



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi de les funcions de la topoisomerasa II a la cromatina de *Saccharomyces cerevisiae*

Xavier Fernández Georges

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDI de les FUNCIONS de la TOPOISOMERASA II

a la CROMATINA de *Saccharomyces cerevisiae*

Tesi Doctoral

Facultat de Biologia

Departament de Genètica

Programa de Doctorat de Genètica

ESTUDI de les FUNCIONS de la TOPOISOMERASA II a la CROMATINA de *Saccharomyces cerevisiae*

Memòria presentada per Xavier Fernández Georges per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Joaquim Roca Bosch en el Departament de Biologia Estructural de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona del CSIC.

Barcelona 2016

Director de la tesi

Tutor de la tesi

Doctorant

Joaquim Roca Bosch

Pere Martínez Serra

Xavier Fernández Georges

*A la meva mare, la Núria Georges,
dona inquieta i intel·ligent, que va
veure frustrades les seves ànsies
d'estudiar perquè "les nenes han
d'ajudar a la seva mare"*

AGRAÏMENTS

Vull agrair als meus companys de recerca, la seva cordialitat, bon humor, ajuda i paciència amb mi, no puc imaginar un ambient més col.laborador, amigable i acollidor que el que han sabut crear en el nostre laboratori del Parc Científic de Barcelona, moltíssimes gràcies a la Belén Martínez, la Ofèlia Díaz, el Toni Valdés i la Joanna Segura per tantes bones estones passades, el record de les quals mai s'esborrarà.

El meu agraïment també per l'Antonio Rodriguez Campos, pel seu entusiasme, coneixements, consells i anècdotes històriques de la biologia molecular espanyola i catalana.

Tampoc puc deixar de recordar amb molt d'afecte a la Sònia Trigueros que em va acollir i ensenyar en els primers dies de treball, així com als altres companys de la etapa inicial en el CID, el Javier Salceda, el Nacho Bermúdez, el Sergi Astigarraga, el Ricky Joshi, la Imma Olivares, el Benjamí Piña, el David Carro, la Marta Casado, la Jeni Coloma, la Maite Cid i molts altres.

Més enrere en el temps, vull fer esment de la Assumpta Pujades Beneit, del Laboratori de Eritropatologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, que em va ensenyar l'"ABC" del laboratori de biologia molecular. També he de recordar els professors que més interès em van fer sentir per la ciència, a l'Institut de Batxillerat Verdaguer, la Marina Mir Teixidó i el Cristóbal Franco Peral, ja mort.

També vull recordar aquí al meu germà Mikel, que va començar com a biòleg i ha acabat sent lingüista, ell és el verdader esperit investigador de la família.

He de fer menció també, de la extraordinària amabilitat del Pere Martínez al acceptar ser el meu tutor i per la seva ajuda al hora de resoldre les qüestions més formals del doctorat i a la Rosa Maria Barquer per la seva amable ajuda administrativa.

Finalment, agrair també al Joaquim Roca per haver-me deixat treballar al seu laboratori, per la seva paciència i per haver fet el possible per inculcar-me el treball rigorós, el raonament crític i a mirar de veure més enllà de les modes científiques del moment.

ÍNDIX

Introducció	1
1. Estructura helicoïdal de l'ADN	3
1.1. Estructura de l'ADN	3
1.2. Implicacions de l'estructura helicoïdal	4
2. Biofísica de l'ADN	5
2.1. L'ADN en solució	6
2.2. La flexibilitat de l'ADN	7
3. Topologia de l'ADN	9
3.1. Número d'enllaç	10
3.2. Tensió i densitat helicoïdal	11
3.3. Topoisòmers	13
3.4. Relació fonamental de les corbes tridimensionals	14
3.5. Metodologia d'estudi de la topologia de l'ADN	16
4. Topoisomerases d'ADN	18
4.1. Característiques i tipus de topoisomerases	18
4.2. Topoisomerases IA	20
4.3. Topoisomerases IB	22
4.4. Topoisomerases IIA	24
4.5. Topoisomerases IIB	28
4.6. Funcions i regulació de les topoisomerases	29
4.7. Aplicacions biomèdiques de les topoisomerases	33
5. Topologia de l'ADN a la Cromatina	35
5.1. Composició i estructura macroscòpica	36
5.2. El nucleosoma	37
5.3. Topologia del nucleosoma	39
5.4. Nivells superiors de compactació	41

5.5. La cromatina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
5.6. Topologia de la cromatina	44
Objectius	49
Publicacions	53
Informe del director sobre els treballs publicats	55
Resum breu del primer article	59
Primer article	61
Resum breu del segon article	63
Segon article	65
Resum breu del tercer article	67
Tercer article	69
Resum breu del quart article	71
Quart article	73
Resum dels resultats i discussió general	75
Comentari general previ	77
Preferències de transport d'ADN per la topoisomerasa II sobre l'ADN nu	78
Preferències relaxadores d'ADN per les topoisomerases sobre l'ADN cromatinitzat	89
Conclusions	107
Conclusions respecte de l'ADN nu	109
Conclusions respecte de la cromatina	110
Bibliografia	112

Introducció

1. L'ESTRUCTURA HELICOÏDAL DE L'ADN

Tota la informació que cal perquè es desenvolupi i funcioni un organisme, del més antic o senzill al més complex o evolucionat, està continguda dins l'ADN, un polímer complex, l'estructura de qual es va descriure l'any 1953 en un article de la revista *Nature* signat per J. Watson i F. Crick. Aquests autors es van basar en dades i treballs previs de difracció de raigs X de M. Wilkins i R. Franklin, i en l'estructura primària determinada anys abans per P. Levine, A. Kossel i A. Todd. Tots ells van ser guardonats amb el premi Nobel exceptuant en P. Levine i la R. Franklin.

1.1. Estructura de l'ADN

Des de un punt de vista químic, l'estructura primària de l'ADN està constituïda per blocs anomenats nucleòtids, cada nucleòtid és format per una desoxiribosa, un fosfat i una base heterocíclica que pot ser adenina, citosina, guanina o timina. Aquests blocs s'enllacen en cadenes que tenen, segons la nomenclatura química dels seus carbonis, un extrem 5' i un extrem 3'.

L'estructura secundària de l'ADN s'organitza en dos cadenes complementàries i antiparal·leles, les quals es mantenen unides per ponts d'hidrogen establerts entre les bases de cadenes adjacents. Aquests aparellaments són coneguts com aparellaments Watson i Crick o canònics i segons va descriure Chargaff els anys 1940, són sempre entre guanina i citosina, amb tres ponts d'hidrogen, o entre adenina i timina, amb dos ponts d'hidrogen. Per convenció, al representar l'ADN es va anomenar com a cadena Watson la representada en posició superior i com a cadena Crick la representada en posició inferior i les dues van resultar ser portadores de gens. Aquesta organització en una seqüència de bases complementàries aparellades, unides per un esquelet repetitiu de sucre fosfat, ja és suggerent de la forma en que es podria utilitzar i transmetre la informació genètica.

Un fet clau de l'estructura secundària de l'ADN és que les dues cadenes complementàries formen una escala enrotllada en espiral dextrogira al voltant d'un eix central. Com que les bases estan aparellades formant un cert angle entre elles, la hèlix resultant té un solc major i un solc menor que exposen lateralment la seqüència de bases i permeten la interacció específica amb proteïnes. Aquesta

INTRODUCCIÓ

organització és externament hidrofílica a causa de les càrregues negatives dels fosfats mentre que l'interior és hidrofòbic amb les bases planes i apilades, la qual cosa estabilitza molt el conjunt. Aquestes bases formen un pla quasi perpendicular a l'eix de la molècula.

Per cada volta completa de la molècula d'ADN, hi ha unes 10,5 parelles de bases, de forma que per cada base hi ha un gir de poc més de 34 graus. La longitud completa d'una volta de la doble hèlix és de 3,54 nm i el seu gruix és de 2,37 nm. Aquests paràmetres de la doble hèlix no són fixes, depenen del medi físic i de la seqüència nucleotídica i per tant poden variar lleugerament dels descrits inicialment l'any 1953, la denominada com a forma B de l'ADN, que és la majoritària i més estable en condicions fisiològiques normals i considerant una seqüència de bases aleatòria.

Poc després de la publicació de la forma B, es va anar descrivint altres formes d'estructura secundària de l'ADN, en funció de la salinitat, ions, pH, activitat d'aigua ambiental i de la seva seqüència de nucleòtids. Aquestes formes es va anomenar A, C i D, totes dextrogires i temps més tard, una forma Z levogira, (Zimmerman,1982), tot plegat una mostra de la gran plasticitat de l'estructura secundària de l'ADN. Aquestes formes alternatives van ser considerades inicialment com a curiositats químiques però, anys després es va començar a especular sobre el seu possible significat biològic (Lafer *et al*, 1985; Lipanov *et al*, 1989; Herbert i Rich, 1996; Oh *et al*, 2002). La diversitat estructural de la doble hèlix podria ser quelcom més que una anècdota química i existir *in vivo* en determinats segments, a causa dels processos funcionals de l'ADN, la compactació de la cromatina o per la unió de proteïnes reguladores.

1.2. Implicacions de l'estructura helicoidal

L'estructura helicoidal de l'ADN implica un problema per la transcripció i la replicació de la molècula, qüestió que ja va ser reconeguda en els anys 50 per els mateixos Watson i Crick i que va ser la base de la inicial oposició d'una autoritat com en Max Delbrück al model publicat a *Nature*, ja que creia que el desenrotllament de les dues cadenes era d'una dificultat irreductible alhora que, per altra banda, sembla que les imatges de difracció de raigs X no eren demostratives sinó suggestives d'un patró helicoidal. L'any 1957 es va confirmar que la replicació de l'ADN era semiconservativa amb l'experiment de Meselson i Stahl. Aquest fet va fer que Max Delbrück plantejés que un ADN helicoidal, al ser replicat, les dues

cadenaes filles quedarien entrecruades. Aquesta qüestió es va conèixer com a *Untanglement problem* i es va especular que aquesta dificultat es podria resoldre desenrotllant les dues cadenaes, girant els seus extrems lliurement mentre es produïa la replicació però, les extraordinàries dimensions de la molècula d'ADN en relació al diàmetre cel·lular feien molt improbable aquesta possibilitat. Altres models alternatius van ser proposats per resoldre aquesta dificultat, com la estructura SBS (Rodley *et al*, 1976), que va imaginar cadenaes paranèmiques en zig-zag, les quals al no estar enllaçades es podrien separar sense ocasionar problemes. Per complicar la situació, Dulbecco i Vinograd van descobrir l'any 1963 molècules circulars d'ADN en el virus del polioma i aquest fet va descartar que la replicació es pogués fer desenrotllant les cadenaes filles alhora que es replicaven, per rotació lliure dels extrems. Posteriorment la demostració per John Cairns també l'any 1963, de la replicació semiconservativa en cromosomes circulars de *E.coli* des de un únic origen de replicació, va confirmar en un model més complex que el virus, que calia una solució més imaginativa que el desenrotllament per rotació dels extrems a l'esmentat *Untanglement problem* i aquesta solució havia d'implicar canvis que afectaven a la topologia de la molècula d'ADN.

Amb aquest panorama es va començar a pensar en la possibilitat que algunes proteïnes, mes enllà de les implicades directament en la còpia i la lectura de l'ADN, fossin les encarregades d'alterar la continuïtat de la molècula d'ADN per fer-la compatible amb aquest processos. Inicialment l'atenció es va concentrar en les ja conegudes nucleases i lligases que podien tallar i relligar les cadenaes d'ADN salvant així el problema de la continuïtat de la molècula. Poc després es va purificar a partir d'extractes de *E. coli* una activitat capaç de tallar i relligar plasmidis *in vitro* i es va anomenar proteïna Ω (Wang, 1971), amb aquesta proteïna comença a existir un nou camp de la biologia molecular, la topologia de l'ADN.

2. BIOFÍSICA DE L'ADN

Sovint es parla de l'ADN com d'una entitat abstracta, un codi portador d'informació, sense tenir en compte que també és un objecte amb propietats físiques, geomètriques i topològiques que poden condicionar la seva funció biològica. Una mirada física, microscòpica i macroscòpica, a algunes d'aquestes propietats

INTRODUCCIÓ

pot ser reveladora dels seus mecanismes de funcionament, més enllà de la estricta lectura de la seqüència nucleotídica (Hatfield i Benham, 2002; Remus *et al*, 2004).

Alhora de estudiar algunes propietats de l'ADN de forma rigorosa, hi ha una dificultat insalvable de complexitat si es vol fer a nivell atòmic, per això es fa servir models més macroscòpics a les prediccions biofísiques i termodinàmiques. La biofísica de l'ADN, deixant de banda els mètodes instrumentals, té dos vessants més interessants pel biòleg; el seu comportament en solució i la seva flexibilitat.

2.1. l'ADN en solució

Partint de la mecànica estadística de cadenes polimèriques hi ha diferents models matemàtics de l'ADN per descriure el seu comportament en solució. El més simplificat, és el *Random coil o free jointed model* (Fig.1a), consistent en n segments de longitud l , units per enllaços que poden tenir qualsevol direcció a l'espai de forma equiprobable respecta del segment precedent. Per que el model sigui prou realista ha de tenir un nombre mínim de segments, corresponents amb el contorn del polímer estudiat (Fig.1b). Del nombre mínim de segments n_0 en resulta una longitud l_0 (L / n_0), coneguda com a segment estadístic de Khun del polímer, que depèn de la molècula i del medi. En aquest model la mida de la molècula s'estima a partir de l'expressió: $\langle r^2 \rangle = n \cdot l^2$, a la qual $\langle r^2 \rangle$ és la mitjana del quadrat de les distàncies entre els extrems del polímer (Cantor i Schimmel, 1980) i r és el radi aparent i va entre parèntesis angulars per notar que és un promig. Aplicant el segment de Kuhn, l'expressió anterior queda:

$$\langle r^2 \rangle = n_0 \cdot l_0^2$$

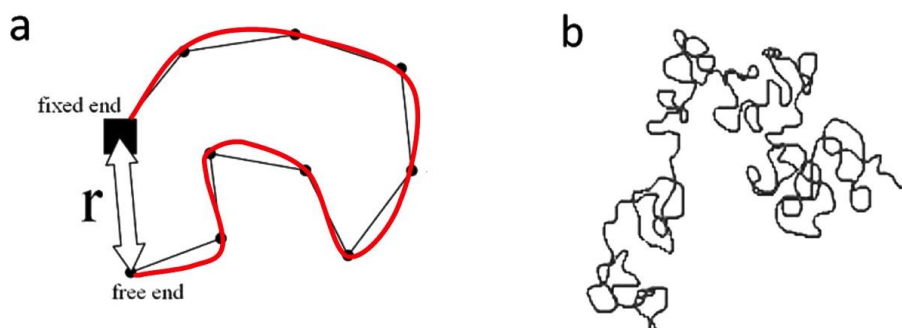


Fig. 1 *Free jointed model* per descriure un polímer, a) Esquema per 9 segments representant el polímer real en vermell. b) El model per centenars de segments, quants més segments, el model descriu millor el polímer real.

Per descriure més acuradament el comportament d'un fragment d'ADN en solució cal introduir noves restriccions al polímer teòric, definint direccions correlacionades per cada segment, per això s'assumeix que hi ha un eix de simetria i que els angles formats entre segments solament poden agafar determinats valors, sense diferències energètiques entre ells (Cantor i Schimmel 1980; Vologodskii, 1992) (Fig.2). Quan el promig dels angles entre segments $\langle \theta \rangle$ tendeix a zero, simultàniament amb la longitud del segment l , tenim el model *wormlike chain*, (Kratky i Porod, 1949), més realista que els models anteriors.

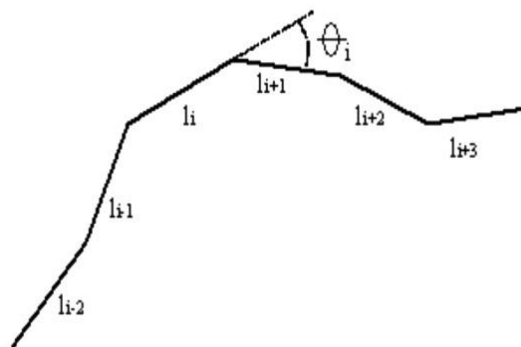


Fig. 2. Model del *Random coil* amb restricció angular. Solament uns angles estan permesos

2.2. La flexibilitat de l'ADN

El model *wormlike chain* introdueix la rigidesa del polímer definida pel paràmetre P , el *persistent length*, que està relacionat amb el segment de Kuhn per l'equació: $l_0 = 2 \cdot P$. Aquesta P es defineix també com la porció de polímer per a la qual les direccions dels seus segments elementals tenen una direcció correlacionada. El *Wormlike chain* descriu bé el comportament de l'ADN al ser aquest un polímer molt rígid.

L'ADN a més de flexionar es pot estirar i torsionar respecte al seu eix longitudinal, tot això es pot descriure amb tres mòduls d'elasticitat (Willians i Maher, 2000; Strick *et al*, 2001): El descrit P o *persistent length*, el mòdul S o *elastic stretch* i el mòdul T o *torsional resistance length* (Fig.3). Aquestes tres magnituds son independents de la longitud del segment estudiat.

INTRODUCCIÓ

El paràmetre P varia poc quan la força iònica esta per sobre dels 10 mM NaCl, en condicions fisiològiques fa uns 45-50 nm (Hagerman, 1988), en canvi hi ha una forta dependència de la temperatura (Geggier *et al*, 2010). La grandaria de la molècula d'ADN en solució, representat per $\langle r^2 \rangle$, depèn del paràmetre P .

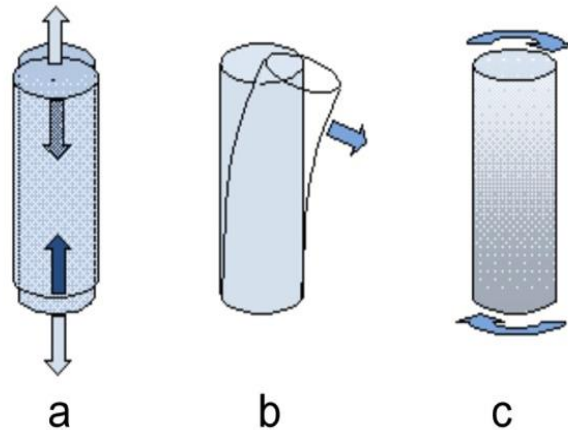


Fig. 3. Flexibilitat de la doble hèlix d'ADN. a) Estirament, representat pel mòdul S , b) Flexió, representat pel mòdul P , c) Torsió, representat pel mòdul T

La deformació torsional de l'ADN té una energia lliure associada que depèn de la temperatura i la longitud de la molècula. Aquesta energia determina les voltes de més o de menys d'una molècula circular respecte de la seva forma de mínima energia lliure associada. A major longitud dels segments a circularitzar, més ampla serà la distribució de les formes amb un excés o defecte de voltes de l'ADN circularitzat.

