della Girasi Inversa su un plasmide contenente le medesime lesioni. Questi risultati fanno ipotizzare che, in presenza di danni al DNA indotti da UV, SSB, stimolando il legame e la formazione dei complessi covalenti dell'enzima, favorirebbe l'accumulo degli intermedi di reazione che, a causa delle lesioni, resterebbero irrisolti: l'enzima intrappolato sul DNA potrebbe essere utile al reclutamento di altri fattori del riparo e/o della ricombinazione.

L'ipotesi che la Girasi inversa potrebbe giocare un ruolo nei meccanismi di riparo e protezione del DNA è sostenuta da altre evidenze sperimentali: è stato dimostrato che la Girasi inversa di *A. fulgidus* protegge il DNA, *in vitro*, prevenendo la degradazione termica (Kampmann & Stock, 2004), inoltre, noi abbiamo dimostrato che in *S. solfataricus*, l'enzima viene specificamente degradato, *in vivo*, in seguito all'induzione di danni da alchilazione (Valenti et al., 2006).

Quest'ultimo dato è emerso da studi effettuati durante il mio lavoro di tesi sperimentale in cui è stato valutato l'effetto dei danni indotti dall'agente alchilante MMS in *S. solfataricus*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento delle cellule di *S. solfataricus* con MMS induce, oltre alla degradazione specifica della Girasi Inversa, altri due fondamentali eventi: l'arresto della crescita cellulare e la concomitante degradazione del DNA genomico.

È importante sottolineare che i tre effetti potrebbero essere correlati: a basse concentrazioni di MMS (0.35 mM) si osserva una parziale e transitoria degradazione della Girasi Inversa e del DNA genomico, così come, alle medesime concentrazioni, si assiste ad un concomitante e momentaneo arresto della crescita cellulare. La successiva ripresa della crescita cellulare è accompagnata dal ripristino dei normali livelli intracellulari di Girasi Inversa e dell'integrità del DNA genomico. Analogamente, a concentrazioni di MMS più alte (0.7-1.4 mM) si osserva una massiva degradazione della

Girasi Inversa e del DNA genomico e si ottiene l'arresto persistente della crescita cellulare.

È stato precedentemente dimostrato che le basi alchilate sono tremolabili (Lundin, C. et al., 2005). I risultati da noi ottenuti dimostrano che *S. solfataricus* è molto più sensibile all'MMS rispetto a *S. cerevisiae* in cui si osserva un effetto sulla crescita cellulare a concentrazioni di MMS 5 volte maggiori rispetto a quelle che causano l'arresto della crescita cellulare di *S. solfataricus* (Johnson, R.E., et al., 1998; Valenti et al., 2006). La maggiore sensibilità dell'organismo termofilo rispetto al mesofilo potrebbe essere conseguenza dell'alta temperatura (la temperatura ottimale di crescita *S. solfataricus* è di 80°C) che renderebbe il DNA alchilato dall'MMS particolarmente sensibile alla degradazione provocando, di conseguenza, l'arresto della crescita.

L'evidenza che a basse concentrazioni di MMS non si osserva la completa degradazione della Girasi Inversa e che, dopo alcune ore dal trattamento, si ottiene un recupero delle condizioni fisiologiche, ha suggerito l'ipotesi che, in tali condizioni, la presenza della Girasi inversa potrebbe favorire la protezione del DNA contro la degradazione. Al contrario, a concentrazioni più alte di MMS, la degradazione permanente dell'enzima renderebbe il DNA maggiormente esposto all'effetto combinato del danno da alchilazione e dell'alta temperatura. (Fig.2).

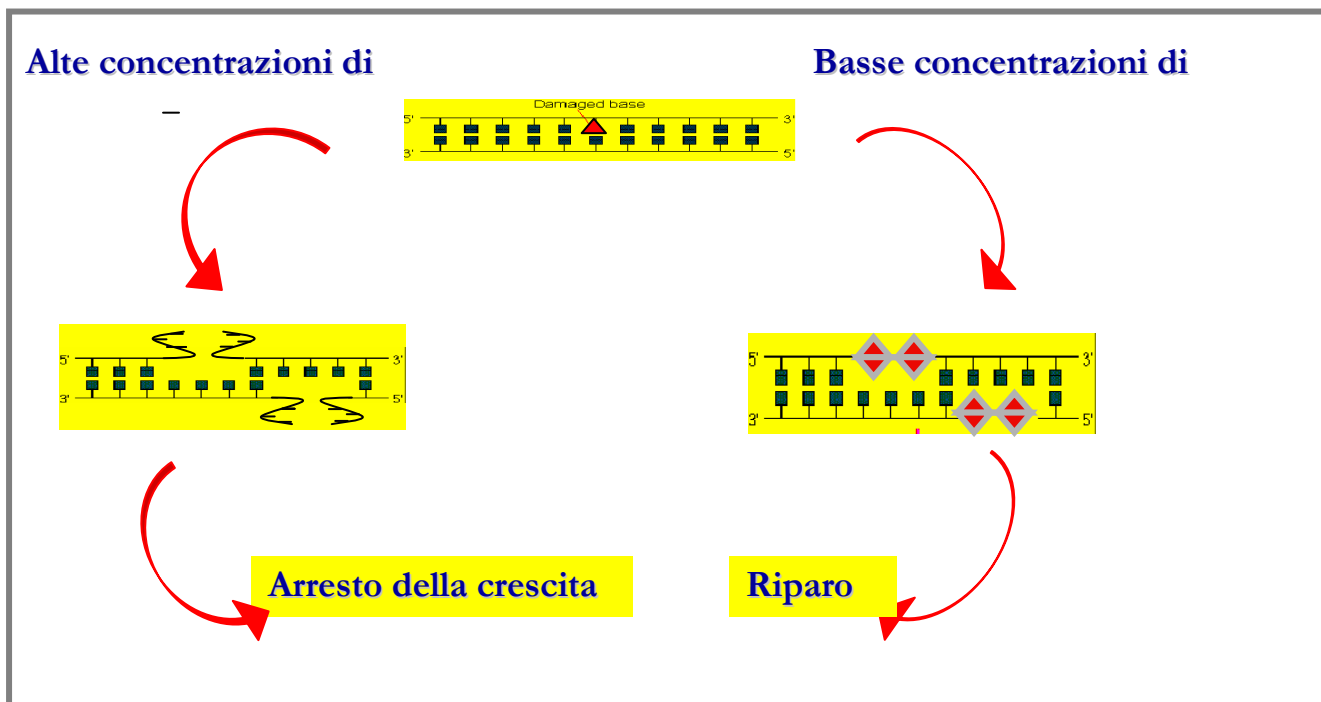


Fig.2: Rappresentazione schematica dell'effetto dei danni da alchilazione in *S. solfataricus*. Alle basse concentrazioni di MMS utilizzate la Girasi Inversa non viene degradata per cui potrebbe proteggere il DNA dalla degradazione e favorire la ripresa della crescita cellulare. Alle alte concentrazioni, quando il danno è maggiore, la degradazione permanente dell'enzima renderebbe il DNA maggiormente esposto all'effetto combinato del danno da alchilazione e dell'alta temperatura promuovendo il blocco della crescita cellulare.

Il fenomeno osservato è specifico per la Girasi Inversa: non si verifica per la TopoVI (un'altra topoisomerasi di *S. solfataricus*) né per altre proteine coinvolte o meno nei processi metabolici che riguardano il DNA.

Il segnale di degradazione della Girasi inversa è, inoltre, specifico del danno da MMS in quanto non si verifica in seguito a danni indotti da UV (in cui si osserva la rilocalizzazione dell'enzima) e non è dovuto al semplice blocco della replicazione cellulare. Infatti, il trattamento delle cellule con altre droghe che inibiscono la crescita cellulare di *S. solfataricus* quali l'idrossiurea, l'actinomicina D e la puromicina non sortisce alcun effetto sulla Girasi Inversa.

Qual è il segnale che favorisce la degradazione della Girasi inversa in seguito all'induzione di danni da MMS?

L'evidenza che, *in vitro*, il trattamento di un estratto proteico di *S. solfataricus* di controllo (in cui è presente la Girasi inversa) con l'MMS non provochi alcun tipo di effetto sulla proteina, ha escluso la possibilità che la degradazione della Girasi Inversa osservata nelle cellule, fosse una conseguenza di modifiche chimiche indotte dall'agente alchilante sulla proteina. Esta osservazione ha suggerito che la degradazione della Girasi Inversa possa dipendere da fattori neo sintetizzati in seguito all'induzione di danni da alchilazione. Tuttavia l'incubazione delle cellule con la puromicina (un inibitore della sintesi proteica) prima del trattamento con MMS, non impedisce la degradazione della Girasi inversa, per cui tale effetto non è mediato da fattori neo-sintetizzati.

Ai fini della comprensione dei meccanismi responsabili della degradazione della Girasi Inversa è stato determinante osservare che, se estratti proteici di cellule di controllo vengono incubati ad 80°C con estratti di cellule trattate con MMS, si ottiene la degradazione della Girasi inversa e tale effetto viene inibito se la miscela di reazione viene pretrattata con inibitori di metallo-proteasi (EDTA e Fenantrolina). Al contrario l'inibitore di proteasi PMSF non sortisce alcun effetto. Tali evidenze sperimentali suggeriscono che la degradazione della Girasi inversa potrebbe essere mediata da una proteasi metallo-dipendente attivata in seguito all'induzione di danni da alchilazione; tuttavia risulta ancora oscuro il motivo per cui sia necessario questo tipo di regolazione.

È stato dimostrato che il trattamento delle cellule umane con MMS induce l'attivazione di proteasi che degradano in modo specifico la metiltrasferasi DNMT1 (Chuang,L.S., Tan,E.H et al., 2002) e l'esonucleasi EXO1B, che intervengono nei processi riparativi del DNA (El-Shemerly,M, et al., 2005). Si è ipotizzato che, in seguito al danno al DNA l'eliminazione di fattori necessari al riparo delle lesioni favorisca il processo apoptotico. A sostegno di questa ipotesi è stato riportato che la ricombinasi Rad51, la proteina MLH1 e l'elicasi BLM responsabile della sindrome di Bloom, vengono proteolizzate dalle caspasi durante l'apoptosi (Freire,R., et al., 2001; Chen, F et al., 2004; Bschof O. et al., 2001; Hickson,I.D. et al., 2003).

La BLM è un'elicasi della famiglia RecQ che interagisce con la Topoisomerasi III: come già sottolineato, i complessi topoisomerasi-elicasi sono evolutivamente conservati e si ipotizza che siano coinvolti nel riparo e nel mantenimento della stabilità del genoma. E'

interessante osservare che la proteolisi della Bloom mediata dalle caspasi non influenza la sua attività elicasi ma ne inibisce l'interazione con la Topoisomerasi III, suggerendo che il complesso elicasi-topoisomerasi potrebbe interferire con il processo apoptotico (Freire,R. et al., 2001).

La Girasi inversa rappresenta un modello di cooperazione tra le topoisomerasi e le elicasi: la sua degradazione potrebbe favorire, in caso di danno da MMS, l'arresto della crescita cellulare analogamente a quanto osservato nell'uomo relativamente alla degradazione della BLM.

Attualmente non sono presenti dati in letteratura che riguardano l'attivazione di specifiche proteasi in seguito all'induzione di danni al DNA in Archaea, non sono stati identificati geni omologhi alle caspasi eucariotiche nel genoma degli organismi appartenenti a tale dominio, e non ci sono evidenze del coinvolgimento di segnali che promuovono la morte cellulare. Risulta quindi interessante l'identificazione della proteasi coinvolta nella degradazione della Girasi inversa e la comprensione del ruolo biologico di tale evento in *S. solfataricus*.

MATERIALI E METODI

CAPITOLO I

1. Allestimento di una coltura di *Sulfolobus solfataricus*

Sulfolobus Solfataricus ceppo P2 cresce a 80°C e a pH acido di ~ 3.5 in un terreno ricco costituito essenzialmente da due soluzioni miscelate in rapporto di 1: 1, il terreno di Brocks e una soluzione di sali.

Un litro di terreno di Brocks 2x è composto da:

- * 2 g estratto di lievito
- * 2 g glucosio
- * 2 g casamminoacidi

Un litro di soluzione salina 2x contiene:

- * 6,2 g KH_2PO_4
- * 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- * 0,4 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- * 0,38 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- * 3,6 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$
- * 9 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$

L'allestimento di una coltura cellulare di *Sulfolobus Solfataricus* prevede due steps:

① Preinoculo

Si inoculano le cellule in forma di pellet in un volume massimo di 300-400 mL di terreno e si lasciano crescere per ~ 24 ore in agitazione costante a 80°C. Si parte, generalmente, da una densità cellulare di ~ 0.03-0.04 OD, come rilevato dalla lettura spettrofotometrica a 600 nm, per giungere ad una densità ottica di ~ 0.3-0.4 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (fase esponenziale) dopo 24 ore di incubazione a 80°C, rispettando il tempo di duplicazione di 7 ore.

② Inoculo

Si diluisce il preinoculo 1:10 con terreno preriscaldato a 80°C e si reincuba la coltura a 80°C fino al raggiungimento della fase di crescita esponenziale (A_{600} :0.3-0.4).