L'energia potencial elàstica de torsió associada a una fluctuació, és una funció quadràtica d'aquesta fluctuació, és el producte del seu quadrat per una constant elàstica G , i al ser l'angle de torsió n , un múltiple sencer de 360° obtenim:

$$E_p(n) = \frac{1}{2} G 4\pi^2 n^2$$

La probabilitat associada a l'energia torsional d'un ADN circular de n voltes de més o de menys, s'obté a partir de l'expressió de Boltzmann:

$$\text{Pr}(n) \approx \exp \left(- \frac{4 (\pi^2 n^2 G)}{2kT} \right)$$

Aquesta probabilitat es distribueix segons una campana de Gauss, de mitjana $n = 0$, (cap volta de més o de menys) i variància $\langle \Delta n^2 \rangle = kT/4\pi^2G$, que condiciona la intensitat relativa de les bandes d'una electroforesis i depèn de la temperatura i de la constant G , que varia amb la mida de N (Taula 1) de la molècula circular, per tant a partir de la distribució electroforètica de bandes es pot estimar la constant G . (Depew i Wang, 1975).

ADN	N(parells de bases)	G (eV/radiant)	$\langle \Delta n^2 \rangle$
PM2	9850	$1,35 \cdot 10^{-4}$	5,7
SV40	5300	$3,12 \cdot 10^{-4}$	3,8
E. coli 15	2200	$8,58 \cdot 10^{-4}$	2,5

Taula 1. Relació de la mida amb la constant G i amb la variància de voltes suplementàries (Depew i Wang 1975).

La doble hèlix d'ADN no és un cilindre isotròpic i per tant no produeix el mateix efecte un gir levogir que un gir dextrogir. Experiments de *single molecule* han demostrat que, en funció del medi, prou força en sentit levogir desnaturalitza la doble hèlix i en sentit dextrogir produeix una transició conformacional que exterioritza les bases i les cadenes de sucre-fosfat queden al centre de la molècula (Stigter, 1998; Williams *et al*, 2001). El cilindre d'ADN també es pot estirar i acurtar, aquest tipus de fluctuació, mesurada pel paràmetre S , no sembla tenir gaire importància biològica, però si amb nanomanipulació s'estira l'ADN amb una força suficient es produeix una transició conformacional que comporta un augment del 70% de la longitud inicial (Smith, Cui i Bustamante, 1996).

3. TOPOLOGIA DE L'ADN

L'estudi de l'ADN des de un punt de vista físic fa imprescindible utilitzar conceptes d'una branca jove de les matemàtiques, la topologia, aquesta especialitat estudia les relacions entre les superfícies i la seva continuïtat, és a dir les propietats dels cossos geomètrics que segueixen invariants després de plegar-los, dilatar-los o contraure'ls. La topologia no es fixa en les distàncies, ni en els angles ni en com estan

INTRODUCCIÓ

alineats els punts dels cossos estudiats, aquestes qüestions es reserven a la geometria. Dins la topologia està inclosa la teoria de nusos que també té una aplicació evident a la biologia de l'ADN.

3.1. Número d'enllaç

El concepte topològic més important que fa servir la topologia biològica és el de número d'enllaç, representat per l'abreviatura Lk del terme anglès *linking number*. El número d'enllaç és una propietat general de qualsevol parell de corbes tancades a l'espai tridimensional. Donada una projecció bidimensional de dues corbes tridimensionals (Fig. 4) i assignant +1 a cada creuament positiu i -1 a cada creuament negatiu, l' Lk es defineix com:

$$Lk = \frac{1}{2} \sum \pm 1_{\text{Creuaments}}$$

Aquesta expressió es compleix per qualsevol projecció bidimensional de les corbes i el resultat és sempre un número sencer. El número d'enllaç no depèn de la geometria, és un invariant topològic ja que solament tallant i relligant les cadenes es pot canviar. En biologia de l'ADN se sol aplicar aquest concepte a corbes obertes o segments, llavors l' Lk és un fraccionari sense sentit topològic estricta.

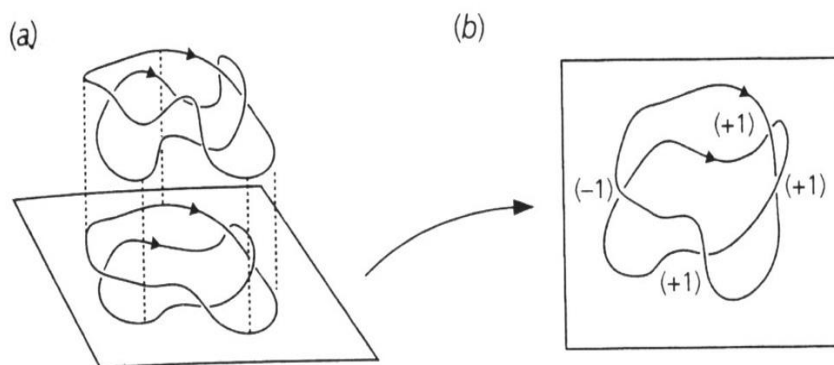


Fig. 4. a) Dues corbes entrecruades a l'espai i projectades en el pla. b) Representació amb el signe dels encreuaments. (DNA Topology, Bates i Maxwell, 2005)

El signe dels creuaments entre les dues cadenes es determina per regles convencionals (Fig. 5), els creuaments es consideren positius si el segment superior, per alinear-se amb el segment inferior gira en

sentit antihorari i negatiu si el segment superior per alinear-se amb l'inferior gira en sentit horari, en ambdós casos considerem solament els girs de menys de 180° .

En el cas específic de l'ADN circular tancat covalentment, les dues cadenes del dúplex formen una hèlix dextrogira, amb creuaments positius, la suma total dels quals és un Lk de valor sencer positiu. A la forma Z de l'ADN, els creuaments son negatius i l' Lk té un valor negatiu. El càlcul de l' Lk d'un segment d'ADN amb N parells de bases, es fa a partir de l'expressió:

$$Lk = N/h$$

En aquesta expressió N és el nombre de parells de bases i h és el nombre de parells de bases per volta completa de la molècula, a la literatura dit *helical repeat*. En el B-ADN en condicions de 200 mM NaCl, 37°C i ph 7 es pot considerar que h és molt aproximat a 10,5 pb per volta completa. El paràmetre h a la forma A és de 11 pb per volta i en el Z-ADN, h és de -12 pb per volta (Zimmerman, 1982).

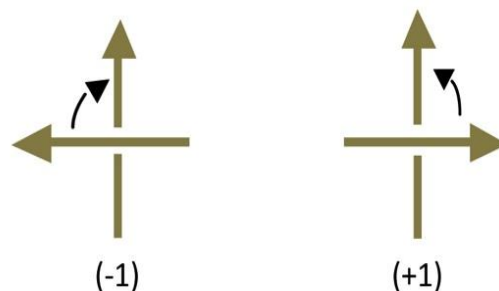


Fig 5. Convenció per donar signe als encreuaments (A partir de *DNA Topology* de Bates i Maxwell, 2005)

3.2. Tensió i densitat helicoïdal

Per qualsevol segment d'ADN existeix un valor teòric d' Lk de mínima energia, aquest valor depèn de les condicions del medi i es nota com a Lk^0 . Com s'ha dit anteriorment, en rigor no és un número d'enllaç ja que aquest concepte és topològic i els bris d'un segment lineal d'ADN no estan enllaçats topològicament.

Si el segment d'ADN resulta ciclat, es parla d' Lk_m , un paràmetre ara ja topològic, que sempre pren valors sencers i que ha diferència de Lk^0 , manté una certa tensió si no coincideix la fase rotacional dels

INTRODUCCIÓ

extrems de la molècula d'ADN lligada. Quan el nombre de parells de bases, N , passa de pocs milers, la diferència entre les dues formes de càlcul és poc important a efectes pràctics ja que en termes absoluts no pot superar 0'5 unitats, però a causa dels processos biològics, la fluctuació tèrmica, les molècules intercalants o per canvis de les condicions ambientals, l'ADN sol tenir un excés o un defecte en el número voltes respecte de Lk^0 (Fig.6), per això es parla de ΔLk , que és la desviació de Lk present en un moment determinat, respecte de Lk^0 en les mateixes condicions, això s'expressa amb l'equació:

$$Lk - Lk^0 = \Delta Lk$$

L' ΔLk és positiu quan h disminueix i negatiu quan h augmenta. Rigorosament l' ΔLk es calcula respecte de Lk^0 però en el cas de molècules circulars també es fa servir Lk_m , i llavors assoleix només valors sencers.

$$Lk - Lk_m = \Delta Lk$$

L' ΔLk per si mateix no informa de la tensió superhelicoidal que pateix la doble hèlix, per conèixer el grau d'estrès ens referim també a la seva longitud, això ens permet comparar plasmidis de mida diferent.

La repercussió d'un ΔLk determinat a la geometria d'un plasmidi, depèn de la mida d'aquest plasmidi, quan més gran, menys efecte té un determinat ΔLk , és a dir, menys tensió superhelicoidal produeix. Per posar l'efecte de l' ΔLk d'un plasmidi en relació a la seva mida N , es fa servir el quocient:

$$\sigma = \Delta Lk / Lk^0$$

La sigma és la diferència específica d' Lk que generalment s'anomena densitat superhelicoidal i en el cromosoma d'*E.coli* se situa entorn a - 0'06, és a dir un dèficit d' Lk del 6% (Anderson i Bauer, 1978).

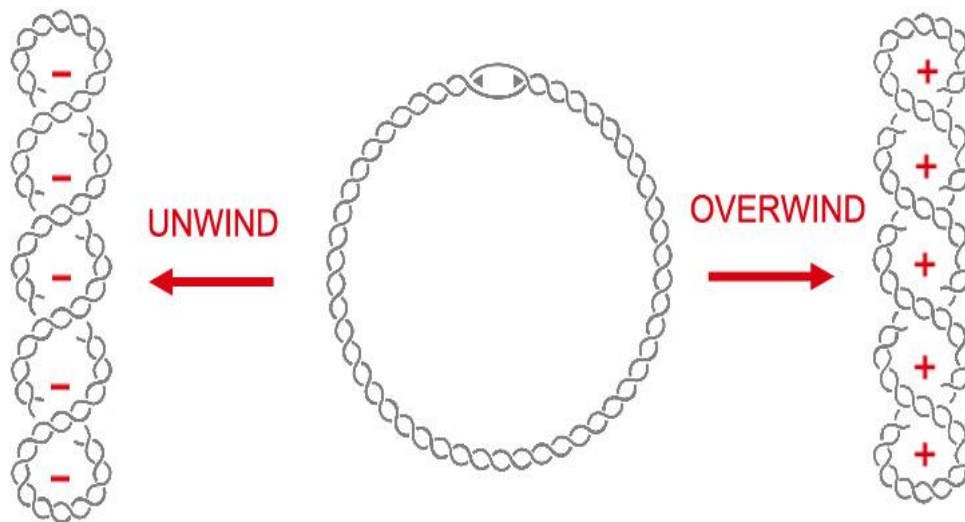


Fig. 6. Variacions de l' Lk , (A partir de *Topology in molecular biology* de Monastyrsky (ed.) 2007)

3.3. Topoisòmers

De lo exposat anteriorment es conclou que plasmidis amb la mateixa seqüència poden presentar diferents números d'enllaç. Cada una de les formes amb idèntica seqüència, però amb Lk diferent, son denominades topoisòmers del plasmidi. Els topoisòmers d'un plasmidi relaxat es distribueixen segons una campana de Gaüs (Depew i Wang, 1975), denominada distribució d'equilibri. Per electroforesi en gel d'agarosa és possible separar els topoisòmers d'un mateix plasmidi (apartat 3.5) i un densitograma del gel tenyit permet veure'n la distribució, que es presenta com una sèrie de pics, cada un dels quals correspon a un topoisòmer que difereix en una unitat d' Lk dels adjacents (Keller i Wendel 1974). El pic central és l' Lk_m (Fig. 7). Els topoisòmers tenen una energia lliure associada, aquesta energia condiona la unió de l'ADN a les proteïnes reguladores, nucleosomes, replisoma, ARN polimerases, etc. Aquesta energia és proporcional al quadrat de la diferència de número d'enllaç. Matemàticament s'escriu:

$$\Delta G_{sc} = K \Delta Lk^2$$

La qual, referida a la densitat superhelicoidal queda aproximadament:

$$\Delta G_{sc} \approx 10NRT\sigma^2$$

INTRODUCCIÓ

Les molècules circulars son interessants per mesurar variacions d' Lk , reflectides en els canvis a les distribucions de topoisòmers, que es poden extreure i analitzar per electroforesi o microscòpia electrònica. L'estudi de les distribucions de topoisòmers permet mesurar l'*helical repeat* (Wang, 1979) i estudiar *in vitro* els canvis introduïts per intercalants o proteïnes d'unió, tancant un plasmidi *nickat* en interacció amb el lligand (Vologodskii, 1998). Els canvis a la distribució de topoisòmers són una mesura indirecte de la densitat superhelicoidal de l'ADN genòmic i permeten fer interpretacions dels resultats obtinguts amb les modificacions experimentals *in vivo*. S'ha descrit també abordatges genòmics per estudiar les variacions d' Lk *in vivo* a la cromatina (Bermudez, 2010), però son de considerable complexitat. L'estudi experimental del superenrotllament en cromosomes lineals és una qüestió per a la qual encara no hi ha una bona resposta.

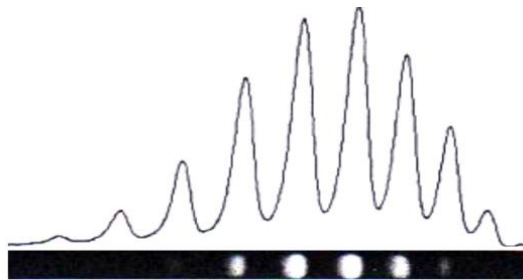


Figura 7. Distribució de topoisòmers en gel d'agarosa i densitograma del gel. (Topology and physics of circular DNA de A. Vologodsky, 1992)

3.4. Relació fonamental de les corbes tridimensionals

El paràmetre topològic descrit inicialment, el número d'enllaç, és descriu també com a suma de dos paràmetres geomètrics, el número d'enrotllament i el número de torsió, en anglès *Writhe* i *Twist*, notats respectivament per Wr i Tw . Aquesta suma es coneix com a relació fonamental de les corbes tridimensionals i va ser formulada pels matemàtics Călugăreanu i White a la dècada dels 60.

$$Lk = Tw + Wr$$

Aquesta relació va ser aplicada a la biologia de l'ADN per Fuller i Vinograd i implica que qualsevol canvi de *twist* es compensa amb un canvi en el *writhe* de signe oposat per mantenir constant l' Lk (Fg 8).

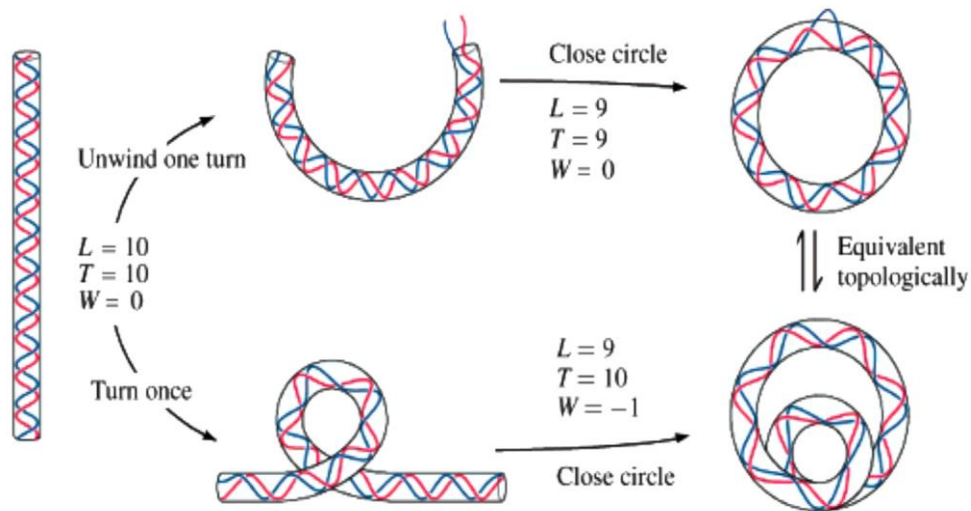


Figura 8. Equivalències entre el Tw i el Wr , (*Biochemistry* de Voet i Voet, 2004)

El número de torsió o *twist*, és el grau de torsió de l'eix del cilindre teòric de la doble hèlix, a la pràctica és el nombre de vegades que s'entrecreuen les dues cadenes d'ADN entorn al seu eix. A una molècula circular, l' Lk s'incrementa +1 per cada volta dextrogira i disminueix -1 per cada volta levogira.

El número d'enrotllament o *writhe*, és el paràmetre que ens indica com l'eix de la doble cadena gira en les tres dimensions de l'espai, generant nous encreuaments de l'eix amb si mateix i es mesura com un còmput de totes les seves projeccions bidimensionals. El número d'enrotllament varia prop d'una unitat per cada creuament complet de l'eix amb si mateix. A les molècules relaxades l' Lk^0 té un *writhe* de zero i per tant coincideix amb el *twist*.

Segons la relació fonamental, les variacions d' Lk impliquen una variació del *twist* o del *writhe* o de tots dos alhora, això es representa amb l'equació:

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

Els increments d' Lk tenen dos possibles extrems, si el plasmidi es veu forçat a estar en un pla, tot l'increment d' Lk es farà com a Tw , però si el plasmidi fa un plectonema amb tants creuaments com unitats s'ha incrementat l' Lk , llavors solament augmentaria el Wr , quedant el Tw inalterat. En condicions de σ

INTRODUCCIÓ

fisiològiques, un increment d' Lk es reparteix aproximadament en un 25% d' ΔTw i un 75% d' ΔWr , això dóna una tendència de l'ADN superenrotllat a formar superhèlix (Horowitz i Wang, 1984).

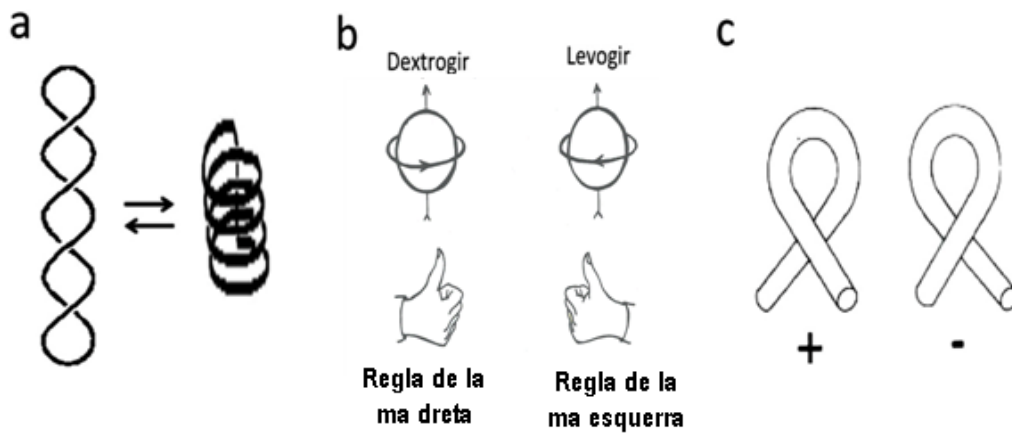


Fig. 9 a) Plectonema i toroide. b) Regla per determinar el sentit de gir. c) Signe dels creuaments en un segment.