2. Preparazione di estratti cellulari di *S. solfataricus* P2

Le colture di *S. solfataricus* sono allestite secondo la procedura riportata nella sezione precedente. A tempi prefissati si prelevano aliquote di coltura e si centrifugano a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il pellet risultante è risospeso in 1/500 del volume iniziale della coltura con PBS-T (0.08 M Na_2HPO_4 , 0.02 M NaH_2PO_4 , 0.2 M NaCl, 0.1% Triton). La lisi cellulare è indotta mediante tre cicli di freeze-thawing (5' in ghiaccio secco e 5' a 37°C). L'estratto totale è poi centrifugato a 13200 rpm per 30 minuti a 4°C in modo da separare la frazione solubile dalla frazione pellet; quest'ultima è risospesa in metà del volume iniziale con PBS-T. Gli estratti totali e pellet sono, inoltre, siringati con una siringa da 1 mL in modo da facilitare le successive manipolazioni. Gli estratti così preparati sono conservati a -80°C con l'aggiunta del 20 % in volume di glicerolo. La concentrazione proteica degli estratti è determinata con il metodo BioRad.

3. Purificazione della Girasi Inversa nativa

Per la purificazione della Girasi Inversa nativa sono stati preparati 8 litri di una coltura cellulare di *S. solfataricus* da cui sono state estratte le proteine come descritto nel paragrafo precedente. La frazione solubile dell'estratto proteico è stata sottoposta ai seguenti step cromatografici effettuati mediante *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC):

5. Cromatografia di affinità su supporto di Eparina, sfruttando la capacità di legare il DNA da parte della *Girasi Inversa*.
6. Cromatografia ad interazione idrofobica (Phenyl Sepharose).

La *Girasi Inversa* nativa, avente un peso molecolare di 130 KDa, è stata purificata in forma omogenea per più del 95% e sono stati ottenuti 4 µg totali di proteina

4. Clonaggio ed espressione delle proteine ricombinanti TopR1 e TopR2

Nel genoma del ceppo P2 di *S. solfataricus* sono presenti due geni: TopR1 e TopR2: entrambi i geni sono stati amplificati dal DNA genomico utilizzando oligonucleotidi complementari alle estremità 5' e 3' terminali aventi una sequenza per il riconoscimento degli enzimi di restrizione SacI e PstI rispettivamente. I due geni sono stati clonati nel vettore Pque31 utilizzando il ceppo Able C di *E. coli*.

Lo stesso vettore è stato utilizzato per l'espressione delle proteine mediante induzione del promotore Lac con Isopropil-tiogalattoside. Le migliori condizioni di espressione di TopR1 sono state ottenute inducendo una coltura cellulare con 1mM di IPTG ad O.D.₆₀₀=0.6 per circa 18 ore a 22°C. Per TopR2 si ha inducendo la coltura cellulare con 0.5 mM IPTG ad o.D. 600= 1 per 18h a 22°C.

6. Purificazione delle proteine ricombinanti TopR1 e TopR2

La purificazione di entrambe le proteine su colonna His-Trap HP da 1 ml (Amersham) e Phenyl Sepharose da 26 ml è stata eseguita su un sistema FPLC. Tre litri di coltura sono stati cresciuti nel brodo LB con l'aggiunta di 50 µg/ml di ampicillina fino a 0.6 OD₆₀₀ (per l'isoforma TopR1) e fino a 1 OD₆₀₀ (per l'isoforma TopR2); la coltura cellulare è stata indotta con 1 mM IPTG per l'espressione della proteina TopR1 e 0.5 mM di IPTG per l'espressione di TopR2. Dopo circa 18 ore le cellule sono state centrifugate per 15' a 4.000 rpm, sospese nuovamente in 30 ml del buffer di lisi (20mM NaH₂PO₄, 20mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 500 mM NaCl, 10mM imidazolo) e rotte con sonicatore. Le cellule sono state sottoposte ad una ulteriore lisi con una digestione enzimatica con Lisozima e Benzanase a 37°C per 30' ed il lisato è stato centrifugato a 14.500 rpm per 30' a 4°C. Il surnatante è stato filtrato e caricato sulla colonna.

Per quanto riguarda la preparazione dell'estratto da usare per la purificazione della proteina ricombinante TopR2, è stata eseguita anche una termoprecipitazione che prevede 10' a 70°C; dopo la sospensione cellulare è stata centrifugata per 30'a 14.500

rpm ed ho recuperato il surnatante, il quale è stato filtrato e caricato sulla colonna, pre-equilibrata con 10 mM imidazolo. La colonna è stata lavata due volte con i buffer preparati con 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 e 20 mM imidazolo. L'eluizione della proteina è stata fatta creando un gradiente di imidazolo che va dal 2% al 100%. Le frazioni sono state controllate su SDS-PAGE. Le frazioni 10-14 della purificazione della proteina TopR1 e quelle 6-10 della TopR2 sono state riunite e concentrate a 2 ml mediante ultrafiltrazione usando una membrana (Millipore) con un cut-off di 30.000 Da.

Successivamente i 2 ml sono stati diluiti 1:5 in un buffer preparato con 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 1.2 M NaCl, 0.8 M Ammonio Solfato, 1 mM EDTA e 1 mM DTT e filtrati per poi essere caricati sulla colonna Phenyl Sepharose pre-equilibrata con lo stesso buffer. L'eluizione della proteina si è ottenuta creando un gradiente di ammonio solfato che va dal 100% allo 0%. Le frazioni sono state controllate su SDS-PAGE; le frazioni 103-104 e 105-108 della proteina TopR1 e quelle 108-111 della TopR2 sono state unite, concentrate sempre usando l'ultrafiltrazione e dializzate per circa 18 h a 4°C nel seguente buffer di dialisi 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄ pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 100 mM NaCl e 0.5 mM DTT. Successivamente ho determinato la concentrazione di entrambe le proteine con il metodo BioRad. Ho Sono stati ottenuti 4 mg della proteina TopR1 e 150 µg della proteina TopR2

7. Saggio di attività della Girsasi Inversa

Per saggiare l'attività di supercioling positivo dell Girasi Inversa viene preparata la miscela di reazione standard (20 µl) che contiene:

- Il plasmide pGEM3 (200ng)
- Buffer della girasi inversa (35 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM Na₂EDTA, 30 mM MgCl, 2mM DTT, 1 mM ATP)
- Girasi inversa purificata (40-100 ng) o estratti proteici di *S. solfataricus* (2.5-5 µg)

La miscela viene poi incubata per 5' a 70°C e la reazione viene interrotta aggiungendo 1% SDS. Per saggiare l'attività di rilassamento viene utilizzata la stessa miscela di reazione senza l'ATP. I prodotti della reazione sono stati analizzati su gel bidimensionale d'agoroso all'1%, in buffer Tris-Borato 1X. L'elettroforesi è stata eseguita a temperatura ambiente. I plasmidi negativamente o positivamente superavvolti sono separati nella prima dimensione non utilizzando agenti intercalanti, ed aggiungendo nella seconda dimensione 10 ng/ml di bromuro di etidio. In queste condizioni i topoisomeri negativamente superravvolti migreranno nella parte sinistra della corsia e quelli positivamente superravvolti a destra. Le condizioni di corsa sono 25 mA per 16-17 ore per la prima dimensione e 15 mA per 22 ore per la seconda. I gel sono stati colorati con il bromuro di etidio e fotografati sotto la luce UV utilizzando il sistema Chemidoc

CAPITOLO II

1. Western blot

I campioni da analizzare, supplementati con “loading buffer” 1X, sono denaturati per 5' a 95°C e caricati su un gel di poliacrilammide 6% o 10% in condizioni denaturanti. La corsa elettroforetica è eseguita a temperatura ambiente in buffer Tris-glicina 1X SDS (25 mM Tris, 200 mM glicina, 3,5 mM SDS) a 150 V. Al termine della corsa, si esegue il trasferimento su membrana PVDF (Amersham) allestendo il sandwich secondo la procedura riportata di seguito:

- ✦ si equilibra la membrana PVDF 5' in metanolo, 5' in H₂O MQ e 5' nel buffer di trasferimento;
- ✦ si equilibrano gli altri componenti del sandwich solo nel buffer di trasferimento (20% metanolo, Tris-glicina 1X: 25 mM Tris, 200 mM glicina);
- ✦ si allestisce il sandwich ponendo in sequenza una spugnetta, 2 fogli di carta Whatman 3MM, il gel, il filtro PVDF, 2 fogli di carta Whatman 3MM e una spugnetta.

Il trasferimento viene eseguito a 4°C per 16 h a 30V.

Al termine del trasferimento si recupera il filtro e si incuba per 1 h in una soluzione di latte (5% w/v latte in polvere, 50 mL PBS 1X- 0,1% Tween) per bloccare i rimanenti siti idrofobici presenti sul filtro. Al bloccaggio segue l'incubazione per 1 h in una diluizione dell'anticorpo primario diretto contro la proteina di interesse (la diluizione è eseguita nella soluzione di bloccaggio). A tal proposito è stato usato un anticorpo policlonale prodotto in coniglio per rilevare la girasi inversa (diluizione 1:10000) (Eurogentec), un anticorpo policlonale prodotto in capra per rilevare SSB (diluizione 1:4000) (Wadsworth & White, 2001) o un anticorpo policlonale prodotto in coniglio per rilevare Sul7d (diluizione 1:4000) (Primm). In seguito, il filtro è sottoposto a lavaggi con PBS 1X-0,1% Tween 20 (2 lavaggi da 2' in agitazione, seguiti da un lavaggio da 15' in agitazione ed infine 2 lavaggi da 2' in agitazione). Ai lavaggi segue l'incubazione per 1 h in una diluizione dell'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano. A tal proposito sono stati utilizzati l'anti-coniglio diluito 1:50000 (BioRad) e l'anti-capra diluito

1: 3000 (BioRad). Infine si esegue un'altra serie di lavaggi come descritto prima e si sviluppa il filtro con il metodo ECL (*Enhanced ChemioLuminiscence*) (Amersham). Il segnale viene rivelato con l'ausilio del software QuantityOne (BioRad).

2. Immunoprecipitazione *in vivo*

L'immunoprecipitazione della proteina d'interesse da estratti cellulari, preparati secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è eseguita secondo il protocollo riportato di seguito.

La miscela di reazione (1,5 mL) contiene:

- 10 mg estratti cellulari di *S. solfataricus* P2 (frazione solubile);
- 15 µl anticorpi policlonali (AbGirasi Inversa, AbSul7d, AbSmJ12 o AbSSB) o siero preimmune;
- 150 µl proteina A agarosio (Roche);
- 700 µl buffer immunoprecipitazione (50 mM Tris HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2,4 µg/mL Aprotinina, 2,4 µg/mL Leupeptina, 120 µg/mL PMSF).

Si preincubano gli estratti cellulari con gli anticorpi nel buffer di immunoprecipitazione per 2 h a 4°C in agitazione costante. A questo punto si aggiunge la proteina A agarosio e si reincuba per 16 h a 4°C in agitazione costante. Dove richiesto viene aggiunto Bromuro di etidio (50 µg/ml) prima dell'incubazione iniziale. Gli immunoprecipitati sono recuperati mediante centrifugazione a 13200 rpm per 30" a 4°C e sottoposti a 3 lavaggi con 1 mL di buffer I (50 mM Tris HCl pH 7.2, 15 mM NaCl, 160 µl Nonidet, 10 mM MgCl₂) ed un lavaggio finale con 1 mL di buffer II (10 mM Tris HCl pH 7.2, 10 mM MgCl₂). Ogni lavaggio è eseguito per 15-20' a 4°C in agitazione costante. Infine gli immunoprecipitati sono risospesi in 100 µl STE (10 mM Tris HCl pH 7.2, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl): la metà del campione viene caricato su un gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e rilevato mediante Western blotting con gli appropriati anticorpi

3. Saggio di attività della Girasi Inversa

L'attività della Girasi Inversa viene saggiata come descritto nel paragrafo precedente. Per testare l'effetto delle DNA binding protein sull'attività della Girasi Inversa, alla miscela di reazione standard vengono aggiunte le proteine SSB, Sso7d o SmJ12 alle concentrazioni indicate nei singoli esperimenti.

4. Analisi quantitativa dell'attività della Girasi Inversa

L'attività della Girasi Inversa viene calcolata mediante l'utilizzo di due differenti metodi:

1. Valutazione dell'intensità delle bande, mediante densitometria, di ogni singolo topoisomero prodotto nella reazione di topoisomerizzazione utilizzando lo strumento Chemi Doc e il programma QuantityOne (Biorad). L'attività della Girasi Inversa viene espressa come percentuale relativa alla quantità totale dei topoisomeri prodotti (che risulta dalla somma dell'intensità di tutti i topoisomeri) rispetto alla quantità totale di DNA substrato presente nella reazione
2. Valutazione dei topoisomeri più abbondanti nella reazione di topoisomerizzazione misurando l'intensità dei topoisomeri mediante densitometria e calcolo dei valori dei σ secondo l'equazione: $\sigma = \Delta LK / LK_0$

Di questi vengono poi calcolati i valori medi che esprimono l'attività della Girasi inversa

5. Electron Mobility Shift Assay (EMSA)

L'oligonucleotide RGA è stato ottenuto appaiando due filamenti di DNA aventi le sequenza:

5'-GGCTGTCGACGAAGATAGAGGACTTAATCGATATC (top strand)

5'-GGGATATCGATTAAAGTCCTCTATCTTCGTCGACAG (bottom strand)

L'ibrido è stato marcato all'estremità 3' terminale con ^{32}P - α -dCTP (3000 Ci/mmol) e la polimerasi Klenow enzyme. La miscela standard (10 μl) contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% glycerol, 50 mM KCl, 0.1 mM DTT, 4×10^4 c.p.m. di DNA marcato (concentrazione finale 0.06 $\mu\text{g/ml}$, 2.4 nM). I campioni vengono preincubati per 10 min at 70°C con le proteine appropriate e in seguito viene aggiunto il DNA: la miscela viene incubata a 37°C . Le reazioni vengono poi direttamente sottoposti ad elettroforesi in condizioni non denaturanti in 0.5x TBE buffer. La radioattività viene determinata con "Storm PhosphoImager" (Molecular Dynamics)