A més de plectonemics, els increments de *writhe* poden ser també toroidals, dits també solenoidals (Fig.9a). Els petits increments adopten una conformació toroïdal però partir de certa magnitud es perd estabilitat i calen proteïnes o altres lligands per mantenir-la, sinó el toroide acaba col·lapsant en un plectonema, el qual serà dextrogir per $\Delta Lk < 0$ i levogir per $\Delta Lk > 0$. A la conformació toroïdal si: $\Delta Lk < 0$, el toroide serà levogir i si: $\Delta Lk > 0$, el toroide serà dextrogir, això es pot veure aplicant les regles admeses per convenció (Fig 9b i c).

3.5. Metodologia d'estudi de la topologia de l'ADN

El mètode analític més emprat en aquesta memòria ha estat l'electroforesi en gel d'agarosa. En solució els topoisòmers tenen diferent compactació segons el seu Lk i per tant segons el *writhe* de cada molècula. Això permet diferenciar-los per la seva mobilitat electroforètica en un gel d'agarosa. Mitjançant l'addició de compostos intercaladors de l'ADN es pot controlar el *writhe* de les molècules, millorant la separació entre les diferents espècies. En aquest sentit, la tinció amb bromur d'etidi o altres possibles colorants intercaladors s'ha de fer un cop finalitzada la migració de les mostres.

La base teòrica de la modificació del *writhe* està a la relació fonamental de Călugăreanu i White segons la qual per mantenir un Lk invariable, qualsevol canvi del Tw es compensa amb un canvi del Wr de sentit oposat. L'efecte dels agents intercaladors s'aconsegueix al ocupar aquests compostos espai entre les parelles de bases de l'ADN, això fa augmentar l'*helical repeat* de forma que el Tw disminueix i per compensar aquesta disminució, l'ADN circular i tancat, canvia la seva forma, es a dir la seva mobilitat electroforètica. Quan $\Delta Lk < 0$, disminueix el Wr i es tendeix a la forma d'un $\Delta Lk \approx 0$. Els topoisòmers amb un $\Delta Lk \approx 0$ es transformen en plectonemes amb una forma similar als que tenen un $\Delta Lk > 0$, mentre que els plectonemes amb un $\Delta Lk > 0$, augmenten poc la seva compactació al admetre menys intercalador a la doble hèlix (Fig. 10b). L'objectiu d'aquest tractament és aconseguir la màxima resolució entre les diferents topologies del plasmidi.

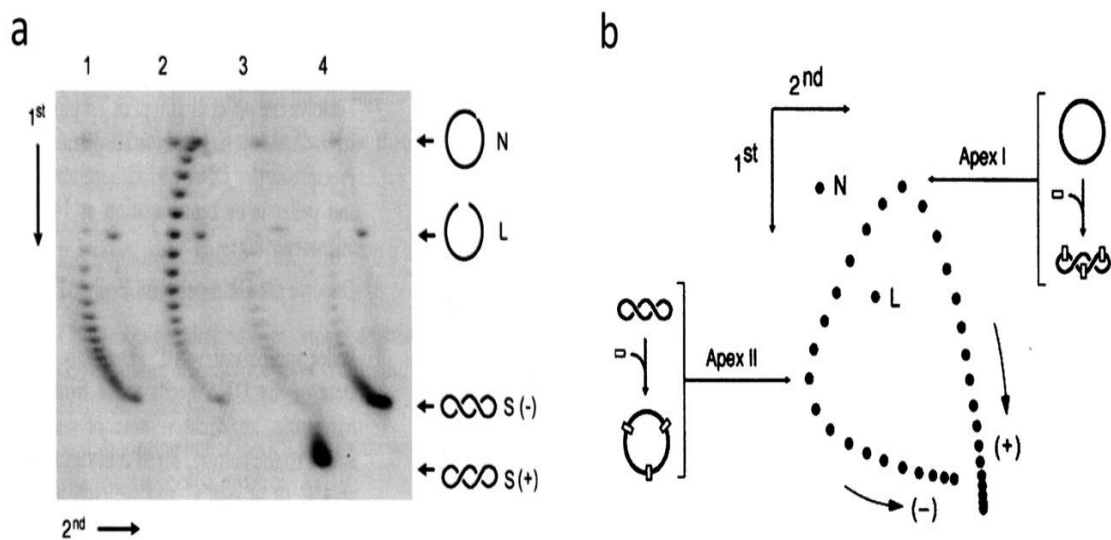


Fig 10. a) Electroforesi bidimensional del mateix plasmidi en situacions diferents, a la línia 1 el plasmidi es va obtenir de *E. coli* per lisi alcalina, a la línia 2 el mateix plasmidi obtingut de llevat per trencament mecànic, a línia 3 el plasmidi a partir de llevat deficient en topo II en el qual s'expressa la topo I de *E. coli*, produint un cúmul de superenrotllament positiu, a línia 4, el plasmidi obtingut de cèl·lules sense activitat topoisomerasa. b) Esquema de l'arc format per els topoisòmers d'un plasmidi, els que tenen superenrotllament (+) i (-) estan en els extrems, N i L son les formes relaxades *nickada* i lineal. A l'apex I estan els topoisòmers que van tenir $Wr = 0$ a la primera dimensió, el qual va augmentar a la segona dimensió, al augmentar l'intercalador, mentre que a l'apex II estan els topoisòmers que a la primera tenien un $Wr < 0$ que es fa 0 al afegir l'intercalador. Les fletxes assenyalen les direccions de migració.

INTRODUCCIÓ

En funció dels requeriments de separació es pot fer servir un gel convencional, en una sola direcció (Fig.7) o un gel en les dos dimensions del pla (Fig.10a). En el primer cas aconseguim desplegar una banda compacta de topoisomers, en una escala de topoisòmers quantificables pel seu Lk . En el segon cas aconseguim un arc de topoisòmers que permet distingir entre els que tenen igual compactació però una quiralitat oposada. La electroforesi bidimensional o 2D (Lee *et al*, 1981) requereix utilitzar dos concentracions diferents d'intercalant, la cloroquina és el que es fa servir normalment, en concentracions de proporció 1:5 entre elles. Entre les dues concentracions es fa un gir de 90° del camp elèctric (Fig. 10b).

Les condicions electroforètiques poden variar molt, però en general han estat entorn als 1'2 V / cm durant unes 20 hores a la primera dimensió i uns 20 V / cm i unes 4-6 hores a la segona dimensió. El percentatge d'agarosa també varia en funció de la mida del plasmidi estudiat, però sol estar entre el 0'4% i el 1'2% a la major part de les aplicacions. L'electroforesi bidimensional permet diferenciar clarament entre plasmidis amb superenrotllament negatiu i positiu i les formes *nickades* i lineals (Hanai i Roca, 1999).

4. TOPOISOMERASES D'ADN

La solució de la natura per salvar els problemes que planteja la estructura de l'ADN consisteix a tallar i religar. Això és conceptualment senzill, però molecularment complex i representa un repte continuat a la integritat del genoma, per tant el procés ha de ser extraordinàriament segur i el funcionament dels enzims responsables, molt perfecte. Els enzims que compleixen aquesta funció s'han denominat genèricament topoisomereses d'ADN perquè catalitzen la modificació de la topologia de l'ADN. Els genomes actuals, d'ADN, grans i de doble cadena, no es poden imaginar sense el treball de les topoisomereses.

4.1. Característiques i tipus de topoisomereses

Totes les topoisomereses tenen dos característiques que les defineixen, en primer lloc poden tallar i rejuntar els enllaços fosfodiester de l'ADN conservant-ne l'energia. Això passa al formar-se un

intermediari covalent entre un grup fosfat de l'ADN i un grup hidroxil d'una tirosina del centre actiu, que actua com a nucleòfil, iniciant una primera transesterificació sense aportació d'energia externa.

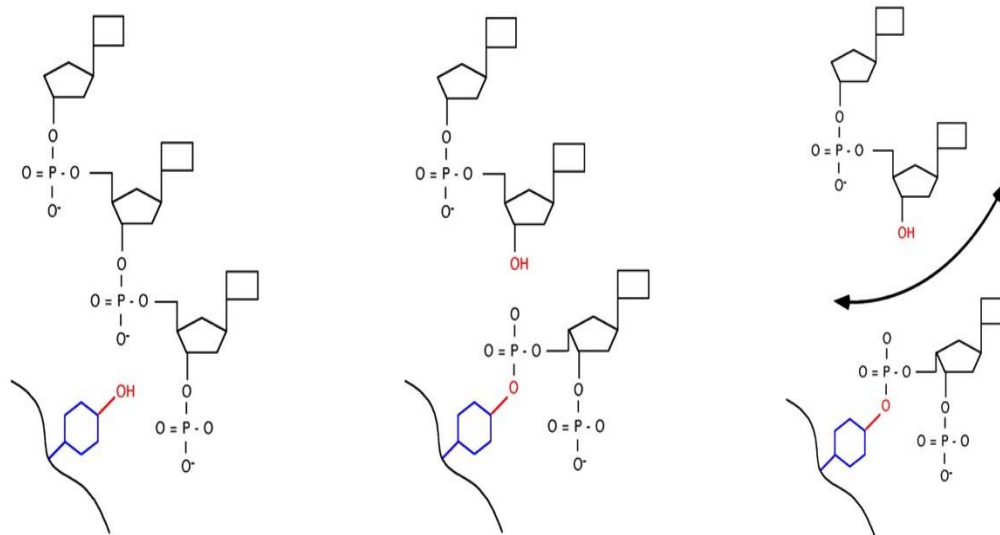


Fig. 11. Característiques principals: Mecanisme del centre actiu de les topoisomerases. Tall de la cadena d'ADN per reacció entre la tirosina del centre actiu i l'extrem 5' de la cadena d'ADN, en altres topoisomerases això passa amb l'extrem 3'. Seguidament hi ha separació i transport d'una altra cadena d'ADN o un dúplex. L'extrem oposat queda retingut de forma no covalent o lliure per girar.

En segon lloc, les topoisomerases tenen la capacitat, un cop fet el tall, de separar prou els extrems tallats per permetre el pas o la rotació d'una altra cadena d'ADN (Fig.11), després de la qual cosa es tornen a apropar prou els extrems tallats perquè succeeixi una segona transesterificació, refent l'enllaç inicialment trencat i conservant l'energia. Segons el tipus d'enzim aquest procés pot passar amb una sola cadena o amb les dues i a més, hi ha la possibilitat que el grup hidroxil de la tirosina reaccioni amb l'extrem 5' de l'ADN formant un intermediari covalent 5'- fosfotirosina, deixant un extrem hidroxil 3' unit de forma no covalent o per contra la reacció pot ser amb l'extrem 3' de la cadena tallada, formant un intermediari transitori 3'- fosfotirosina i deixant l'altre extrem hidroxil 5' unit de forma no covalent a l'enzim (Fig.12). Aquestes possibilitats de tall han generat tres tipus de topoisomerases: IA, IB i II, depenent de les

INTRODUCCIÓ

transformacions topològiques que poden catalitzar. El grup II es divideix en dos subtipus, les IIA i les IIB, que catalitzen la mateixa transformació però, son filogenèticament diferents.

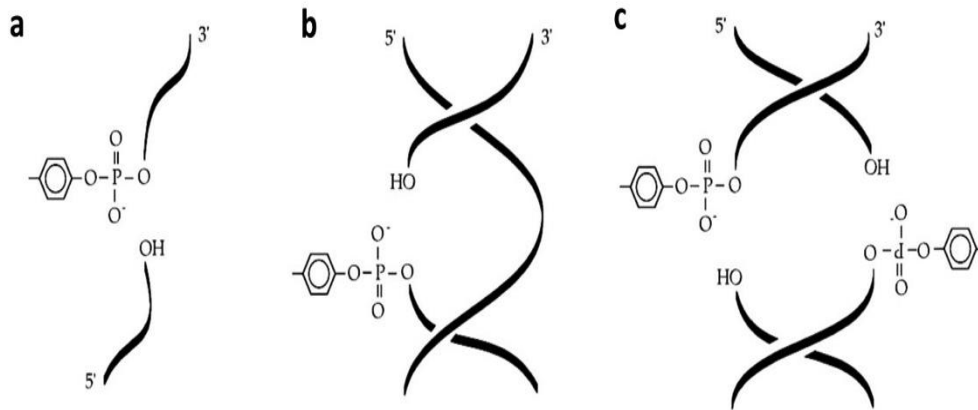


Fig. 12. Unió covalent de les diferents topoisomereses a l'ADN. a) Topoisomereses tipus IA. b) Topoisomereses tipus IB. c) Topoisomereses tipus II.

4.2. Topoisomereses IA

Van ser les primeres topoisomereses descrites. L'any 1971, James C. Wang va descobrir la proteïna omega de *E.coli* que actualment coneixem com a topoisomerasa I de *E.coli*. Les topoisomereses del tipus IA són enzims monomèrics que funcionen tallant i relligant segments d'ADN de cadena sencilla i a través del tall transitori produït deixen passar un altre segment de cadena sencilla o un de cadena doble. Per aquesta reacció no cal cap aportació externa d'energia i per tant la direccionalitat de les transformacions està dirigida per la seva tendència termodinàmica.

Les transformacions topològiques catalitzades per les topoisomereses del tipus IA (Fig.13b) són l'anusament / desanusament i l'encadenament / desencadenament de cadenes senzilles d'ADN, com a conseqüència, les topoisomereses tipus IA també poden relaxar molècules circulars amb tensió helicoidal negativa fins a un Lk proper però inferior a Lk_m , en canvi no relaxen els plasmidis amb $Lk > Lk_m$, sempre que no existeixin segments no complementaris i per tant no aparellats (Kirkegaard i Wang, 1985). A cada cicle de reacció el valor de Lk es redueix en una unitat (Brown i Cozzarelli, 1981).

Les topoisomerases de tipus IA tenen quatre dominis (Lima *et al*, 1994) (Fig.13d) que formen una pinça amb un espai central d'uns 25Å de diàmetre (Fig.13a). El centre actiu amb la corresponent tirosina està en el domini III, en una punta d'aquesta pinça formada per dos dels quatre dominis i el domini II té la funció de frontissa. En el cicle de transport, l'extrem 5' de la cadena tallada s'uneix de forma covalent a la punta de la pinça que té la tirosina i l'extrem 3' s'uneix de forma no covalent a l'altre punta, la pinça s'obre i deixa passar la cadena senzilla o eventualment una doble cadena, després es torna a tancar la pinça i es refà l'enllaç fosfodiester de l'ADN, finalitzant l'esdeveniment de transport.

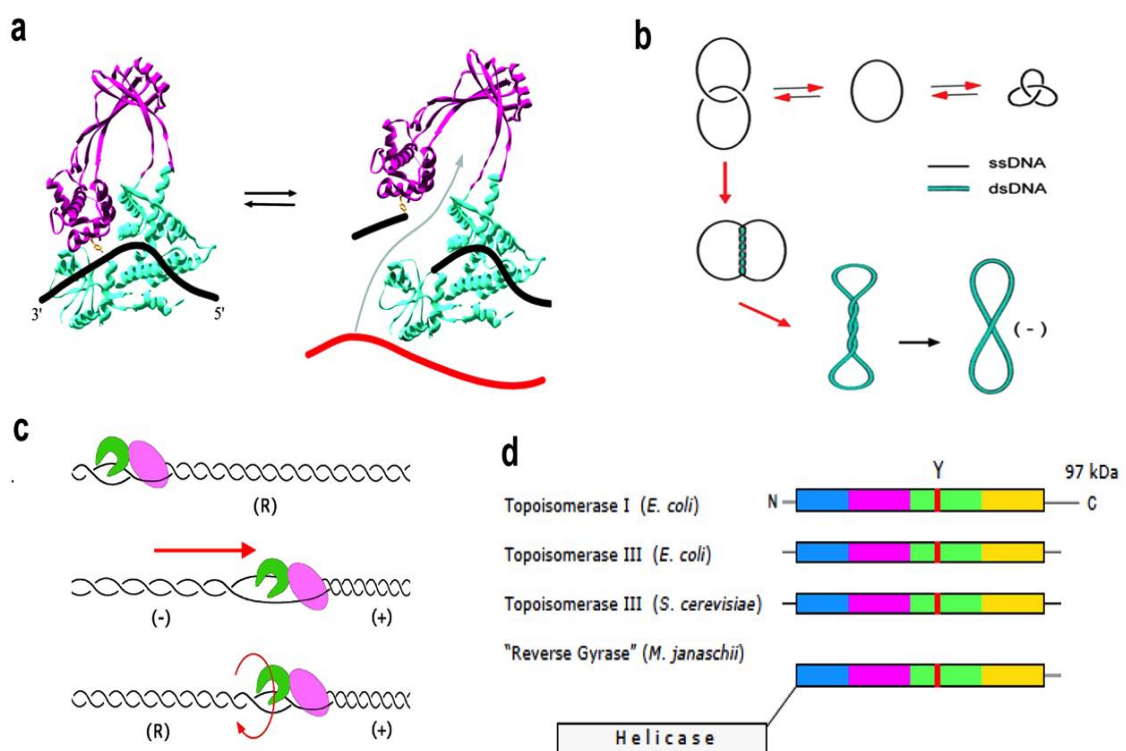


Fig. 13. a) Estructura de cinta i mecanisme de la topoisomerasa I de *E. coli* (Champoux, 2002). b) Transformacions topològiques catalitzades per les topoisomerases de tipus IA. c) Mecanisme d'acció de la girasa reversa. d) Esquema comparatiu de les seqüències de 3 topoisomerases tipus IA i la girasa reversa.

Les topoisomerases de tipus IA estan presents als tres dominis de la vida, arqueobacteris, eubacteris i a tots els eucariotes, solament estan absents en els virus.

A la majoria de bacteris i a *E.coli* hi ha dos topoisomerases tipus IA, la topol (Wang, 1971) i la topolIII (Srivenugopal *et al*, 1984) que en condicions fisiològiques té una dèbil activitat relaxadora.

INTRODUCCIÓ

En el llevat hi ha solament una topoisomerasa de tipus IA, la topo III de 656 kDa, amb menys de 500 molècules per cèl·lula (Ghaemmaghami *et al*, 2003). La topo III té una activitat dèbil i associada funcionalment a les helicases. En el *Saccharomyces cerevisiae* la falta de la topo III no és letal, solament ocasiona un fenotip de creixement més lent, hiperrecombinació, esporulació defectuosa (Wallis *et al*, 1989) i inestabilitat dels telòmers (Kim *et al*, 1995), mentre que en el llevat de fissió, *Squizosaccharomyces pombe*, l'absència de la topo III és letal (Goodwin *et al*, 1999).

Un cas especial en el grup de les topoisomerases de tipus IA és l'anomenada girasa reversa, (Fig 13c) present en arqueobacteris hipertermòfils i termòfils (Confalonieri *et al*, 1993), el qual sembla un enzim quimèric format per la fusió d'una topoisomerasa de tipus IA amb una helicasa. La seva funció és incorporar voltes positives a l'ADN amb hidròlisi d'ATP, per contrarestar l'apertura de la doble hèlix causada per l'alta temperatura de les aigües termals.

En els eucariotes superiors i en metazous hi ha dos isoenzims IA, la topoisomerasa III α i la III β que son bioquímicament similars, però amb rols diferents *in vivo* i no compensables. L'isoenzim III α és essencial, (Plank *et al*, 2005, Mönnich *et al*, 2010, Li i Wang, 1998). En el cas de la topoisomerasa III β , la seva absència és viable però, s'ha descrit fenotips dèbils que moren prematurament (Kwan i Wang, 2001) i baixada de la fertilitat, (Kwan *et al*, 2003), també hi ha un augment de la carcinogènesis. La topoisomerasa III β podria tenir una acció de supressió tumoral (Oliveira-Costa *et al*, 2010).