6. Saggio di formazione dei complessi covalenti (CCA)

La girasi inversa purificata viene preincubata per 10' a 70°C nel buffer di reazione 1X (20mM Tris-HCl, pH 8, 50mM KCl, 0.1mM DTT, 10% glicerolo): il volume finale della reazione è 40 μl . Alla mix di reazione viene aggiunto l'oligonucleotide marcato terminalmente (3 ng, circa 2×10^5 cpm), e viene incubata per 10' a 70°C . La reazione viene poi bloccata in ghiaccio per 20'. Dopo aver aggiunto il buffer denaturante per *SDS-page*, il campione viene denaturato per 5' a 100°C e caricato su un gel di poliacrilammide al 6%. La corsa elettroforetica viene effettuata a temperatura ambiente, nel buffer di corsa tris-glicina-SDS 1X a 150V. Dopo elettroforesi il gel viene posto su un foglio di carta Whatman 3MM, seccato nel gel-dryer (BioRad) per 45' ed esposto ad autoradiografia

temperatura ambiente tutta la notte: la radioattività viene determinata con “Storm PhosphoImager” (Molecular Dynamics).

7. Esposizione del DNA alle radiazioni UV

L'oligonucleotide RGA o il plasmide PGEM sono stati esposti alle radiazioni ultraviolette con una dose di UV pari a 800 J/m². Durante l'esposizione i campioni vengono tenuti in ghiaccio.

8. Saggio di attività elicastica

I seguenti oligonucleotidi:

3-tailed

(5'GTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCTGAGAT
CTCCTAGGGGCCCA)

5-tailed

(5'CCCAAAAGGGTCAGTGCTGCAAGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTT
GCATGCCTGCAGGT).

sono stati marcati all'estremità 5' terminale con la T4 polynucleotide kinase and ³²P-γ-ATP e appaiati con il DNA M13. La Girasi Inversa purificata ed SSB sono state incubate per 10' alle indicate temperature con i substrati ibridi marcati (5 x 10⁴ c.p.m. in ogni reazione; 3.2 nM). Le reazioni sono state bloccate con SDS 2% e sottoposti ad elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide all'8%.

CAPITOLO III

1. Trattamento di una coltura di *Sulfolobus Solfataricus* con l'agente alchilante metilmetansulfonato (MMS)

Le cellule sono state inoculate in terreno ricco e incubate a 80°C in agitazione costante fino al raggiungimento della fase esponenziale ($A_{600\text{nm}}$: 0.4). A questo punto la coltura cellulare è stata suddivisa in 5 aliquote di circa 100 mL ciascuna: un'aliquota funge da campione di controllo dell'esperimento e quindi non è trattata con l'agente alchilante; le altre aliquote vengono trattate con 4 diverse concentrazioni di MMS (Sigma) pari a 0.35, 0.7, 1 e 1.4 mM. Le colture sono poi incubate nuovamente a 80°C e, a tempi prefissati sono state prelevate aliquote per la preparazione degli estratti proteici (come descritto nel paragrafo precedente) o per l'estrazione del DNA genomico.

2. Trattamento di una coltura di *Sulfolobus Solfataricus* con puromicina o idrossiurea (HU)

Le cellule sono state inoculate in terreno ricco e incubate a 80°C in agitazione costante fino al raggiungimento della fase esponenziale ($A_{600\text{nm}}$: 0.4); raggiunta tale fase di crescita aliquote di coltura cellulare vengono trattate per 2 h con puromicina (50µg/ml) o con HU (10 mM).

3. Preparazione del DNA genomico

Colture cellulari di *S. Solfataricus* sono state incubate ad 80°C fino al raggiungimento della fase esponenziale ($A_{600\text{nm}}$: 0.4); raggiunta tale fase di crescita sono state centrifugate per 15' a 5000 rpm: il pellet cellulare è stato risospeso in 0.3 ml di buffer di lisi [20 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM EDTA, 1% SDS).e sottoposto per 5 volte ad estrazione con phenol-chlorophorm (1:1) equilibrato con 10 mM Tris-HCl (pH 8) e 1 mM EDTA. Il DNA genomico è stato precipitato con Etanolo e trattato con RNase (1 mg/ml) per digerire l'RNA. Tale protocollo sperimentale è stato messo a punto per favorire il recupero del DNA genomico totale.

4. Preparazione degli RNA

L'estrazione degli RNA da colture cellulari di *S. solfataricus* è stata eseguita con il Kit RNeasy min (Quiagen) secondo il protocollo previsto per le cellule batteriche.

L'integrità degli RNA è valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%

La quantizzazione è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Dall'assorbanza a 260 nm si risale alla concentrazione degli RNA secondo la formula

$$1 \text{ OD} : 40 \text{ mg/ml RNA}$$

5 PREPARAZIONE E ANALISI DEI cDNA

5.1 Retrotrascrizione degli RNA a cDNA

La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita con il kit Quantitect RT Qiagen. Il protocollo prevede due steps:

1. Eliminazione DNA genomico: la miscela di reazione (14 μ l), contenente la quantità prescelta di RNA (250-500 ng) e buffer gDNA wipeout 1x, è incubata

2 minuti a 42°C per eliminare qualsiasi traccia di DNA; dopodichè si blocca la reazione in ghiaccio per pochi minuti;

2. Retrotrascrizione (20 µl): si aggiungono alla miscela di reazione precedente Quantiscrypt RT buffer 1x, 1 µl RT primer mix e 1 µl Quantiscrypt Reverse Transcriptase e si in incuba 15 minuti a 42°C; al termine della reazione si inattiva la trascrittasi inversa mediante incubazione a 95°C per 3 minuti.

5.2 Controllo di qualità dei cDNA

Al fine di valutare l'efficienza della reazione di retrotrascrizione, si usano i cDNA come template in una reazione di PCR utilizzando una coppia di primers (RNA 16S left e right) che consente l'amplificazione di un frammento di circa 200 bp interno al gene codificante per l'RNA16S.

La miscela di reazione standard (50 µl) è composta da:

- ◆ Buffer di reazione della Taq 1x (Euroclone);
- ◆ 2.5mM MgCl₂;
- ◆ 0.2 mM dNTP;
- ◆ 0.25 µM oligo 5' RNA16S left;
- ◆ 0.25 µM oligo 3' RNA 16S right;
- ◆ 5 U EuroTaq (Euroclone)
- ◆ 1 µl cDNA

La reazione di polimerizzazione è condotta nell'apparecchio Mastercycler gradient (Eppendorf) seguendo lo stesso protocollo riportato nel paragrafo 6.6.3. I prodotti di amplificazione sono poi visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

6. Analisi dei livelli di trascrizione genica mediante Real Time PCR

La regolazione dell'espressione genica è stata valutata mediante analisi dei cDNA in Real Time PCR.