4.3. Topoisomerases IB

La primera topoisomerasa de tipus IB va ser descrita en cèl·lules embrionàries de ratolí (Champoux i Dulbecco, 1972). Les topoisomerases de tipus IB son enzims monomèrics que no requereixen ATP en el seu cicle catalític, l'activitat d'aquests enzims és únicament relaxadora i el seu mecanisme d'acció consisteix en tallar una de les dues cadenes del dúplex (Fig.14a), de forma que l'altre cadena queda lliure per rotar (McCoubrey i Champoux, 1986) i així eliminar la tensió helicoïdal, positiva o negativa, després de la qual cosa l'enllaç fosfodiester entre els segments d'ADN es torna a formar (Champoux *et al*, 1990). En aquest cas l'intermediari covalent entre l'ADN i la tirosina del centre actiu es forma a l'extrem 3' de l'ADN. Aquests enzims tenen un espai central format per el domini C-terminal en el qual cap tota la doble

hèlix amb prou espai per fer la rotació de l'extrem 5' i el centre actiu amb el residu de tirosina que reacciona amb l'ADN està dins d'aquesta cavitat. Aquest centre actiu està molt conservat estructuralment (Lynn *et al*, 1989; Eng *et al*, 1989). Els altres dominis son variables de forma que el pes molecular de les topoisomerases IB eucariotes està entre 95 i 135 kDa (Lynn *et al*, 1989; Eng *et al*, 1989). Una topoisomerasa de tipus IB molt simplificada és la topoisomerasa I del poxivirus *Vacciniavirus*, que té un pes molecular de 32 kDa (Shuman i Moss, 1987) mentre que en el llevat comú és de 90 kDa, es tracta d'una proteïna molt abundant, a *S. cerevisiae*, hi ha aproximadament 3000 molècules per cèl·lula (Ghaemmaghami *et al*, 2003) i la seva distribució és sobretot nucleolar i en regions molt transcrites (Muller *et al*, 1985).

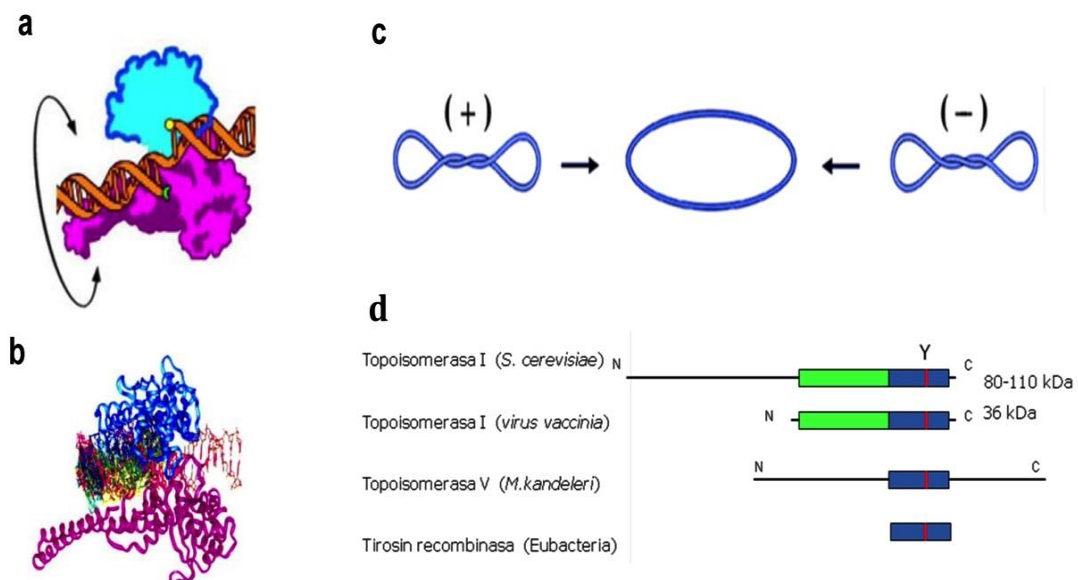


Fig 14. a) Mecanisme d'acció de la topoisomerasa I de llevat. b) Esquema en cinta de la topoisomerasa I, c) Transformacions topològiques catalitzades per les topoisomerases tipus IB. d) Comparació dels dominis entre les topoisomerases I, de llevat comú i virus vaccinia, la topoisomerasa V i les seqüències tirosin recombinasa trobades a eubacteris per seqüenciació massiva. En blau es representa la seqüència amb el centre actiu que conté la tirosina, en verd es representa la seqüència conservada N-terminal i les regions variables es representen lineals.

Les topoisomerases de tipus IB no s'han trobat a les arqueobactèries i a molts grups d'eubactèries, per exemple en *E.coli* i en *Bacillus* estan absents. Estan presents a tots els eucariotes, les mitocondries dels mamífers i en els poxivirus. A les espècies estudiades hi ha un sol isoenzim, la denominada topo I. També

INTRODUCCIÓ

estan presents en el recentment descobert grup dels mimivirus, format per una sola espècie que infecta *Acanthamoeba* (Benarroch *et al* 2006).

Dins d'aquest grup està també la topoisomerasa V (Fig.14d) descoberta a *Methanopyrus kandleri* (Slesarev *et al*, 1993), que creix fins a 110°C, és un enzim gran, de 112 kDa que pot relaxar bé la tensió helicoïdal positiva i negativa (Taneja *et al*, 2007), el seu extrem N-terminal de 61kDa té similitud estructural amb les topoisomerases IB i les tirosin recombinases (Belova *et al*, 2001a) però en l'extrem C-terminal té funció de reparació de seqüències apuriniques-apirimidiniques (AP) (Belova *et al* 2002b), el sentit d'aquesta quimera podria ser reparar les alteracions produïdes a l'ADN per sobre dels 110°C.

4.4.Topoisomerases de tipus IIA

El tercer grup de topoisomerases a ser descobert va ser el tipus IIA amb la girasa bacteriana, (Gellert *et al*, 1976) que reduïa l'Lk d'un plasmidi fent despesa energètica. Curiosament la girasa bacteriana és una excepció dins de les topoisomerases IIA, perquè en lloc de relaxar l'ADN introdueix voltes negatives.

La girasa, com les topoisomerases IIA bacterianes, és un heterotetràmer (Kato *et al*, 1990; Higgins *et al*, 1978), en canvi, les topoisomerases IIA eucariotes son homodímers (Berger, 1998) (Fig.15b) i es requereix la hidròlisi de dues molècules d'ATP per cicle de transport en el funcionament de totes elles.

Les topoisomerases de tipus IIA eucariotes estan formades per dues subunitats idèntiques de aproximadament 180 kDa, en el cas de *Saccharomyces cerevisiae* son 164,2 kDa, i tenen 4 dominis funcionals, un domini ATP-asa o Porta N-terminal, un core que talla i rejunta l'ADN, un domini frontissa i un domini C-terminal menys conservat. Tot i que en els enzims bacterians, l'holoenzim és format per un heterotetràmer, en tots els casos es mantenen tres dominis estructurals bàsics per cada meitat, un domini N-terminal que és l'ATPasa, segueix un domini central dit B' i un domini dit A' amb el residu de tirosina del centre de tall-unió del segment G i després hi ha una cua C-terminal que és variable (Berger, 1998). L'estructura quaternària és formada per dues meitats acoblades que conformen una pinça amb els dominis ATPasa en els seus extrems, en el centre estan els dominis B' i A' (Fig. 15a) que son de dimerització i a través dels quals passa el dúplex d'ADN transportat. A l'interior de la pinça, en el domini

A', està el residu de tirosina que s'uneix covalentment amb el fosfat 5' de cada bri del dúplex tallat (Tse *et al*, 1980; Rowe *et al*, 1984) i els extrems 3' queden units per interaccions no covalents. La part C-terminal forma una comporta que s'obre al final del cicle per alliberar el segment T i el segment G.

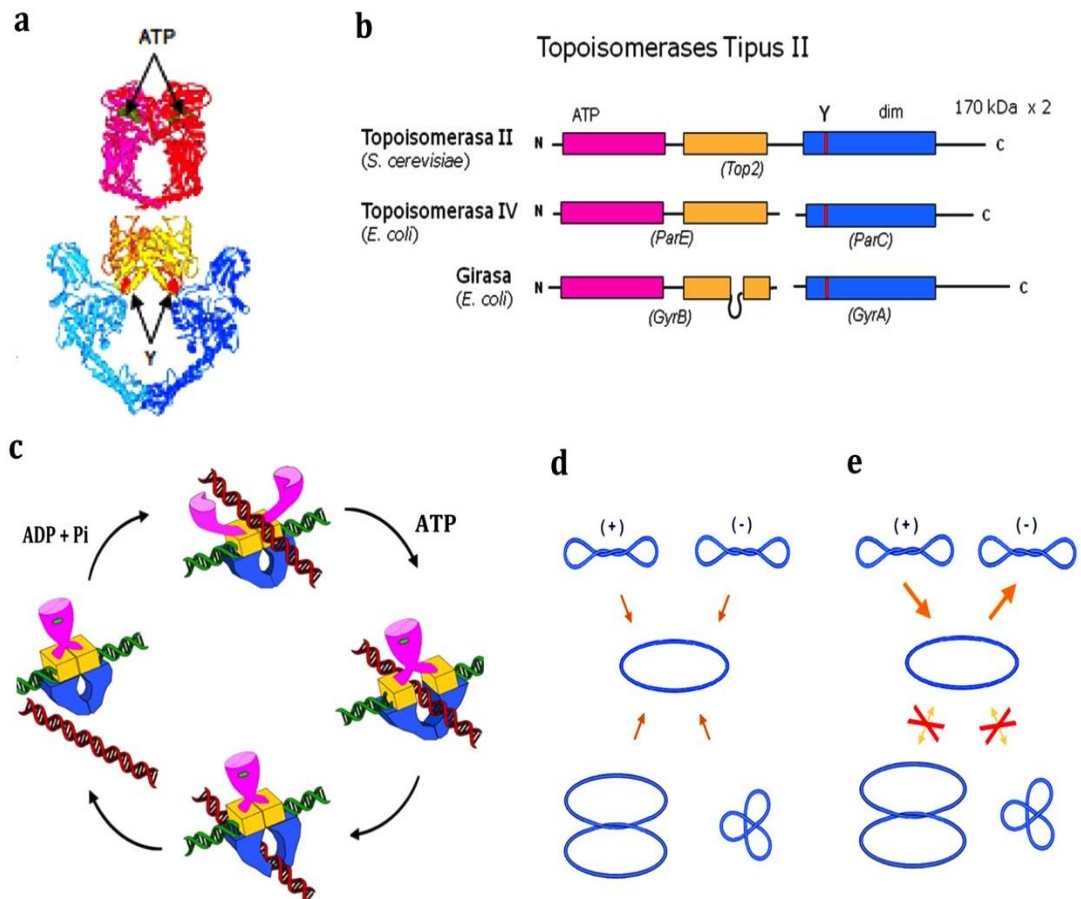


Fig. 15 a) Arquitectura de la topoisomerasa II de *Saccharomyces cerevisiae*, esquema de cintes, estan indicades amb fletxes els llocs d'unió a l'ATP i els punts de tall de l'ADN. b) Esquema comparatiu dels tres tipus bàsics de topoisomerasa del tipus IIA. c) Cicle de reacció de la topoisomerasa II de llevat. d) Transformacions catalitzades per les topoisomerases Tipus II, les transformacions es poden donar en els dos sentits, si bé l'anusament, l'encadenament i la complicació de la topologia son molt menys probables e) Transformacions catalitzades per la girasa, tot i ser un mecanisme tipus II té limitacions funcionals.

La característica distintiva de les topoisomerases tipus IIA és la capacitat de catalitzar el pas d'una doble hèlix d'ADN a través d'una altra doble hèlix (Hsieh, 1990) (Fig.15c). Aquest mecanisme és unidireccional i fa que les topoisomerases IIA siguin més versàtils que les del tipus IA o IB, ja que a més de relaxar l'Lk en

INTRODUCCIÓ

dos unitats per cicle, aquests enzims també poden anusar/desanusar i encadenar/desencadenar plasmidis (Fig 15d). Una particularitat de les topoisomerases de tipus IIA és que simplifiquen les distribucions d'equilibri de topoisòmers, cadenats i nusos per sota del seu valor termodinàmic (Rybenkov *et al*, 1997a). No està aclarit com, a nivell local, es poden seleccionar els segments T més adequats per aconseguir simplificar la topologia d'equilibri d'un gran nombre de molècules de mida considerable.

Aquest punt ha estat objecte de diverses hipòtesis i interpretacions, totes elles incompletes o poc satisfactòries, com fa intuir l'abundància de publicacions proposant explicacions. El model del lliscament actiu (Rybenkov *et al*, 1997b), postula que la topoisomerasa forma i acurta activament un llaç d'ADN per acorralar els potencials segments T. El model de la correcció cinètica (Yan *et al*, 1999), proposa que la captura i transport de l'ADN requereix dos col·lisions successives amb els potencials segments T, com a resultat la probabilitat de transport té una relació quadràtica amb la taxa de col·lisió amb l'ADN. El model del segment G en forquilla (Vologodskii *et al*, 2001) postula que la topoisomerasa produeix una pronunciada curvatura en el segment G, que du el segment T a ser transportat preferentment de dins cap a fora de la curvatura. Un altre model és el de la juxtaposició de l'ADN entrelligat (Liu *et al*, 2006) que postula que la topoisomerasa reconeix la geometria dels creuaments de ADN entrelligat com a potencials segments G i T. Així doncs el tema segueix obert i requereix encara, una explicació de com passa i perquè passa, és a dir mecànica i funcional. En dos dels articles presentats en aquesta memòria es fan aportacions en ambdós sentits.

El cicle de funcionament de l'enzim comença amb la unió d'un segment G (el que resultarà tallat) de forma que queda la pinça oberta preparada pel transport, dins de la qual queda localitzat el segment G, en aquest punt la unió del cofactor ATP causa la dimerització dels dominis ATPasa amb un allau de canvis conformacionals que fa tancar-se la pinça i en el cas d'atrapar un segment T (el que resulta transportat), aquest és mogut cap a la porta de pas de l'ADN, on el segment G és tallat transitòriament per medi de les dues reaccions de transesterificació sortint per la porta C-terminal (Roca i Wang, 1994; Roca *et al*, 1996). La hidròlisi de l'ATP comença durant el transport del segment T i conclou per permetre a la porta N-terminal la reobertura i el reinici del cicle enzimàtic. Al passar el segment T a través de les superfícies dimeritzades A'-A' s'alliberen els productes d'hidròlisi de l'ATP permetent una nova obertura

de la pinça formada per els dominis ATPasa, quedant l'enzim preparat per a un nou cicle catalític (Roca i Wang, 1994; Roca *et al*, 1996). L'activitat ATPasa amb el consegüent tancament dels dominis N-terminals no requereix la presència del segment T.

Aquest complicat cicle catalític ha pogut ser disseccionat molecularment en detall amb l'ajut de inhibidors com per exemple l'imidofosfat d'adenilil (AMP-PNP), un anàleg no hidrolitzable de l'ATP (Roca i Wang, 1992) o una bisdioxopiperazina, el ICRF-193 (Roca *et al*, 1994) que impedeixen la reobertura del domini N-terminal o per el tancament de la sortida C-terminal amb ponts disulfur reduïts introduïts per enginyeria genètica, (Roca *et al* 1996; Roca, 2004).

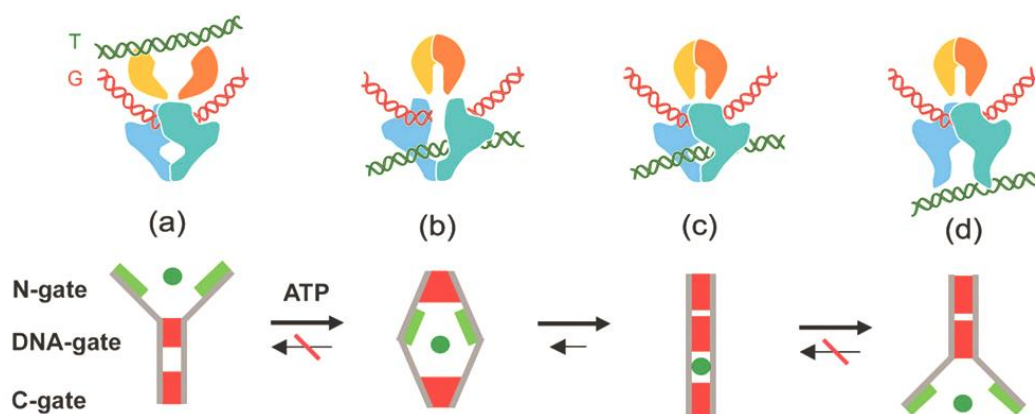


Fig.16. Els enzims de tipus IIA tenen un mecanisme per garantir la integritat del genoma, l'entrada, N-terminal i la sortida, C-terminal, estan acoblats en tot moment per dos punts de contacte entre els dímers.

El funcionament de tot aquest procés és extraordinàriament segur tot i tallar el genoma contínuament, cada enzim té un funcionament amb tres punts de unió i durant el cicle de transport en tot moment dos d'aquests tres punts estan sempre en contacte (Fig. 16) (Roca, 2009).

La girasa, anteriorment esmentada, és formada per dos subunitats A i dos subunitats B codificades pels gens *gyrA* i *gyrB* (Klevan i Wang, 1980) i té el mateix mecanisme general de funcionament que la resta d'enzims de la família, però difereix en les seves preferències de transport (Fig 15e). Els segment G (porta) i T (transportat) estan adjacents i la presència d'un domini C-terminal de la subunitat A, que abasta uns 150 pb, obliga a l'ADN a doblegar-se en forma dextrogira per creuar-se amb ell mateix (Kirkegaard i Wang, 1981). La girasa dirigeix la superposició de l'ADN per fer un creuament positiu (Bates i Maxwell,

INTRODUCCIÓ

1989; Roca, 1995) convertint cada creuament +1 en un -1. Si per enginyeria genètica s'elimina el domini C-terminal (CTD) de la subunitat A, la girasa perd la seva característica capacitat per reduir l'*Lk* i és comporta com els altres enzims del tipus IIA (Corbett *et al*, 2004).

4.5. Topoisomereses de tipus IIB

Les últimes topoisomereses en ser descrites van ser les del tipus IIB (Bergerat *et al*, 1994) en els arqueobacteris del gènere *Sulfolobus* i se'n va dir topoisomerasa VI (Fig. 17a). La seva cinètica enzimàtica és similar al de les topoisomereses del tipus IIA, però sense relació filogenètica. Les topoisomereses IIB s'han trobat també a les plantes i el seu cicle catalític requereix hidròlisi d'ATP i estan formades per un heterotetràmer de dos subunitats A i dos B.

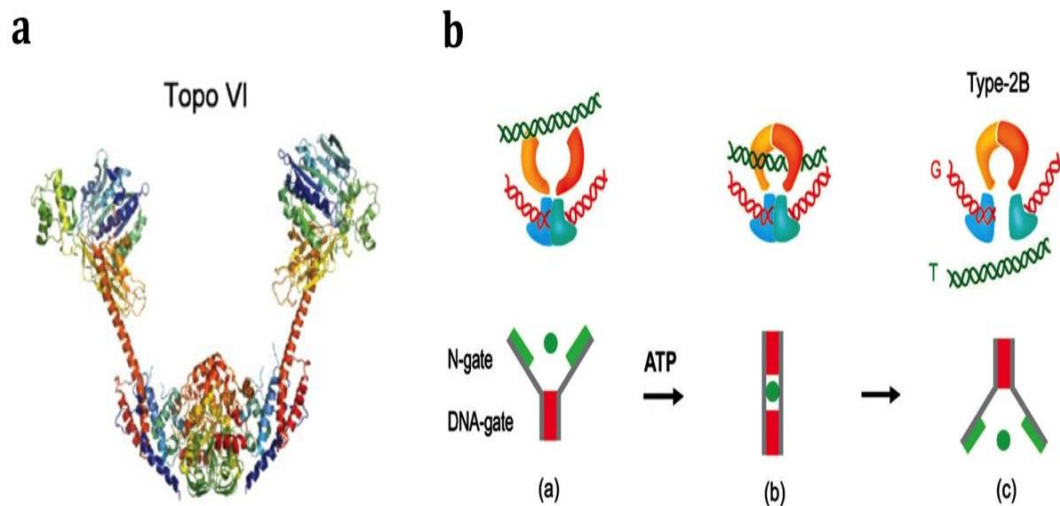


Fig 17. Topoisomerasa VI. a) Model de cintes de la topoisomerasa VI de *Sulfolobus*, les subunitats A i B (Forterre i Gabelle, 2009). b) Esquema del funcionament amb dos portes de l'enzim (Roca, 2009).

El mecanisme de les topoisomereses IIB (Fig. 17b) està menys estudiat que el de les IIA, la subunitat B té un extrem N-terminal amb un domini d'unió a ATP similar a la pinça de la topo II de llevat i la subunitat A sembla ser homòloga a la proteïna de llevat Spo11 (Bergerat *et al*, 1997), relacionada amb la recombinació meiótica i que fa talls de doble cadena, fent una unió covalent entre l'extrem 5' del fosfat de l'ADN i la tirosina del centre actiu, així doncs la subunitat A és la que talla i rejunta el segment G de l'ADN.

Recents estudis suggereixen un funcionament *two gate*, similar a les topoisomerases de tipus IIA (Corbett *et al*, 2007; Graille *et al*, 2008), però sense simplificació de la distribució d'equilibri de topoisòmers, cadenats i nusos com amb les topoisomerases IIA (Stuchinskaya *et al*, 2009). Recentment s'ha descrit una nova topoisomerasa IIB, la topoisomerasa VIII (Gadelle *et al*, 2014), en arqueobacteris i eubacteris.

4.6. Funcions i regulació de les topoisomerases

Els rols bàsics de les topoisomerases dins la cèl·lula viva es poden deduir a partir de les seves capacitats *in vitro* i dels requeriments de les transaccions genòmiques conegudes. Aquest coneixement es pot millorar i confirmar *in vivo* a partir de l'estudi dels mutants, nuls, parcials o condicionals existents, de les diferents topoisomerases.

La funció cel·lular de les topoisomerases de tipus IA s'ha relacionat amb l'eliminació de l'estrès torsional negatiu al darrera dels complexos de transcripció (Wu *et al*, 1988; Tsao *et al*, 1989; Lynch i Wang, 1993), potencials generadors de R-loops (Drolet *et al*, 1994), i amb la resolució dels intermediaris de recombinació (Schofield *et al*, 1992).

A *E. coli* la pèrdua de la topoisomerasa I és letal, però amb mutacions compensadores als gens *gyrA* o *gyrB* (Pruss *et al*, 1982; DiNardo *et al*, 1982) o sobre-expresant la topo IV (Kato *et al*, 1990), es pot fer viable possiblement a causa del manteniment de la homeòstasi entre superenrotllament negatiu i positiu coordinat pels dos enzims (Liu i Wang, 1987), tot i això la necessitat de mutacions compensatòries a la girasa ha estat qüestionada (Stupina i Wang, 2005). Quan falta la topoisomerasa III la cèl·lula és viable, però augmenta la taxa de recombinació entre seqüències repetitives i augmenten les delecions espontànies (Schofield *et al*, 1992), la topoisomerasa III també contribueix a l'estabilitat del genoma a través de la seva associació amb les helicases com RecQ (Suski i Marians, 2008). En tot cas quan falten els dos enzims la cèl·lula no és viable (Zhu *et al*, 2001), indicant la importància de la seva funció.

En el *S.cerevisiae* la delecció de la topoisomerasa III genera també fenotips de creixement lent, hiperrecombinant, amb alteracions de l'esperulació (Wallis *et al*, 1989) i inestabilitat de les regions subtèlomèriques (Kim *et al*, 1995), també és essencial per poder fer la recombinació meiótica (Gangloff *et*

INTRODUCCIÓ

al, 1999). Tant a bacteris com a *Saccharomyces*, la topoisomerasa III s'associa a helicases de la família RecQ (Wu *et al*, 2000), formant complexos de funció poc coneguda. El mateix dèficit a *Schizosaccharomyces pombe* és letal (Goodwin *et al*, 1999). En el ratolí la pèrdua de la topo III α és letal (Li i Wang, 1998), mentre que la falta de la topoisomerasa III β produeix individus dèbils (Kwan i Wang, 2001) i mort prematura (Yu *et al*, 1996).

Les topoisomerases del tipus IB son considerades com les principals relaxases cel·lulars, actuant sobre el superenrotllament de ambdós signes sense fer diferències. A partir del *twin supercoiling model* de la transcripció, la topoisomerasa I seria, amb l'ajut de la topoisomerasa II, la principal responsable d'eliminar el superenrotllament al davant i al darrere de la bombolla de transcripció (Giaever i Wang, 1988; Gartenberg i Wang, 1992) i una reducció o pèrdua simultània de les dues activitats ocasiona una ràpida baixada de la producció d'ARN (Choder, 1991), això es pot relacionar amb un creixement lent (Goto i Wang, 1985). A la replicació, està descrit un paper similar al de la transcripció per la topoisomerasa I i la topoisomerasa II, però eliminant solament superenrotllament positiu i l'absència de les dues activitats atura rapidament la replicació (Brill *et al*, 1987; Kim i Wang, 1989). Els mutants de *S. cerevisiae* Δ top1 tenen també una lleu inestabilitat gènica (Gangloff *et al*, 1999), amb una taxa de recombinació mitòtica incrementada als gens ribosomals (Christman *et al*, 1993).

A la mosca i el ratolí el genotip Δ top I és letal (Lee *et al*, 1993; Morham *et al*, 1996). En metazous la topoisomerasa I sembla tenir un paper important a la transcripció ja que s'ha vist que l'enzim està localitzat en els gens més activament transcrits (Zhang *et al*; 1988; Stewart *et al*, 1990). Estudis fets *in vitro* fan pensar que la topoisomerasa I s'uneix al domini C-terminal fosforilat de la subunitat major de la ARN polimerasa II (Wu *et al*, 2010), també s'ha vist la interacció amb el TFIID per fer de coactivador específic de la iniciació de la transcripció, el canvi de la tirosina del centre actiu per una fenilalanina no afecta aquesta funció, per tant no estaria relacionada amb l'activitat relaxadora (Merino *et al*, 1993; Shykind *et al*, 1997). Sembla que en els eucariotes la topoisomerasa I s'expressa constitutivament (Thrash *et al*, 1985).

Les topoisomerases de tipus II tenen la funció primària d'invertir els creuaments i fer i desfer els encadenaments i nusos que es produeixen en el material genètic. Aquesta capacitat d'invertir creuaments

fa que la cèl·lula les pugui fer servir també com a relaxases. La capacitat de desencadenar és clau per poder separar les cadenes germanes acabades de replicar i acabar amb èxit la divisió cel·lular (Dinardo *et al*, 1984; Baxter i Diffley, 2008; Bermejo *et al*; 2007). Estudis *in vivo* han mostrat la necessitat de la topoisomerasa II en els últims estadis de la condensació mitòtica i meiótica i a l'inici de la descondensació (Uemura *et al*, 1987; Newport, 1987; Downes *et al*,1991;1994).També tenen un paper, relaxant de la tensió helicoidal generada per les polimerases d'ADN i ARN (Liu i Wang, 1987; Giaever i Wang, 1988).

En els bacteris, la girasa junt amb la topol, controlen el nivell de tensió helicoidal just pel bon funcionament cel·lular i la topoisomerasa IV té la funció de desanular les cadenes acabades de sintetitzar a la replicació. La falta de la girasa (Reece, Maxwell i Wang, 1991) i de la topoisomerasa IV (Kato *et al*, 1990) son letals.

En els bacteris, quan baixa el superenrotllament negatiu, augmenta l'expressió dels gens GyrA i GyrB i quan aquest creix, la transcripció del gen TopA també ho fa (Menzel i Gellert, 1983; Tse-Dinh i Beran, 1988).

Un fet anàleg al dels bacteris passa a *Saccharomyces cerevisiae*, si falta la topoisomerasa II no hi ha segregació cromosòmica (Holm *et al*, 1985) però mentre queda activitat relaxadora la forquilla de replicació pot seguir avançant, però si els dos enzims; topoisomerasa I i topoisomerasa II queden inoperants, la forquilla de replicació s'atura al cap d'uns centenars de parells de bases (Brill *et al*, 1987; Kim i Wang, 1989). Després de la replicació, l'activitat relaxadora de la topoisomerasa II, junt amb la de la topoisomerasa I, també és necessària pel correcte acoblament de les histones a *S.cerevisiae* (Garinther i Sghultz, 1997). També, en el cas de les protamines, s'ha descrit una activitat topoisomerasa II molt elevada quan aquestes ocupen el lloc de les histones a la espermatogènesi (Roca i Mezquita,1989). La topoisomerasa II podria intervenir a la remodelació dels nucleosomes (Varga-Weisz *et al*, 1997), sembla que existeix una interacció amb el complex de remodelació però es discuteix la seva especificitat (Eberharter *et al*; 2001). L'expressió de la topoisomerasa II a llevat està incrementada a la fase G2 (Heck *et al*, 1988).

INTRODUCCIÓ

En els vertebrats hi ha dos isoenzims, la topoisomerasa II α i la topoisomerasa II β (Drake *et al*, 1987) i tant la topoisomerasa II α (Coob *et al*, 1997), com la topoisomerasa II β (Yang *et al*, 2000) son imprescindibles i no compensables. La presència de dos isoenzims fa pensar en funcions especialitzades, els dos isoenzims tenen funcions diferents (Wang, 2002), i estan regulats de forma diferent i s'expressen en diferents condicions fisiològiques.

La isoforma topoisomerasa II α està implicada en la replicació i la mitosi. S'ha vist que a major proliferació major concentració de topoisomerasa II α (Heck i Earnshaw, 1986; Drake *et al*, 1989), que té una expressió més intensa a les fases G2 i M del cicle cel·lular (Drake *et al*, 1989; Kimura *et al*, 1994), en general la isoforma II α podria funcionar en la condensació, descondensació i segregació de les cromàtides germanes, fent un paper anàleg a la topoisomerasa II del llevat o de la mosca.

La topoisomerasa II β s'expressa a cèl·lules en repòs mitòtic i diferenciades (Capranico *et al*, 1992; Tsutsui *et al*, 1993; Turley *et al*, 1997) però la seva funció està encara poc definida, se sap que s'uneix a la llocs reguladors d'un cert nombre de gens (Lyu *et al*, 2006), alguns d'aquests podrien tenir un paper important en el desenvolupament i diferenciació del sistema nerviós (Tiwari *et al*, 2012), també s'ha vist la seva ubicació en promotors que podrien regular la seva activació per canvis locals de la topologia de la cromatina en un punt específic (Ju *et al*, 2006). En el domini C-terminal hi ha modificacions com la fosforilació (Bakshi *et al*, 2001), ADP-ribosilació (Darby *et al*, 1985), SUMO-lació (Takahashiet *al*, 2006) que podrien tenir algun paper a la regulació, ja que pot ser alterat sense canvis a la seva activitat relaxadora *in vitro*.

Una possibilitat de control de l'activitat topoisomerasa IIA *in vivo* podria ser la presència de molècules amb la funció cadenat a l'entrada N-terminal o a la sortida C-terminal, però aquests elements hipotètics que actuarien com un cadenat, encara no s'han trobat (Roca, 2009). L'abundància de la topoisomerasa II en el nucli cel·lular (Berrios *et al*, 1985; Earnshaw *et al*, 1985; Gasser *et al*, 1986; Heck i Earnshaw, 1986), fa intuir un possible paper estructural, que estudis posteriors no han permès encara confirmar (Hirano i Mitchison, 1993; Chang *et al*, 2003).

4.7. Aplicacions biomèdiques de les topoisomerases

El descobriment que alguns antibiòtics aturaven el creixement bacterià inhibint la girasa (Gellert *et al*, 1977; Gellert *et al*, 1981) i que alguns antitumorals també actuaven inhibint les topoisomerases I i II eucariòtiques (Tewey *et al*, 1984; Nelson *et al*, 1984) va convertir aquests enzims en dianes en el camp de la biomedicina. A dia d'avui, els verins i inhibidors de topoisomerases son àmpliament utilitzats per lluitar contra les infeccions bacterianes i els tumors (Taula 2) i també se n'estudien altres aplicacions.

La majoria de drogues que tenen com a diana les topoisomerases, actuen estabilitzant l'intermediari ADN-proteïna produït en el curs del cicle enzimàtic, deixant talls a l'ADN que, en punt superen la capacitat reparadora de la cèl·lula, desencadenen la mort programada, aquests compostos son els denominats verins. Altres tipus de fàrmacs funcionen com a inhibidors sense produir lesions al genoma, interferint la utilització de l'ATP, tancat la porta d'entrada de l'enzim, o interferint la unió de l'ADN.

En el camp dels antibiòtics hi ha les quinolones i les cumarines que actuen contra la girasa i la topo IV bacteriana. El mecanisme de les primeres consisteix a impedir la religació dels extrems tallats de l'ADN, estabilitzant l'intermediari covalent proteïna-ADN per unió a la subunitat A de la Girasa (Sugino *et al*, 1977; Gellert *et al*, 1977), en el qual quedarien aturades les polimerases (Hsiang *et al*, 1989; Covey *et al*, 1989; Zhang *et al*, 1990; Tsao *et al*, 1993) produint llavors la mort cel·lular, per tant, quan més actives siguin les cèl·lules, més sensibles seran al verí (Liu, 1989; Chen i Liu, 1994). Recentment han aparegut plasmidis de resistència a les quinolones, uns produeixen la proteïna Qnr, la qual protegeix la girasa de l'antibiòtic, altres produeixen acetilases que inactiven les quinolones (Robiseck *et al*, 2006). En el cas de les cumarines el mecanisme consisteix a impedir la hidròlisi de l'ATP actuant sobre la subunitat B de la girasa i TopoIV, com a inhibidors competitiu (Lewis *et al*, 1996).

S'investiga en nous antibiòtics contra les topoisomerasa IA (Zhu *et al*, 2001; Takel *et al*, 2001) i contra les topoisomerases IB, similars a les dels poxivirus que tenen alguns patògens com *Mycobacterium* o *Pseudomonas* (Tse-Dinh, 2007). Aquests compostos podrien proporcionar també antivirals per poxivirus basats en inhibidors de la seva topoisomerasa IB (Krogh i Shuman, 2002; De Fonseca i Moss, 2003).

INTRODUCCIÓ

Els antitumorals tenen com a diana les topoisomerases I i II dels eucariotes. La campotecina i derivats son verins de la topoisomerasa I eucariota, actuen estabilitzant el complex ADN-Proteïna (Redinbo, 1998), tenen aplicació terapèutica en el tractament de tumors i més recentment com antiparasitaris (*Leishmania*, *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Tripanosoma*), (Prada *et al* 2013), en aquesta direcció, però amb diferent diana, s'ha vist la presència d'una girasa pròpia de l'apicoplast de protozous del *phylum* apicomplexa (Nagano *et al*, 2014), que podria ser la base d'antiparasitaris d'última generació.

Famílies	compost	Diana	Mecanisme	Aplicació
Quinolones	Àcid Nalidíxic Àcid Oxolínic Ciprofloxací Norfloxací Novobiocina	Girasa TopoIV	Verí	Antibiòtics
Cumarines	Coumermicina Clorobiocina Ciclotialidina	Girasa Topo IV	Inhibidor	Antibiòtics
Bisdioxopiperacines	ICRF 187 (Dexrazoxane) ICRF 193 ICRF 159	Topo II eucariota	Inhibidor	Investigació, cardioprotectors contra les antraciclins
Campotecines	Campotecina Topotecan Irinotecan	Topo IB eucariota	Verí	Antitumorals Antiparasitaris
Lamellarines	Lamellarina D	Topo IB eucariota	Verí	Antitumorals
Peptids	Peptid LetD Microcina B17 Adriamicina	Girasa Topo IV	Verí	Investigació
Antraciclins	Doxorubicina Daunorubicina Epirubicina Mitoxantrona	Topo II (Eucariota)	Verí	Antitumorals
Aminoacridines	Amsacrina	Topo II (Eucariota)	Verí	Antitumorals
Epipodofilotoxines	Etopòsid Tenipòsid	Topo II (Eucariota)	Verí	Antitumorals
Elipticines		Topo II (Eucariota)	Verí	Antitumorals
altres	Merbarone Genisteïna	Topo II (Eucariota)	Inhibidor	Investigació Antitumorals

Taula 2. Antibiótics i antitumorals més habituals en clínica humana, veterinària i en investigació

Els altres antitumorals actuen sobre la topoisomerasa II, els principals grups són les antraciclins, aminoacridines, elípticines i epipodofilotoxines. Tot i la seva utilitat antitumoral, tenen importants efectes secundaris, les antraciclins generen radicals lliures, sent potencials productores de tumors secundaris,

mielodisplàsies i leucèmia mieloide aguda (LMA) (Pedersen-Bjergaard *et al*, 2002) i tenen també una cardiotoxicitat associada al seu efecte col·lateral sobre la Topo II β (Zhang *et al*, 2012) per falta d'especificitat entre els isoenzims α i β dels mamífers, això fa interessant la recerca de verins selectius contra la Topo II α (Potter *et al*, 2015). Les línies tumorals també poden adquirir resistència, inactivant l'enzim que transforma la pro-droga en principi actiu, o alternativament, expressant isoenzims del citocrom P450 amb menys activitat biotransformadora.

Existeix un altre grup de molècules que actuen com inhibidors competitiu, les bisdioxopiperazines, que estableixen les pinces tancades de l'enzim després de relligar l'ADN (Andoh i Ishida, 1998) de forma que ja no catalitza més transports. Aquesta família es més utilitzada en investigació, però alguns dels seus membres com el dexrazoxan, es fan servir com a cardioprotectors front a la cardiotoxicitat de les antraciclines (Cvetkovic, 2005) i existeix una patent europea de 2000 per fer-lo servir en el tractament d'intoxicacions per extravasació d'antraciclines. La base d'aquestes aplicacions és que l'enzim inhibit no pot ser enverinat, de forma que la cèl·lula no acumula lesions a l'ADN. Nous compostos inhibidors de la Topo IV i la girasa bacteriana basats en impedir la unió de l'ATP a l'enzim son estudiats per sumar-los a l'arsenal terapèutic (Ehmann i Lahiri, 2014).