Una miscela standard di reazione (19 µl) contiene:

- ✓ Master Mix 1x (DyNAmo HS Syber Green qPCR Kit, Finnzymes);

✓ 0,25 µM oligo 5’;

✓ 0,25 µM oligo 3’;

Per ogni gene da analizzare si allestisce una miscela di reazione nx, dove n indica il numero di campioni da analizzare moltiplicato per tre, in quanto ciascun campione è analizzato in triplicato. La miscela di reazione è aliquotata nei pozzetti di una piastra per PCR 96 wells (Eppendorf) e ad ogni pozzetto è aggiunto 1 µl cDNA ad eccezione dei campioni che fungono da controllo negativo dell’esperimento. Si sigilla la piastra con un apposito foglio di pellicola trasparente e si centrifuga per circa 15” a 3700 rpm per spingere sul fondo del pozzetto il campione rimasto sulle pareti ed eliminare eventuali bolle d’aria formatesi durante il pipettamento. La reazione di amplificazione è eseguita nell’apparecchio iCycler (BioRad) secondo il protocollo riportato di seguito:

1. 95°C per 15’, per la denaturazione iniziale;
2. 95°C per 10”;
3. 56°C per 25”;
4. 72°C per 35”
5. Ripeto gli step 2-4 per 40 cicli;
6. 72°C per 10’;
7. Melting curve (da 72°C a 95°C): 46 cicli di 30”, con innalzamento della temperatura di 0.5°C ad ogni ciclo;
8. 72°C per 10’.

La specificità dell’amplificazione è determinata dall’analisi della melting curve oltre che mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% dei prodotti di amplificazione.

I risultati ottenuti in termini di cicli soglia (Ct: cycle threshold), derivanti dalla media aritmetica dei campioni in triplicato, sono analizzati con l’ausilio del software Rest-xl version 2 (*Relative expression software tool-xl*) che applica la seguente formula:

dove:

$$R: \frac{E^{\Delta Ct(T)}}{E^{\Delta Ct(R)}}$$

R: induction folds

E: efficienza della reazione di amplificazione; si assume pari a 2 equivalente ad

un'efficienza del 95%;

$\Delta Ct: Ct_{\text{controllo}} - Ct_{\text{trattato}}$, dove Ct equivale al ciclo soglia

T: gene target

R: gene normalizzatore.

L'analisi trascrizionale in Real Time PCR prevede l'amplificazione di un frammento di circa 200 bp del gene in esame. Di seguito sono riportate le sequenze nucleotidiche dei vari primers utilizzati :

- ◆ RNA16S-left: 5'-GAATGGGGGTGATACTGTCG-3'
- ◆ RNA16S-right: 5'-TTTACAGCCGGGACTACAGG-3'
- ◆ TopR1-left: 5'-GACCCTTGCCACCATACACT-3'
- ◆ TopR1-right: 5'-TCCCCTTGTTCTATGGATGC-3'
- ◆ TopR2-left new: 5'-CTGCCATGTGAGGCTTGTTTAC-3'
- ◆ TopR2-right new: 5'-CTCTGATTACTCGCAAGCCTTC-3'

BIBLIOGRAFIA

- ✦ Aravind,L., Walker,D.R. and Koonin,E.V. (1999) Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res.*,27, 1223–1242.
- ✦ Atomi,H., Matsumi,R. and Imanaka,T. (2004) Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *J. Bacteriol.*, 186, 4829–4833.
- ✦ Bates, A.D., & Maxwell, A. (1993) *DNA topology* (IRL, Oxford)
- ✦ Karshikoff, A., Ladenstein R. & Hard T. (1994) *J. Mol. Biol.* 247: 840-847.
- ✦ Baumann,H., Knapp,S., Lundback,T., Ladenstein,R. and Hard,T. (1994) *Biol.*, 1, 808–819..
- ✦ Begley,T.J. and Samson,L.D. (2004) Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair*, 3, 1123–1132.
- ✦ Bell, S.D., Botting, C. H., Wardleworth, B.N., Jackson, S.P. and White, M.F. (2002) *Science*, 296: 148-151.
- ✦ Bergerat,A., de Massy,B., Gabelle,D., Varoutas,P.C., Nicolas,A. and Forterre,P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 386, 414–417.
- ✦ Bischof,O., Galande,S., Farzaneh,F., Kohwi-Shigematsu,T. and Campisi,J. (2001) Selective cleavage of BLM, the bloom syndrome protein, during apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.*, 276, 12068–12075.
- ✦ Bischof,O., Kim,S.H., Irving,J., Beresten,S., Ellis,N.A. and Campisi,J. (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J. Cell. Biol.*, 153, 367–380.
- ✦ Bouthier de la Tour,C., Portemer,C., Nadal,M., Stetter,K.O., Forterre,P. and Duguet,M. (1990) Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.*, 172, 6803–6808. *breaks. Nucleic Acids Res.*, 33, 3799–3781.

- ✦ Brosh,R.M.Jr, Orren,D.K., Nehlin,J.O., Ravn,P.H., Kenny,M.K., Machwe,A. and Bohr,V.A. (1999) Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A. *J. Biol. Chem.*, 274, 18341–18350.
- ✦ Carpentieri,F., De Felice,M., De Falco,M., Rossi,M. and Pisani,F.M. (2002) Physical and functional interaction between the mini-chromosome maintenance-like DNA helicase and the single-stranded DNA binding protein from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.*, 277, 12118–12127.
- ✦ Chakraverty,R.K., Kearsey,J.M., Oakley,T.J., Grenon,M., de La Torre Ruiz,M.A., Lowndes,N.F. and Hickson,I.D. (2001) Topoisomerase III acts upstream of Rad53p in the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7150–7162.
- ✦ Champoux,J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 369–413.
- ✦ Charbonnier, F. & Forterre, P. (1994). *J. Bacteriol.*, 176: 1251-1259.
- ✦ Chen,F., Arseven,O.K. and Cryns,V.L. (2004) Proteolysis of the mismatch repair protein MLH1 by caspase-3 promotes DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 279, 27542–27548.
- ✦ Chuang,L.S., Tan,E.H., Oh,H.K. and Li,B.F. (2002) Selective depletion of human DNA-methyltransferase DNMT1 proteins by sulfonate-derived methylating agents. *Cancer Res.*, 62, 1592–1597.
- ✦ Cui,S., Arosio,D., Doherty,K.M., Brosh,R.M.Jr, Falaschi,A. and Vindigni,A. (2004), Vol. 33, No. 2 575 *Nucleic Acids Res.*, 32, 2158–2170.
- ✦ Cui,S., Arosio,D., Doherty,K.M., Brosh,R.M.Jr, Falaschi,A. and Vindigni,A. (2004) Analysis of the unwinding activity of the dimeric RECQ1 helicase in the presence of human replication protein A.
- ✦ Cui,S., Klima,R., Ochem,A., Arosio,D., Falaschi,A. and Vindigni,A. (2003) Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein. *A. J. Biol. Chem.*, 278, 1424–1432.