5. TOPOLOGIA DE L'ADN A LA CROMATINA

L'ADN *in vivo* representa una realitat molt diferent de la que podem estudiar a la majoria d'experiments de laboratori. Tots els organismes empaqueten i proteïtzen el seu ADN per fer compatible un volum reduït amb la realització eficient i ordenada de les seves funcions. L'ADN, tal i com es troba a la cèl·lula viva, proteïtitzat i compactat, és el component essencial de la cromatina. Generalment aquesta paraula es reserva a les cèl·lules eucariòtiques, això no vol dir que els procariotes tinguin el seu cromosoma nu i lliure en el citoplasma, es coneixen diverses proteïnes associades al nucleòide (NAPs) que son diferents funcionalment i estructural de les histones, ja que estableixen solament part de la tensió helicoidal (Sinden *et al*, 1980).

INTRODUCCIÓ

5.1. Composició i estructura macroscòpica

Els eucariotes, a diferència dels bacteris, tenen múltiples cromosomes lineals, que adopten estats diferents: mitòtics o interfàsics, en el cicle cel·lular. A la mitosi assoleixen un factor de compactació de 10.000 respecte de l'ADN nu. Els detalls mecànics i estructurals del procés de compactació són poc coneguts. Els cromosomes interfàsics són el material amorf visible dins al nucli cel·lular. Tot i aquesta aparença caòtica es creu que estan poc barrejats i que les seves fibres no es creuen i estan ordenades ocupant territoris definits (Cavalli i Misteli 2013). Aquest ordre és enigmàtic per l'abundant presència al nucli, de la topoisomerasa II, ja que teòricament, aquest enzim atorga a l'ADN les propietats d'una fibra fantasma però en canvi sembla que els cromosomes interfàsics estan molt individualitzats.

La cromatina es compon d'histones i ADN, el qual sols representa l'1% del volum nuclear, en quantitats similars, junt amb quantitats variables de proteïnes no histones i ARN. La cromatina interfàsica, segons el seu estat de condensació, serà heterocromatina o eucromatina. L'heterocromatina representa normalment entre el 10 i el 30% del total, (Walker, 1971), és la més condensada i pot ser constitutiva: centròmers i telòmers, o facultativa: gens resistents a l'expressió. L'eucromatina, menys compactada, és transcrita en major o menor grau i conté la informació que fa servir la cèl·lula per funcionar en un moment determinat.

Les histones són les proteïnes més abundants i regulars estequiomètricament de la cromatina, tenen caràcter bàsic, són de baix pes molecular, càrrega positiva i estan extraordinàriament conservades a l'arbre de la vida. Hi ha descrits cinc tipus d'histones, l'H1, l'H2A, l'H2B, l'H3 i l'H4 i cada una d'aquestes té variants, especialment la H2A i H3. Hi ha també modificacions químiques que afecten les cues de les histones, com metilació, acetilació, ADP-ribosilació, fosforilació, glucosilació, SUMOiació i ubiquitinació que n'afecten la càrrega, la forma i altres propietats. Aquestes variants, alteren les interaccions histona-ADN afectant la funció de la cromatina dins la cèl·lula. La unió histona-ADN és electrostàtica, així augmentant la força iònica del medi es pot aconseguir la dissociació (Burton *et al*, 1978).

El segon grup de proteïnes de la cromatina és molt heterogeni i s'engloba sota el nom de proteïnes no histones. Aquestes són les que es poden extreure amb tractaments suaus amb detergents o sals, prèviament a les histones. Formen un percentatge molt variable del material que no és ADN. Són els

enzims del metabolisme de l'ADN, com la topo I i la topo II, hi ha també les chaperones d'histones CAF1 ensambladores de les histones H3 i H4 i NAP1 ensambladores de les histones H2A i H2B, els enzims modificadors d'histones, factors de transcripció, receptors hormonals, proteïnes de la família HMG: HMG 1/2, HMG 14/17 i HMG I/T, també les proteïnes SMC, cohesines i condensines, ATPases amb un domini frontissa i que intervenen a la mitosi ajudant a conformar els cromosomes metafàsics. Finalment podria haver les proteïnes que formarien una hipotètica bastida cromosòmica (Paulson i Laemmli 1977).

La topoisomerasa II és molt abundant en el cromosoma mitòtic (Earnshaw *et al*, 1985; Gasser *et al*, 1986), això ha fet pensar en un possible paper estructural, ancorant l'ADN a una bastida proteica (Saiato i Laemmli, 1993). S'ha proposat un paper condensador de la cromatina (Bojanowski *et al*, 1998). La seva distribució en el cromosoma ha estat investigada amb resultats contradictoris, alguns autors la situen a l'eix longitudinal de les cromàtides (Earnshaw i Heck, 1985; Maeshima i Laemmli, 2003), altres distribuïda uniformement al llarg del cromosoma (Cristensen *et al*, 2003), mentre que per altres està concentrada al cinetocor (Rattner *et al*, 1996; Sumner, 1996).

L'ARN també està present a la cromatina en proporció propera al 5% com a transcrits naixents, com a regulador en el silenciament gènic i podria tenir un paper estructural (Rodríguez-Campos i Azorin, 2007).

5.2. El nucleosoma

El nucleosoma és el primer nivell de compactació de l'ADN, està format per un octàmer amb dos subunitats de cada una de les histones: H2A, H2B, H3 i H4, rodejat per unes 145-147 parelles de bases en espiral levogira de 1'7 voltes aproximadament (Finch *et al*, 1977; Richmond *et al*, 1984; Luger *et al*, 1997). Aquest element es coneix com *core* i si afegim l'ADN espaiador o *linker*, parlem del nucleosoma, que fa uns 200 pb. La histona H1 queda fora de l'octàmer i no sempre està present, la seva absència està associada a l'activitat gènica.

L'estructura del nucleosoma es coneix amb cert detall a partir d'estudis amb nucleosomes cristal·litzats analitzats per raigs X (Luger *et al*, 1997) (Fig. 18).

INTRODUCCIÓ

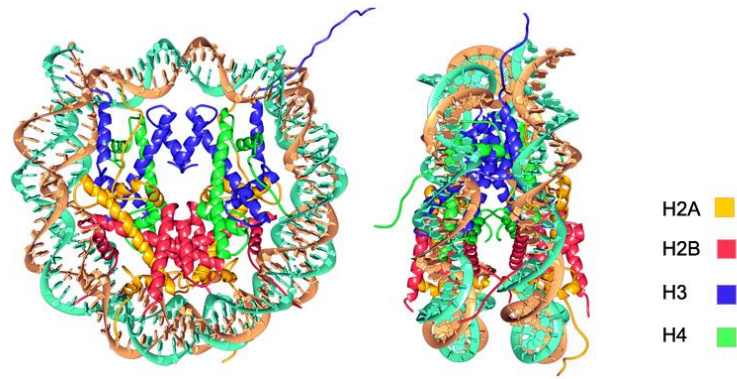


Fig. 18. Estructura del nucleosoma a partir de estudis cristal·logràfics (Luger *et al*, 1997)

Els nucleosomes son visibles al microscopi electrònic i inicialment es van anomenar partícules *ps* o cossos *nu*, abans que fossin definitivament batejades com a nucleosomes (Oudet *et al*, 1975). La coneguda imatge en collaret de comptes es dona *in vitro*, (Fig. 19A) en situacions de baixa força iònica i absència de histona H1 (Thoma, Koller i Klug, 1979), quan està present la histona H1 la imatge obtinguda és en zig-zag (Fig.19B) i llavors es parla de cromatosomes, això és determinant pel pas al nou nivell de compactació.

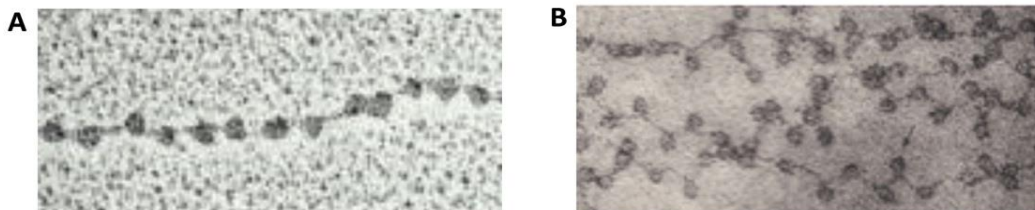


Fig 19. Diferents conformacions de la fibra de 11 nm. A). Sense histona H1 i baixa força iònica (Molecular Biology of the Cell. 4^a edició. 2002), B). Condicions similars conservant la histona H1 (Olins i Olins, 2003).

A dins del nucli cel·lular, els virus d'ADN i plasmidis eucariotes també es cromatinitzen i es converteixen en minicromosomes (Fig. 20). Aquest fet, freqüent al llevat, els converteix en elements molt útils per estudiar la topologia de la cromatina ja que al ser molècules CCC, una vegada han estat purificats conserven l'Lk que tenien *in vivo* de forma que pot ser estudiat fàcilment.

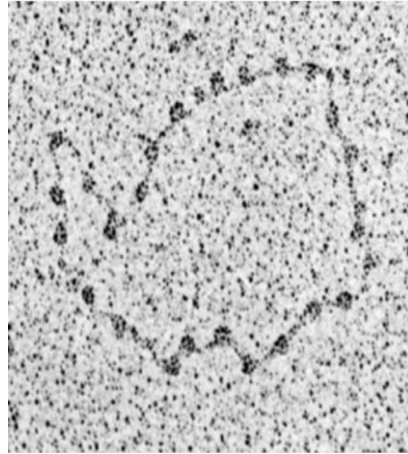


Fig. 20. Minicromosoma eucariotic del virus SV40 (Lutter *et al*, 1992).

Els nucleosomes no estan col·locats de forma inespecífica al llarg dels gens, si bé la majoria de seqüències genòmiques tenen una certa capacitat promig d'unir-se a les histones, existeix un codi de posicionament ben definit, del lloc dels nucleosomes. Això passa també al llevat (Brogaard *et al*, 2012). La major part dels gens de llevat tenen una regió de entre 50 i 150 pb sense nucleosomes abans del inici de transcripció i al lloc de terminació (Sekinger *et al*, 2005), hi ha també uns nucleosomes ben posicionats a l'inici i final d'aquesta regió, anomenats -2, -1 i +1 (Yuan *et al*, 2005). La correcta situació de certs nucleosomes té un paper important en la regulació de l'expressió gènica (Rando, 2012), però en general la cromatinització té un rol negatiu en la transcripció (Han i Grunstein, 1988) ja que els nucleosomes impedeixen l'accés de les polimerases. La ubicació dels nucleosomes de determinades seqüències, no varia si aquestes seqüències estan ubicades en un plasmidi o en el cromosoma (Perez-Ortin *et al*, 1987), aquest fet és interessant com a eina d'investigació. Les histones també poden reclutar proteïnes per interacció amb les seves cues. Els nucleosomes poden tenir doncs, papers inhibidors o estimuladors de l'expressió gènica (Kornberg i Lorch, 1999; Wyrick *et al*, 1999).

5.3. Topologia del nucleosoma

Des de fa més de 30 anys està acceptat que cada nucleosoma, amb casi dos voltes levogires d'ADN, estableix aproximadament una unitat negativa d' Lk , aquest valor està probablement subestimat i va ser

INTRODUCCIÓ

obtingut estudiant el virus SV40 (Shure i Vinograd, 1976). Aquesta diferència es coneix com la paradoxa del número d'enllaç, ja que l'ADN del *core* dóna aproximadament 1'7 voltes levogires sobre les histones però solament s'ha descrit que estabilitza una unitat negativa de Lk . Això es pot atribuir a la dinàmica de l'ADN nucleosomal, que no té una estructura fixa i invariable, sinó que quan està proper a un estat relaxat, oscil·la fent un *breathing* de forma que la disposició dels segments d'ADN d'entrada i sortida en el *core* pot fluctuar (Sivolob *et al*, 2003; Sivolob i Prunell, 2004), aquesta disposició pot ser un creuament negatiu, amb un ΔWr proper a -1'7, no haver creuament o tenir un creuament positiu i ΔWr proper a 0. L'equilibri entre els tres estats (Fig. 22a), en promig, produiria un ΔLk més proper a -1 que a -1'7. Sota tensió helicoidal negativa es pot acceptar que l'ADN tendeix a plegar-se sobre les histones, mentre que amb tensió helicoidal positiva, l'ADN tendirà a separar-se de les histones, això es coneix com *opening* (Fig. 21).



Fig 21. Flexibilitat i *opening* de la partícula core. a) Core tancat. b) Hi ha trencament de les interaccions entre histones H3 H4, en negre i H2A H2B, en blanc. c) *Opening*, un grau més amb el desenrotllament de l'ADN (De Van Holde a partir de Libertini i Samll, 1982)

La topologia dels nucleosomes pot variar aplicant tensions a la cromatina *in vitro*, sense perdre les histones (Bancaud *et al*, 2006 i 2007). S'ha proposat una transició nucleosoma – reversoma, aplicant prou tensió helicoidal positiva (Bancaud *et al*, 2007). L'ADN, al desenrotllar-se de les histones podria causar un desplegament dels dímers H2AH2B respecte del tetràmer (H3H4)₂ (Baxevanis *et al*, 1991), afavorint una transició nucleosoma – reversoma (Fig. 22b), reorganitzant l'octàmer al causar un canvi estructural dels dímers (H2AH2B) respecte del tetràmer (H3H4)₂, deixant un octàmer invertit, diferent del canònic.

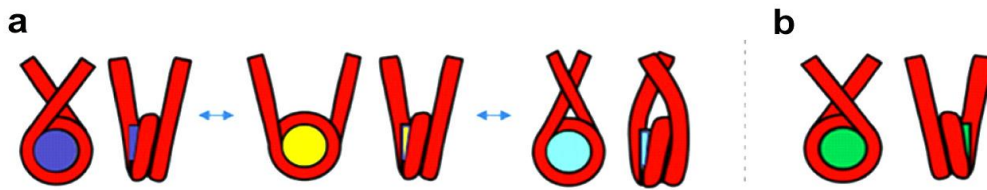


Fig. 22. a). Nucleosomes levogirs amb diferent conformació: creuament negatiu (ΔLk estabilitzat -1,4), sense creuament (ΔLk estabilitzat -0,7) i amb creuament positiu (ΔLk estabilitzat -0,4). b). Hipotètic reversoma (ΔLk estabilitzat + 0,85). (Barbi *et al*,2012).

5.4. Nivells superior de compactació

Amb la cadena de nucleosomes, l'ADN passa d'un gruix de 2 nm a 11 nm i es redueix unes 6 vegades la seva longitud. En el següent nivell de compactació ja s'arriba als 30 nm de gruix, això passa quan està present la histona H1 (Thoma i Koller, 1981), amb una estequiometria de una H1 per cada 200 pb, la fibra de 30 nm sembla doncs requerir de la presència de la histona H1 per formar-se, tot i que no resulta imprescindible per la vida en el llevat (Ushinsky *et al*, 1997; Patterton *et al*, 1998). La falta de un 10% de la H1 impedeix la formació de la fibra de 30 nm (Thoma i Koller, 1981). Les cues N i C terminals de les histones son també essencials per mantenir l'estructura de 30 nm (Fletcher i Hansen, 1996; Widom, 1998). Aquest plegament secundari de la cadena de nucleosomes no està ben definit, hi ha diferents models: Model del solenoide (Finch i Klug, 1976) (Fig.23a), model del superbead (Kiryanov *et al*, 1976; Franke *et al*, 1976), model del doble helicoidal (Woodcock *et al*, 1984) (Fig. 23b), però està per demostrar la seva validesa, ja que la microscòpia no permet dilucidar la seva estructura exacta (Fig. 24).

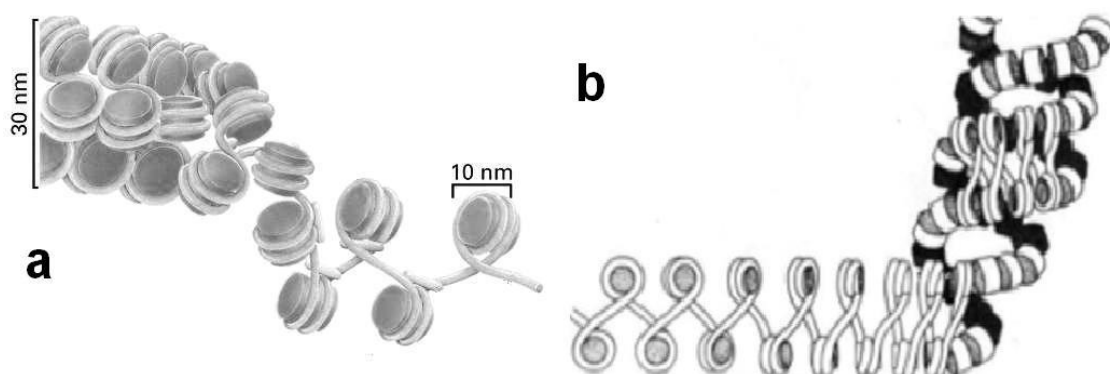


Fig 23. Models de la fibra de 30 nm:a) Model del solenoide,b) Model del doble helicoidal.

INTRODUCCIÓ

Amb compactacions més elevades es passa de la eucromatina a la heterocromatina. La fibra de 30 nm s'organitza en llaçades de entre 250 a 300 nm les quals sembla que es repleguen en nanses d'ordre superior de uns 700 nm, per reorganitzar-se en els cromosomes metafàsics de uns 1400 nm de longitud mitjana. Està descrit un esquelet proteic (Paulson i Laemmli, 1977) per microscòpia electrònica, que seria ric en topoisomerasa II (Earnshaw i Laemmli, 1983) i en condensines (Saitoh *et al*, 1994). Els cromosomes metafàsics són entre 5 i 10 cops més compactes que els interfàsics, aquesta compactació es podria explicar parcialment com una cooperació entre les activitats de la topoisomerasa II i les condensines (Baxter i Aragon, 2011).



Figura 24. Micrografia electrònica de la fibra de 30 nm a moderada força iònica per mantenir la seva estructura (Olins i Olins, A. L, 2003).

5.5. La cromatina de *Saccharomyces cerevisiae*

En els treballs realitzats en aquesta tesi s'ha fet servir el llevat, *Saccharomyces cerevisiae*, un fong ascomicet amb cicle haploide, el cariotip del qual no es pot analitzar amb les tècniques de citogenètica habituals, però els seus 16 cromosomes es poden visualitzar amb electroforesis en camp polsant. El nucli de *S.cerevisiae* sembla tenir una estructura tridimensional ordenada i els seus cromosomes ocupen llocs fixes a l'espai (Duan *et al*, 2010). La cromatina de llevat presenta certes particularitats distintives, la mida dels seus cromosomes va de les 245 kbs del cromosoma I fins a les 1800 kbs en el cromosoma IV. Els centròmers, ben caracteritzats, són de mida i estructura molt més simple que en altres eucariotes, els telòmers són també ben coneguts. Altres regions clau són els orígens de replicació, ARS. Tant els ARS

com els CEN sembla que estan units a la bastida nuclear. Els elements CEN, ARS i TEL son quantitativament, una part molt petita del genoma del llevat, en el qual hi ha molt poca heterocromatina.

En condicions de creixement, aproximadament el 40% de la cromatina del *S.cerevisiae* resulta transcrita i la major part dels gens de llevat, uns 6600, son de còpia simple i sense introns. Solament hi ha un 5% de seqüències repetides que son les codificants dels gens dels ARNt, ARNr i els elements Ty. En moltes soques hi ha un plasmidi natural, el 2 micres, que està cromatinitzat. Els gens de l'ARNr estan en un operó que forma un transcrit únic, l'ARN 35S, repetit uns 200 cops en el cromosoma XII.

Un altre particularitat de la cromatina de *S.cerevisiae* és que la histona H1 no es va identificar fins la dècada dels 90 (Landsman,1996). La cèl·lula és viable sense aquesta proteïna (Ushinsky *et al*, 1997) encara que el nucli és menys compacte. Sembla que, s'uneix a l'ADN linker per facilitar la organització en fibres d'ordre superior. S'ha descrit que reprimeix la recombinació en el ADNr (Li *et al*, 2008).

Els nucleosomes de llevat tenen unes 160-165 pb, estan en el rang inferior dels eucariotes, en el genoma de llevat n'hi ha uns 57000, que estan estrictament posicionats en els centròmers i poc en els telòmers, el seu *core* és de 146 pb i les histones son les abans descrites H2A, H2B, H3 i H4.

En el llevat l'ADN espaiador o *linker*, acostuma a estar entre els 10 i 50 pb (Van Holde, 1989). Les interaccions ADN-histona son similars a la resta de eucariotes. Les histones del llevat estan codificades per dos gens cada una, les histones H3 i H4 tenen dos gens idèntics, amb algunes diferències silents que no es veuen a la seqüència aminoacídica. A les histones H2A i H2B hi ha dos formes per cada una, les dues H2A i H2B son intercanviables, la variant H2AZ està als nucleosomes +1 o -1 (Albert *et al*, 2007).

Les histones de llevat estan entre les més acetilades en eucariotes, això faria de la cromatina de llevat, una de les que més fàcilment poden desestabilitzar els seus nucleosomes (Davie *et al*, 1981; Nelson, 1982). Sembla que les seqüències més actives tenen menys acetilació a les histones H3 i H4 que las seqüències inactives. Al revés, les formes acetilades a les histones H2B són més abundants a les regions de la cromatina més actives (Perez-Ortín *et al*, 1989).

INTRODUCCIÓ

La cromatina de llevat ha estat molt estudiada amb nucleasa micrococcal i ADNasa I i s'ha vist que hi ha una major sensibilitat a els fragments més actius transcripcionalment (Revees, 1984). Com s'ha dit anteriorment, en el llevat es coneix prou bé la ubicació dels nucleosomes i les seves modificacions (Kurdistani *et al*, 2004; Pokholok *et al*, 2005) així com els llocs de moltes proteïnes d'unió (Raisner *et al*, 2005; Schäfer *et al*, 2008).

5.6. Topologia de la cromatina

L'ADN de la cromatina eucariòtica és majoritàriament lineal amb l'excepció d'alguns virus i plasmidis, per tant no existeix l'*Lk* com a invariable topològic de les molècules CCC. No obstant això, es pot parlar de topologia de la cromatina, ja que l'ADN que la conforma no pot aconseguir la seva relaxació per difusió rotacional de l'estrès torsional a causa de les seves grans dimensions i dels impediments a la rotació que comporta l'organització nucleosomal, a més dels possibles dominis topològics que es puguin formar per unió a les estructures nuclears de qualsevol tipus, que confinen i conserven la tensió helicoïdal. Això fa que l'*Lk* al llarg del genoma pugui anar variant amb la transcripció, la replicació o altres processos genòmics i no sigui un paràmetre fix que recupera ràpidament el seu estat d'equilibri després de qualsevol perturbació.

Anàlisis genòmics fets *in vivo* amb *fotobinding* de psoralens en cromatina de llevat, indiquen una organització de la tensió helicoïdal en dominis separats al llarg dels cromosomes i mostren diferències en els nivells mitjans de superhelicitat entre regions cromosòmiques de fins 50 kb de longitud o més, amb implicacions a l'expressió gènica (Bermudez *et al*, 2010). Les dificultats a la rotació axial de l'ADN dins del nucli cel·lular decreixen a la perifèria cromosòmica, permetent dissipar la tensió helicoïdal a la proximitat dels telòmers, però no a les regions centrals (Joshi *et al*, 2010; Kegel *et al*, 2011). L'*Lk* de les diferents unitats funcionals i estructurals deu estar estretament relacionat amb la funció de la seqüència, per exemple, l'estrès torsional és determinant per a l'iniciació de la replicació de l'ADN (Pruss, Manes i Drlica, 1989; Alexandrov *et al*. 1999).

A les eubacteries es requereix l'energia lliure de la tensió helicoïdal (-) per iniciar la replicació, modular l'expressió gènica i conformar l'arquitectura del nucleòide (Hatfield i Benham, 2002; Travers i

Muskhelishvili, 2005) i això ho facilita la girasa, però en eucariotes no es coneix cap enzim homòleg (Corbett, Shultzaberger i Berger, 2004; Chen *et al*, 2013). La girasa bacteriana manté el nivell de tensió helicoïdal òptim, de la qual aproximadament una meitat del ΔLk està estabilitzat per proteïnes i l'altre meitat en forma lliure (Sinden Carlson i Pettijohn, 1980), el descens de l' Lk aportat continuament per la girasa deu de fer innecessària una estabilització més extensa.

En els eucariotes, el superenrotllament negatiu està estabilitzat en els nucleosomes (Prunell, 1998), amb una σ global similar a la procariota, propera a - 0,05, però en aquest cas no hi ha casi bé tensió helicoïdal relaxable (Sinden i Ussery, 1992). La falta d'una girasa eucariòtica podria explicar que la cèl·lula amagatzemes tot el dèficit d' Lk estabilitzat com a *writhe* entorn de les histones. A les cèl·lules eucariotes, podem valorar el potencial generador de tensió helicoïdal a partir de la velocitat d'elongació de l'ARN polimerasa II al avançar per l'ADN, el qual és aproximadament de 70 pb/segon *in vivo*, és dir, més de 6'5 voltes cada segon, ocasionant un sobreenrotllament al davant de complex de transcripció i subenrotllament al seu darrera. Si no es dissipa tota la tensió generada al davant de la bombolla de transcripció, es pot acumular estres torsional (+) fins al punt d'aturar la transcripció (Gartemberg i Wang, 1992; Jhosi, 2010). Darrera de l'ARN polimerasa II queda un ADN desenrotllat que pot promoure, la formació de *R-Loops* i l'avortament del transcrit naixent, tant en procariotes (Drolet, 2006) com en eucariotes (Huertas i Aguilera, 2003). De forma similar al que passa amb la transcripció, a la replicació també apareix sobreenrotllament al davant de la forquilla de replicació, que ha de ser relaxada.

La transcripció com primera força productora de tensió superhelicoïdal a dins del nucli eucariota s'ha descrit en el model del *Twin-supercoiled domain* (Liu i Wang, 1987; Giaever i Wang, 1988) (Fig. 25). Aquest model proposa que l'avanç de la maquinària de transcripció a través de l'ADN provoca que la tensió superhelicoïdal (-) i (+) es generen a la mateixa velocitat al darrera i davant de la complex de transcripció. En el cas de la replicació apareix tensió helicoïdal positiva solament al davant del replisoma (Gilbert i Allan, 2014).

Aquesta dinàmica, d'una relativa senzillesa a la cèl·lula procariota, agafa un grau més de complexitat quan l'ADN està en forma de cromatina. En aquest cas apareix una diferència important, que és

INTRODUCCIÓ

l'asimetria entre el que succeeix al davant i al darrere de la bombolla de transcripció o la forquilla de replicació.

Quan es trasllada el *Twin Supercoiled Domain model* a la cromatina en transcripció, es pot esperar que inicialment els segments espaiadors entre nucleosomes pateixin variacions en el seu *twist*, augmentant al davant i disminuint al darrera, potser fins a la desnaturalització dels *linkers*. Aquests canvis de *twist*, afectaran també la posició del pla de cada nucleosoma respecte del pla dels veïns, influint en el plegament de la fibra de 11 nm. També els nucleosomes es veuran modificats, al variar la longitud de doble hèlix enrotllada entorn a les histones. Els nucleosomes, al establitzar de partida un percentatge entorn al 5% de tensió helicoidal negativa com a *writhe*, pateixen canvis molt diferents segons el signe del ΔLk que suporten.

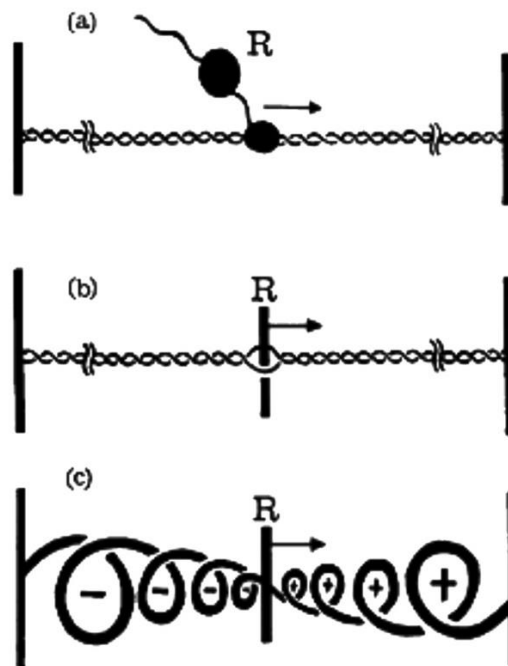


Fig. 25. *Twin Supercoiled Domain model* de la transcripció a). L'ARN polimerasa ensamblada amb l'ADN i amb l'ARN naixent que es mouen en la direcció de la fletxa al llarg del segment d'ADN; els extrems del segment estan fixats a una estructura sòlida representada per les barres. b) La maquinaria de transcripció pot ser vista com un element R, que separa la doble hèlix en dos cadenes senzilles. c) Si R es mou d'esquerra a dreta sense girar entorn l'ADN, el segment enfront de la polimerasa acumula tensió helicoidal (+) i al darrere, tensió helicoidal (-).

Els nucleosomes al darrera de la ARN polimerasa patiran un augment de tensió helicoïdal (-) que tendirà a estabilitzar-se amb una major longitud de la doble hèlix enrotllada en el *core* i les aproximadament 1,7 voltes es podrien aproximar a 2 voltes complertes, canviant els angles d'entrada i sortida de la doble hèlix en el *core*. En canvi al davant de la bombolla de transcripció, la tensió helicoïdal positiva es traduiria en menys feina estabilitzadora per cada nucleosoma, és a dir, que augmentaria la tendència de la doble hèlix a separar-se del *core* de forma que les 1,6 voltes del nucleosoma fisiològic s'anirien reduint a mida que l' ΔLk augmentés fins a reduir-se o desaparèixer l'angle de creuament entre els segments d'entrada i sortida d'ADN dels nucleosomes i en el límit, tot i ser un nucleosoma levogir, els segments d'ADN d'entrada i sortida podrien acabar fent un creuament positiu. A partir d'estudis biofísics fets amb pinces òptiques, s'ha especulat que la tensió helicoïdal podria facilitar transicions nucleosoma reversoma generant un front de reversomes al davant de la ARN polimerasa (Bancaud *et al*, 2007). A la replicació, els canvis haurien de ser similars a la transcripció, però darrera del replisoma l'assemblatge o remodelació de la cromatina també hauria d'incloure canvis a la tensió helicoïdal a causa que els nucleosomes estabilitzen la tensió helicoïdal (-) generada a l'ADN, al organitzar-se les histones per formar els nous nucleosomes sobre ADN relaxat, es produiria doncs tensió helicoïdal (+) que caldria relaxar.

En condicions fisiològiques normals, l'acció pertorbadora de la transcripció i la replicació sobre la cromatina hauria de ser limitada i transitòria, però quan es veu compromesa la capacitat per solventar aquestes perturbacions, es dir, quan tenim un dèficit de l'activitat relaxadora normal, haurien d'aparèixer cúmuls de tensió helicoïdal de signe oposat a ambdues bandes de la maquinaria de transcripció.

Tot i el millor coneixement del mecanisme de relaxació de l'ADN per les topoisomerases I i II, la seva contribució a la topologia de l'ADN *in vivo* segueix sent poc clara. El model generalment acceptat de repartiment de les tasques entre les topoisomerases I i II, és que la topoisomerasa I actuaria com a relaxasa de la tensió helicoïdal generada durant la transcripció i altres processos que puguin donar-se a l'ADN i la topoisomerasa II estaria implicada a la separació dels dúplex d'ADN acabats de replicar i en la preparació dels cromosomes per la seva segregació (Holm *et al*, 1985; Uemura *et al*, 1987; Adachi *et al* 1991), però nombroses observacions van en contra d'aquesta divisió tant simplificada, indicant que la topoisomerasa II participaria també en les funcions de relaxació de l'ADN *in vivo*.

INTRODUCCIÓ

Diverses observacions apunten que la topoisomerasa II podria actuar també com a relaxasa, està descrit que la topoisomerasa I es prescindible per la viabilitat de *Saccharomyces cerevisiae* (Saavedra i Huberman, 1986; Brill i Stemglanz, 1988; Giaever i Wang, 1988) i de *Schizosaccharomyces pombe* (Uemura i Yanagida, 1984), així doncs en aquestes cèl·lules, la topoisomerasa II deu de relaxar els superenrotllaments de l'ADN en absència de la topoisomerasa I. La pèrdua de la topo I, sols causa alguna alteració de la expressió gènica a llevat (Brill *et al*, 1987; Lotito *et al*, 2008). Per altra banda la, topo II és essencial per la segregació cromosòmica però no impedeix la síntesi de ARN en el llevat (Bermejo *et al*, 2009; Durand-Dubief *et al*, 2010). La inactivació de qualsevol de les dues topoisomerases no afecta de forma important la transcripció, solament quan falten les dues topoisomerases, el llevat redueix la síntesi d'ARNr (Brill *et al*, 1987; Schultz *et al*, 1992; Sperling *et al*, 2011; Pedersen *et al*, 2012) i en menor extensió, la síntesi de ARNm (Cavalli *et al*, 1996; Collins *et al*, 2001).

En el mateix sentit, de mostrar que el rol de la topoisomerasa II és més versàtil que el que es creia, s'ha vist que la replicació de l'ADN en el llevat pot continuar a velocitat normal mentre hagi una de les dues topoisomerases actives (Kim i Wang, 1989; Bermejo *et al*, 2007). La relaxació de la tensió superhelicoidal és necessària per la progressió de la replicació i la transcripció (Wang, 2002). Tot i això, no està clar en quina proporció contribueix cada enzim a eliminar la tensió superhelicoidal en condicions normals.

En concordança amb les observacions anteriors, els llevats doble mutants, Δ top1 top 2-ts mostren hiper-recombinació mitòtica però els mutants simples no (Christman *et al*, 1988), escissió incrementada d'ADNr en anells extracromosòmics (Kim i Wang, 1989) i multimerització de minicromosomes circulars (Trigueros i Roca, 2001).

La major part de treballs fets amb les topoisomerases I i II indiquen que cada un dels enzims pot relaxar la tensió helicoidal de l'ADN intracel·lular, però alguns estudis diuen que no son sempre intercanviables, la topoisomerasa II és més important que la topoisomerasa I en el llevat per relaxar la tensió superhelicoidal (+) que atura la transcripció dels gens llargs (Joshi *et al*, 2012). També la topoisomerasa II es localitza preferentment propera als gens llargs i es requerida per l'expressió d'aquests gens en cèl·lules de mamífer (King *et al*, 2013; Thakurela *et al*, 2013).

Objectius

Els objectius de la tesi estan centrats en dos àmbits de funcionament de la topoisomerasa II**Preferències de la topoisomerasa II per canviar la topologia de molècules nues d'ADN:**

- 1- Estudiar les distribucions de número de enllaç de l'ADN produïdes per la topoisomerasa II i la seva comparació amb les distribucions en equilibri termodinàmic, es a dir, las que s'obtenen per relaxació de molècules nues d'ADN circular.
2. Estudiar les interaccions de la topoisomerasa II amb els segment G i T d'ADN en les reaccions on l'enzim simplifica les distribucions termodinàmiques de numero de enllaç de l'ADN.
3. Construir models mecanístics que expliquin com la topoisomerasa II aconsegueix simplificar les distribucions termodinàmiques de topoisòmers d'ADN i el paper de l'ATP en el procés.

Preferències de la topoisomerasa II per canviar la topologia de l'ADN en fibres de cromatina:

4. Produir *in vivo* un cúmul de tensió helicoïdal positiva en minicromosomes circulars de llevat, determinar el grau de superhelicitat generada i el seu efecte a l'estructura de la cromatina.
5. Comparar la eficiència de la topoisomerasa I i la topoisomerasa II en relaxar la tensió helicoïdal positiva en minicromosomes circulars.
6. Produir *in vivo* un cúmul de tensió helicoïdal negativa en minicromosomes circulars de llevat, determinar el grau de superhelicitat generada i el seu efecte en l'estructura de la cromatina.
7. Comparar la eficiència de la topoisomerasa I i la topoisomerasa II en relaxar la tensió helicoïdal negativa en minicromosomes circulars.
8. Determinar la contribució relativa de la topoisomerasa I i la topoisomerasa II intracel·lular per relaxar la tensió helicoïdal positiva i negativa que es genera durant la transcripció de l'ADN.

OBJECTIUS

Publicacions

INFORME DEL DIRECTOR SOBRE ELS TREBALLS PUBLICATS

Els articles inclosos en la tesi doctoral d'en **Xavier Fernández Georges** són quatre i tots han estat publicats en revistes internacionals ISI (International Scientific Indexing) de reconegut prestigi.

Cal esmentar que tots els experiments descrits en aquests quatre treballs han estat realitzats íntegrament en el nostre laboratori de l'IBMB. En Xavier Fernández signa com quart autor en un article, com segon autor en dos articles, i com primer autor en el darrer article.

Els articles són, per ordre d'aparició a la Tesi:

Sonia Trigueros, Javier Salceda, Ignacio Bermúdez, **Xavier Fernández**, and Joaquim Roca. *Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology*. **J. Mol. Biol.** 335, 723-731 (2004)

Factor d'impacte: 5.54

En aquest article es descobreix i s'estudia perquè la topoisomerasa II simplifica de una manera asimètrica la distribució d'equilibri del número d'enllaç de l'ADN. Es conclou que l'enzim podria interaccionar amb 3 segments d'ADN. Aquesta triple interacció explicaria també com la topoisomerasa II simplifica la distribució tèrmica de número d'enllaç. En aquest treball, la contribució d'en Xavier va ser essencial en la purificació de topoisomerases, la preparació de plasmidis de diferent mida i l'anàlisi de la topologia mitjançant electroforesis. També va contribuir a la discussió dels resultats.