- ✦ Declais,A.C., Marsault,J., Confalonieri,F., de La Tour,C.B. and Duguet,M. (2000) Reverse gyrase, the two domains intimately cooperate to promote positive supercoiling. *J. Biol. Chem.*, 275, 19498–19504..
- ✦ Dinglay,S., Trewick,S.C., Lindahl,T. and Sedgwick,B. (2000) Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants. *Genes Dev.*, 14, 2097–2105.
- ✦ Drablos,F., Feyzi,E., Aas,P.A., Vaagbo,C.B., Kavli,B., Bratlie,M.S., Pena-Diaz,J., Otterlei,M., Slupphaug,G. and Krokan,H.E. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, 3, 1389–1407.
- ✦ Duguet, M (1997) *Journal of Cell Science* 110: 1345-1350.
- ✦ Duguet, M. (1993). *Nucl. Acids Res.*, 21: 463-468.
- ✦ Duguet,M. (1995) Reverse gyrase. In Eckstein,F. and Lilley,D.M.J. (eds.), *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, Vol. IX, pp. 84–114.
- ✦ Duguet,M. (1997) When helicase and topoisomerase meet!. *J. Cell. Sci.*,110, 1345–1350.
- ✦ Edgell D.R. and Doolittle W.F. (1997). *Archaea and the origin(s) of DNA*
- ✦ El-Shemerly,M., Janscak,P., Hess,D., Jiricny,J. and Ferrari,S. (2005) Degradation of human exonuclease 1b upon DNA synthesis inhibition. *Cancer Res.*, 1, 3604–3609.
- ✦ Forterre, P. (2002) *Trends Genet.*, 18, 236–237.
- ✦ Forterre, P., Bergerat, A. and Lopez Garcia, P. (1996). *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 237-248.
- ✦ Forterre,P. (2002) A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends Genet.*, 18, 236–237.
- ✦ Forterre,P., Bergerat,A. and Lopez-Garcia,P. (1996) The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 237–248.

- ✦ Freire,R., d'Adda Di Fagagna,F., Wu,L., Pedrazzi,G., Stagljar,I., Hickson,I.D. and Jackson,S.P. (2001) Cleavage of the bloom's syndrome gene product during apoptosis by caspase-3 results in an impaired
- ✦ Guagliardi, A., Cerchia, L., Moracci, M. & Rossi, M. (2000) *J Biol. Chem.* 275: 31813-31818.
- ✦ Guagliardi,A., Cerchia,L., De Rosa,M., Rossi,M. and Bartolucci,S. (1992) Isolation of a thermostable enzyme catalyzing disulfide bond formation from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. FEBS
- ✦ Guagliardi,A., Napoli,A., Rossi,M. and Ciaramella,M. (1997) Annealing of complementary DNA strands above the melting point of the duplex promoted by an archaeal protein. *J. Mol. Biol.*, 267, 841–848.
- ✦ Hamilton,J.T., McRoberts,W.C., Keppler,F., Kalin,R.M. and Harper,D.B. (2003) Chloride methylation by plant pectin: an efficient environmentally significant process. *Science*, 301, 206–209.
- ✦ Harmon,F.G. and Kowalczykowski,S.C. (2001) Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J. Biol. Chem.*, 276, 232–243.
- ✦ Harmon,F.G., Brockman,J.P. and Kowalczykowski,S.C. (2003) RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, 278, 42668–42678.
- ✦ Harmon,F.G., DiGate,R.J. and Kowalczykowski,S.C. (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination.
- ✦ Haseltine,C.A. and Kowalczykowski,S.C. (2002) A distinctive single-strand DNA-binding protein from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.*, 43, 1505–1515.
- ✦ Havas,K., Flaus,A., Phelan,M., Kingston,R., Wade,P.A., Lilley,D.M. and Owen-Hughes,T. (2000) Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell*, 103,

- ✦ Hickson,I.D. (2003) RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nature Rev. Cancer*, 3, 169–178.
- ✦ Huang,Y., Nakada,S., Ishiko,T., Utsugisawa,T., Datta,R., Kharbanda,S., Yoshida,K., Talanian,R.V., Weichselbaum,R., Kufe,D. et al. (1999) Role for caspase-mediated cleavage of Rad51 in induction of apoptosis by DNA damage. *Mol. Cell. Biol*, 19, 2986–2997.
- ✦ Ira,G., Malkova,A., Liberi,G., Foiani,M. and Haber,J.E. (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell*, 115, 401–411.
- ✦ Islaih,M., Halstead,B.W., Kadura,I.A., Li,B., Reid-Hubbard,J.L., Flick,L., Julie,L., Altizer,J.L., Deahl,J.T., Monteith,D.K. et al. (2005) Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat. Res.*, 578, 100–116.
- ✦ Jaxel, C., Bouthier de la Tour, C., Duguet, M. & Nadal, M. (1996). *Nucl. Acids Res.* 24: 4668-4675.
- ✦ Jaxel,C., Duguet,M. and Nadal,M. (1999) Analysis of DNA cleavage by reverse gyrase from *Sulfolobus shibatae* B12. *Eur. J. Biochem.*, 260, 103–111.
- ✦ Jaxel,C., Nadal,M., Mirambeau,G., Forterre,P., Takahashi,M. and Duguet,M. (1989) Reverse gyrase binding to DNA alters the double helix structure and produces single-strand cleavage in the absence of ATP. *EMBO J.*, 8, 3135–3139.
- ✦ Johnson,R.E., Torres-Ramos,C.A., Izumi,T., Mitra,S., Prakash,S. and Prakash,L. (1998) Identification of APN2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasic sites. *Genes Dev.*, 12, 3137–3143.
- ✦ Kaina,B., Ochsm,K., Grosch,S., Fritz,G., Lips,J., Tomicic,M., Dunkern,T. and Christmann,M. (2001) BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*, 68, 41–54.
- ✦ Kampmann,M. and Stock,D. (2004) Reverse gyrase has heat-protective DNA chaperone activity independent of supercoiling. *Nucleic Acids Res.*, 32, 3537–3545.

- ✦ Kelman,Z. and White,M.F. (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 669–676.
- ✦ Kerr,I.D., Wadsworth,R.I., Cubeddu,L., Blankenfeldt,W., Naismith,J.H. and White,M.F. (2003) Insights into ssDNA recognition by the OB fold from a structural and thermodynamic study of *Sulfolobus* SSB protein. *EMBO J.*, 22, 2561–2570.
- ✦ Khakhar,R.R., Cobb,J.A., Bjergbaek,L., Hickson,I.D. and Gasser,S.M. (2003) RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance. *Trends Cell Biol.*, 13, 493–450.
- ✦ Laursen,L.V., Ampatzidou,E., Andersen,A.H. and Murray,J.M. (2003) Role for the fission yeast RecQ helicase in DNA repair in G2. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 3692–3705. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 7
- ✦ Lee,W., St Onge,R.P., Proctor,M., Flaherty,P., Jordan,M., I., Arkin,A.P., Davis,R.W., Nislow,C. and Giaever,G. (2005). *PLoS Genet.*, 1, e24.
- ✦ Lee,W., St Onge,R.P., Proctor,M., Flaherty,P., Jordan,M., I., Arkin,A.P., Davis,R.W., Nislow,C. and Giaever,G. (2005) Genome-wide requirements for resistance to functionally distinct DNA-damaging agents. *FEBS Lett.*, 303, 27–30.
- ✦ Lopez-Garcia,P. and Forterre,P. (1997) DNA topology in hyperthermophilic Archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol. Microbiol.*, 23, 1267–1279.
- ✦ Lundin,C., North,M., Erixon,K., Walters,K., Jenssen,D., Goldman,A.S. and Helleday,T. (2005) Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Mol. Cell*, 3, 611–620.
- ✦ Myllykallio,H., Lopez,P., Lopez-Garcia,P., Heilig,R., Saurin,W., Zivanovic,Y., Philippe,H. and Forterre,P. (2001) Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science*, 292, 803.
- ✦ Nadal,M., Couderc,E., Duguet,M. and Jaxel,C. (1994) Purification and characterization of reverse gyrase from *Sulfolobus shibatae*. Its proteolytic product appears as an ATP-independent topoisomerase. *J. Biol. Chem.*, 269, 5255–5263.

- ✦ Nadal,M., Jaxel,C., Portemer,C., Forterre,P., Mirambeau,G. And Duguet,M. (1988) Reverse gyrase of Sulfolobus: purification to homogeneity and characterization. *Biochemistry*, 27, 9102–9108.
- ✦ Napoli, A., Kvaratskelia, M., White, M.F., Rossi, M., & Ciaramella, M.(2001) *J. Biol. Chem.* 276: 10745-10752.
- ✦ Napoli, A., van der Oost, J., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M. & Ciaramella, M. (1999). *J. Bacteriol.* 181: 1474-1480.
- ✦ Napoli,A., Kvaratskelia,M., White,M.F., Rossi,M. and Ciaramella,M. (2001) A novel member of the bacterial-archaeal regulator family is a non-specific DNA-binding protein and induces positive supercoiling.
- ✦ Napoli,A., Valenti,A., Salerno,V., Nadal,M., Garnier,F., Rossi,M. and Ciaramella,M. (2005) Functional interaction of reverse gyrase with single-strand binding protein of the archaeon Sulfolobus. *Nucleic Acids*
- ✦ Napoli,A., Valenti,A., Salerno,V., Nadal,M., Garnier,F., Rossi,M. and Ciaramella,M. (2004) Reverse gyrase recruitment to DNA after UV irradiation in Sulfolobus solfataricus. *J. Biol. Chem.*, 279, 33192–33198.
- ✦ Napoli,A., Zivanovic,Y., Bocs,C., Buhler,C., Rossi,M., Forterre,P. and Ciaramella,M. (2002) DNA bending, compaction and negative supercoiling by the architectural protein Sso7d of Sulfolobus solfataricus. *Nucleic Acids Res.*, 30, 2656–2662.
- ✦ Olsen and Woese, 1997 *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 18006–18011.
- ✦ Richard,D.J., Bell,S.D. and White,M.F. (2004) Physical and functional interaction of the archaeal single-stranded DNA-binding protein SSB with RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 32, 1065–10674.
- ✦ Robinson H., Gao Y.G., McCrary B.S., Edmondson S.P., Shriver J.W. & Wang A.H.J., (1998) *Nature* 392: 202-205.
- ✦ Rodriguez,A.C. (2002) Studies of a positive supercoiling machine. Nucleotide hydrolysis and a multifunctional “latch” in the mechanism of reverse gyrase. *J. Biol. Chem.*, 277, 29865–29873.

- ✦ Rodriguez,A.C. (2003) Investigating the role of the latch in the positivesupercoiling mechanism of reverse gyrase. *Biochemistry*, 42, 5993–6004.
- ✦ Rodriguez,A.C. and Stock,D. (2002) Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA. *EMBO J.*, 21,418–426.
- ✦ Romano V., Napoli A., Salerno V., Valenti A., Rossi M., Ciaramella M. *Sulfolobus solfataricus* *Journal of Molecular Biology* 365: 921-929 (2007)
- ✦ Said,M.R., Begley,T.J., Oppenheim,A.V., Lauffenburger,D.A. and Samson,L.D. (2004) Global network analysis of phenotypic effects: protein networks and toxicity modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 18006–18011.
- ✦ Salerno,V., Napoli,A., White,M.F., Rossi,M. and Ciaramella,M. (2003) Transcriptional response to DNA damage in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res.*, 31, 6127–6138.
- ✦ Sedgwick,B. (2004) Repairing DNA-methylation damage. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 5, 148–157.
- ✦ She,Q., Singh,R.K., Confalonieri,F., Zivanovic,Y., Allard,G., Awayez,M.J., Chan-Weiher,C.C., Clausen,I.G., Curtis,B.A., De Moors,A. et al. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 7835–7840.
- ✦ Shen,J.C., Gray,M.D., Oshima,J. and Loeb,L.A. (1998) Characterization of Werner syndrome protein DNA helicase activity: directionality, substrate dependence and stimulation by replication protein A. *Nucleic Acids Res.*, 26, 2879–2885.
- ✦ Sikder,D., Unniraman,S., Bhaduri,T. and Nagaraja,V. (2001) Functional cooperation between topoisomerase I and single strand DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.*, 306, 669–679.
- ✦ Volkert,M.R., Gately,F.H. and Hajec,L.I. (1989) Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutat. Res*, 217, 109–115.

- ✦ Wadsworth,R.I. and White,M.F. (2001) Identification and properties of the crenarchaeal single-stranded DNA binding protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Res.*, 29, 914–920.
- ✦ Wang J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3, 430–440.
- ✦ Watt,P.M. and Hickson,I.D. (1996) Failure to unwind causes cancer. Genome stability. *Curr. Biol.*, 6, 265–267.
- ✦ White,M.F. (2003) Archaeal DNA repair: paradigms and puzzles. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 690–693.
- ✦ White,M.F. and Bell,S.D. (2002) Holding it together: chromatin in the Archaea. *Trends Genet.*, 18, 621–626.
- ✦ Woese C.R., Winker S. and Gutell R.R. (1990) *PNAS* 87: 8467-8471.
- ✦ Wu,L., Karow,J.K. and Hickson,I.D. (1999) Genetic recombination: helicases and topoisomerases link up. *Curr. Biol.*, 9, R518–520.
- ✦ Xue, H., Guo, R., Wen, Y., Liu, D. & Huang, L. (2000). *J Bacteriol.* 182: 3929-3933.