Publicacions

Martinez-Garcia B; **Fernández X**; Diaz-Ingelmo O; Rodríguez-Campos A; Manichanh C, and Roca J. *Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage. Nucleic Acids Res.* Feb 1;42(3):1821-30 (2014)

Factor d'impacte: 9.11

En aquest article es descobreix i s'estudia perquè la simplificació de la distribució tèrmica del número d'enllaç no es determinat en el moment de la captura de l'ADN, per contra és determinat una vegada l'ADN a sigut transportat. Es dissenyen i realitzen una sèrie d'experiments per determinar si la porta de sortida de l'ADN juga un paper essencial a la simplificació. Els resultats experimentals validen l'hipòtesi de partida. Aquesta nova capacitat de l'enzim explicaria perquè la topoisomerasa II no enreda l'ADN aleatòriament dins del reduït volum nuclear. En aquest treball, en Xavier va contribuir en el disseny d'experiments i discussió dels resultats. La seva experiència va ser essencial en la construcció i purificació de variants de topoisomerases, a la preparació i purificació de topoisòmers i a l'anàlisi de la topologia mitjançant electroforesis.

Javier Salceda, **Xavier Fernández**, and Joaquim Roca. *Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. EMBO Journal* 25, 2575-2583 (2006)

Factor d'impacte: 10.08

Aquest article constitueix el primer estudi sobre l'activitat de les topoisomerases sobre cromatina, es a dir, sobre el substrat natural d'aquests enzims. Els resultats del treball han tingut una gran repercussió, ja que han canviat la idea generalitzada que la topoisomerasa I era la principal relaxadora de l'ADN *in vivo*. En aquest estudi, en Xavier va treballar junt amb en Javier (primer autor) en l'obtenció de minicromosomes circulars de llevat amb l'ADN sota tensió helicoidal positiva. Ambdós van estudiar com aquests minicromosomes eren relaxats mitjançant l'activitat de topoisomerases I i II. En Xavier va contribuir activament en el disseny d'experiments i a l'anàlisi i discussió dels resultats

Xavier Fernández, Ofelia Díaz-Ingelmo, Belén Martínez-García, and Joaquim Roca. *Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils*. **The EMBO Journal** 33: 1492–1501(2014)

Factor d'impacte: 10.43

El treball descrit en aquest article és la continuació i completa el projecte iniciat amb l'article anterior (EMBO J. 2006). En aquest cas, en Xavier va realitzar experiments anàlegs però amb minicromosomes circulars de llevat amb l'ADN sota tensió helicoidal negativa. Els resultats del treball han descobert que la velocitat de relaxació in vivo de superhelicitat positiva de l'ADN es superior que per la superhelicitat negativa. Aquest desequilibri explicaria perquè la superhelicitat negativa de l'ADN persisteix en regions específiques dels cromosomes a pesar de que les cèl·lules eucariotes no tenen una activitat girasa. En Xavier va ser el responsable del disseny d'experiments i de la seva realització, amb l'ajut d'altres membres del laboratori. En Xavier va participar activament a l'anàlisi i discussió dels resultats, sent per tant el primer autor del treball.

Signat: Joaquim Roca Bosch

Director de la Tesi

Resum breu del primer article

L'eliminació asimètrica del superenrotllament positiu i negatiu suggereix com la topoisomerasa II simplifica la topologia de l'ADN

Les topoisomerases de tipus II consumeixen ATP per transportar un dúplex d'ADN (segment T) a través d'un tall transitori en un altre dúplex (segment G) i catalitzar així la interconversió de topoisòmers d'ADN, però no queda clar com aquesta activitat pot arribar a simplificar la topologia de l'ADN per sota dels seus valors d'equilibri termodinàmic.

En aquest article s'exposa que la topoisomerasa II eucariòtica simplifica la distribució tèrmica de número d'enllaç de l'ADN relaxat eliminant de forma preferent els creuaments d'ADN negatius. Es demostra que aquesta eliminació asimètrica dels creuaments negatius no és causada per una deformació del segments de l'ADN implicats en els processos de tall i transport. En lloc de doblegar o alterar la conformació helicoidal del segment G i/o segment T, sembla que la topoisomerasa interacciona amb un tercer segment d'ADN.

La interacció simultània amb tres segments d'ADN implica una quiralitat en el complex topoisomerasa-ADN que pot explicar l'eliminació preferent de creuaments negatius en l'ADN relaxat. Aquesta triple interacció també pot explicar com la topoisomerasa II simplifica la distribució tèrmica de número d'enllaç.

Primer article

Asymmetric Removal of Supercoils Suggests how Topoisomerase II Simplifies DNA Topology

Sonia Trigueros, Javier Salceda, Ignacio Bermúdez, Xavier Fernández and Joaquim Roca*

Instituto de Biología Molecular de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona 08034, Spain

Type-IIA topoisomerases consume ATP as they catalyse the interconversion of DNA topoisomers by transporting one DNA segment through a transient break in another. It remains unclear how their activity simplifies the topology of DNA below equilibrium values. Here we report that eukaryotic topoisomerase II narrows the thermal distribution of DNA supercoils, by mainly removing negative DNA crossings. Surprisingly, this asymmetry in supercoil removal is not due to deformation of the DNA before strand passage. Topoisomerase II neither bends nor alters the helical conformation of the interacting DNA. Rather, it appears to interact with a third DNA segment, in addition to the gated and the transported segments. Remarkably, the simultaneous interaction with three DNA segments accounts for the asymmetric removal of supercoils in relaxed DNA and gives a clue to how topoisomerase II simplifies the topology of DNA against the thermal drive.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: DNA binding; DNA bend; DNA topology; supercoiled DNA; topoisomerase

*Corresponding author

Introduction

Type-IIA topoisomerases catalyse the passage of one DNA double helix through another by a two-gate mechanism.¹ These enzymes are shaped like an open clamp, inside which a DNA double helix, termed the G-segment, is located (Figure 1). Upon binding of ATP, the clamp closes and captures a second DNA double helix, termed the T-segment.² The T-segment passes through a transient double-strand break in the G-segment and is then expelled from the topoisomerase through the hinge of the closed clamp.^{3–5} This activity permits catenation or decatenation, knotting or unknotting, as well as relaxing or supercoiling of DNA molecules. These functions are essential for the cell during DNA replication and chromosome segregation.⁶

Members of the type-IIA family include bacterial DNA gyrase, bacterial topoisomerase IV (topo IV) and eukaryotic topoisomerase II (topo II), all of which have similar structures.^{7,8} However, not all these enzymes catalyse topological transformations in the same direction. DNA gyrase mainly intro-

duces (–) supercoils into DNA by enforcing the inversion of (+) crossings between G- and T-segments. Topo IV and topo II do not impose a single direction on the strand passage. Their interaction with a potential T-segment (pT-s) relies on collision probability. Accordingly, these enzymes were expected to generate equilibrium distributions of catenanes, knots and supercoils. In recent years, however, it has been shown that the strand passage activities of topo IV and topo II do not vindicate this assumption. In 1997, Rybenkov *et al.* discovered that topo IV and topo II reduce the fractions of knotted and catenated DNA molecules to a steady-state level that is much lower than the corresponding values at thermodynamic equilibrium.⁹ Both enzymes were also found to render the linking number (*Lk*) distributions of DNA narrower than at thermal equilibrium.⁹ Thermodynamically, there is no conflict in these findings because these enzymes utilise the energy of ATP hydrolysis. The question is how these topoisomerases, which apparently act locally, can determine the state of catenation, knotting and supercoiling of a very much larger DNA molecule.

This study examines the activity of topo II in simplifying equilibrium distributions of *Lk* in DNA circles. It is found that the narrowing of *Lk*

E-mail address of the corresponding author: jrbmc@cid.csic.es

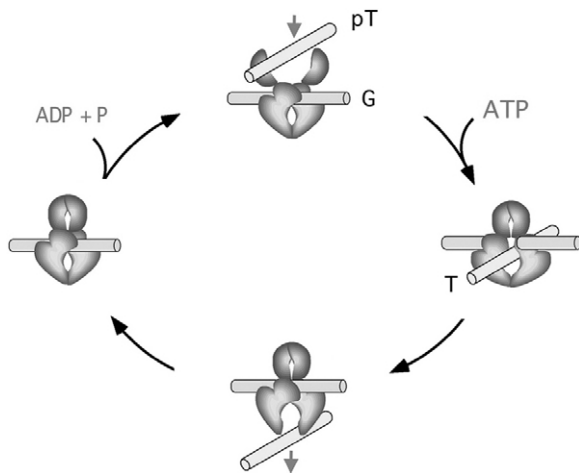


Figure 1. The mechanism of type-IIA topoisomerases. A DNA double helix, termed the G-segment (G), binds at the DNA cleavage-rejoining site in the open conformation of the topoisomerase. A potential T-segment (pT), located in the same or another DNA double helix molecule, may possibly interact near the entrance gate of the topoisomerase. Upon binding of ATP, or a non-hydrolysable ATP analogue, the enzyme closes and captures the pT (afterward termed the T-segment). The T-segment (T) passes through a transient double-strand break in the G-segment, whose severed ends are held by covalent links in each half of the topoisomerase. Once the T-segment has crossed the G-segment, it is expelled from the topoisomerase through the side opposite where it entered. ATP hydrolysis allows the enzyme to recover its open conformation.

distributions is not symmetrical. When topo II reduces the thermal dispersions of Lk , it mainly removes (–) supercoils. The simplest explanation for this preference is a deformation of the G-segment. Surprisingly, topo II does not alter the twist or the writhe of the interacting G-segment. Rather, topo II appears to interact with a third DNA segment, in addition to the G- and the T-segments. Remarkably, a triple DNA interaction accounts for the preferential removal of (–) supercoils from thermal dispersions of Lk and hints at the mechanism by which DNA topology is simplified.

Results

Topoisomerase II simplifies and shifts equilibrium distributions of Lk in DNA circles

The Lk distributions generated by topoisomerase II in a covalently closed DNA circle were compared to the distributions of thermal equilibrium generated by a type-IB topoisomerase (Figure 2(A)). A 5.9 kb supercoiled plasmid (lane 1) was relaxed with catalytic amounts of the topoisomerase I of the vaccinia virus (topo I) (lane 2). The distribution of topoisomers had an Lk variance ($\langle \Delta Lk^2 \rangle^0$) of 2.7, which is consistent with the figure calculated for thermal equilibrium in these ionic conditions.^{10,11} In the same conditions, the plasmid was incubated with catalytic amounts of topo II of

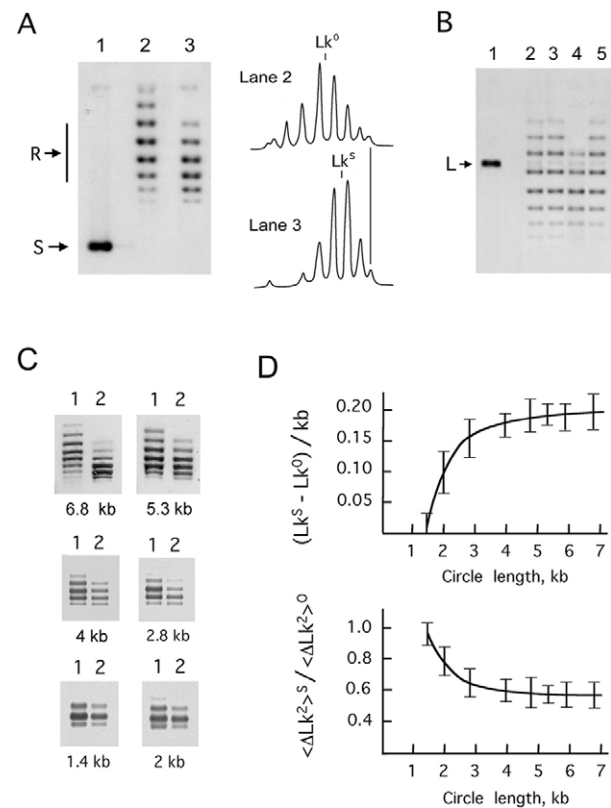


Figure 2. Linking number distributions generated by topoisomerase II in DNA circles under thermal equilibrium. (A) Reaction mixtures each containing about 50 fmol of a 5.9 kb supercoiled plasmid in 50 μ l of assay buffer A were complemented with ATP to a final concentration of 1 mM and treated with catalytic amounts of topo I or topo II. After 15 minutes incubation at 30 $^{\circ}$ C, samples were analysed by gel electrophoresis (16 hours at 50 V in a 0.8% agarose slab in TBE buffer containing 0.1 μ g/ml chloroquine). Lane 1, no topoisomerase added. Lane 2, with 10 fmol of topo I. Lane 3, with 10 fmol of topo II. The positions of supercoiled (S) and relaxed (R) DNA circles are indicated. Scans of lanes 2 and 3 of the gel-blot probed with 32 P-labelled DNA are shown. (B) A 4.8 kb plasmid was linearised with the restriction endonuclease *Eco*RI and purified (lane 1). Reaction mixtures of 50 μ l of buffer A containing 50 fmol of the purified linear DNA, 1 mM ATP and T4 DNA ligase were incubated for 60 minutes at 25 $^{\circ}$ C (lane 2). Either 10 fmol of topo I or 10 fmol of topo II was then added to the above mixtures and the incubation followed for ten minutes at 25 $^{\circ}$ C (lanes 3 and 4, respectively). 10 fmol of topo I was added to a reaction containing topo II (as lane 4) and the incubation followed for an additional ten minutes at 25 $^{\circ}$ C (lane 5). Reaction products were analysed by gel electrophoresis (ten hours at 50 V in a 1% agarose slab in TBE buffer containing 0.1 μ g/ml chloroquine). The position of linear (L) DNA is indicated. (C) Lk distributions generated in DNA circles of different length after incubation with topo I (lanes 1) and topo II (lanes 2). Reactions were set and analysed as described in the legend to (A). (D) Summary plots of $\langle \Delta Lk^2 \rangle^S / \langle \Delta Lk^2 \rangle^0$ and $(Lk^S - Lk^0) / kb$ values relative to DNA circle length. Error bars are standard deviations of three experiments.

Saccharomyces cerevisiae (lane 3). The variance of this Lk dispersion ($\langle \Delta Lk^2 \rangle^S$) was 1.6, a 1.7-fold reduction of its equilibrium value 2.7. The centre of this Lk dispersion (Lk^S) shifted by +1.3 units from the centre of the distribution generated by topo I (Lk^0). These effects of topo II were corroborated by using the cyclisation of a linear DNA molecule as the reference value for the thermal dispersion of Lk (Figure 2(B)). A linearised plasmid (lane 1) was cyclised with T4 DNA ligase in the absence (lane 2) or presence of a catalytic amount of topo I (lane 3) or topo II (lane 4). The Lk distributions obtained in lanes 2 and 3 were similar, whereas the distribution generated by topo II in lane 4 was narrowed and shifted. When topo I was added to a reaction started as in lane 4, the effects of topo II were neutralised (lane 5).

The $(\langle \Delta Lk^2 \rangle^S / \langle \Delta Lk^2 \rangle^0)$ and the $(Lk^S - Lk^0)$ values were measured for a collection of DNA circles of different size (Figure 2(C)). Plots of these values show that the capacity of topo II to narrow and shift thermal dispersions depends on the length of DNA (Figure 2(D)). Whereas for circles over 3 kb the $(\langle \Delta Lk^2 \rangle^S / \langle \Delta Lk^2 \rangle^0)$ and the $(Lk^S - Lk^0)$ values were proportional to DNA length, for the smaller circles (1.4 kb and 2 kb) the capacity of topo II to narrow and shift thermal dispersions was reduced.

Effect of topoisomerase II binding on the helical parameters of the interacting DNA

To examine whether topo II alters the twist or the writhe of the G-segment, the Lk^0 of circular DNA molecules with and without an excess of bound-topo II were compared (Figure 3(A)). To calibrate the amount of topo II to be utilised, a supercoiled DNA circle 3 kb in length (lane 1) was mixed with six molar ratios of topo II (lane 2). A non-hydrolysable ATP analogue (AMPPNP) was then added to allow every topo II enzyme to catalyse one DNA transport event. The Lk changes observed in lane 2 validated the amount of topo II to be used. Next, relaxed DNA circles 3 kb in length were incubated with 0 (lane 3) and 6 (lane 4) molar ratios of topo II. Catalytic amounts of topo I were added to generate equilibrium distributions of Lk . The Lk distributions generated by topo I were similar, regardless of the excess of topo II bound to DNA (compare lanes 3 and 4). The presence of AMPPNP (lane 5), which changes topo II from an open to a closed conformation around DNA (2), did not alter either of the Lk distributions generated by topo I (compare lanes 3 and 5).

The negligible effect of topo II binding on the value of Lk^0 was corroborated in a separate assay (Figure 3(B)). A DNA circle 4.6 kb in length (lane 1) was nicked (lane 2) and then mixed with 0 (lane 3) or 6 (lane 4) molar ratios of *Escherichia coli* DNA gyrase (positive control for DNA deformation), or 6 and 12 molar ratios of topo II (lanes 5 and 6). *E. coli* DNA ligase plus NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) was then added to seal the nicks and so generate equilibrium distributions of

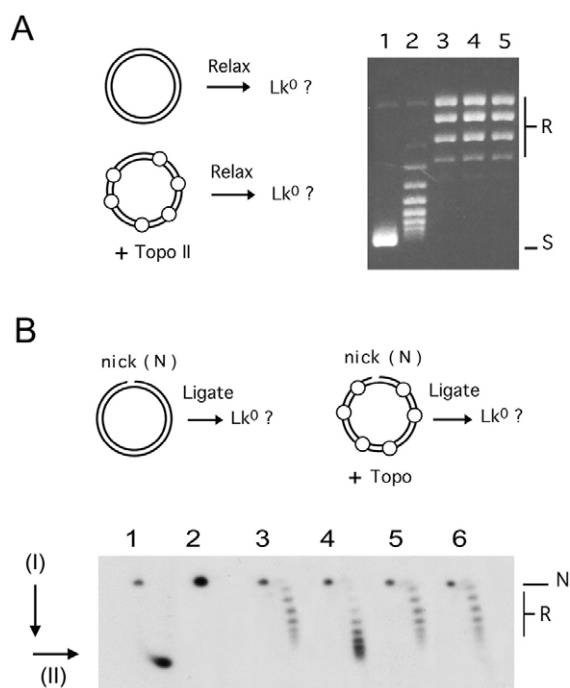


Figure 3. Equilibrium Lk values in circular DNA molecules containing a molar excess of topo II bound. (A) Lk distributions generated by topo I in a 3 kb DNA circle containing 0 or 6 topo II molecules bound. Lane 1, supercoiled circle. Lane 2, 0.4 pmol of supercoiled circle were mixed with 2.4 pmol of topo II in 50 μ l of assay buffer A. Then, AMPPNP (2 mM final concentration) was added and the mixture was incubated for ten minutes at 30 $^{\circ}$ C. Lane 3, 0.4 pmol of relaxed circle were mixed in 50 μ l of assay buffer A. Then, 20 fmol of topo I was added and the mixture was incubated for 20 minutes at 30 $^{\circ}$ C. Lane 4, the same as lane 3, but 2.4 pmol of topo II was added to the relaxed circle. Lane 5, as lane 4, but AMPPNP (2 mM final concentration) had been added after topo II. Samples were analysed by gel electrophoresis as described for Figure 2(A) and DNA stained with ethidium. The positions of supercoiled (S) and relaxed (R) DNA circles are indicated. (B) Lk distributions generated by ligation of a nicked 4.6 kb DNA circle containing a molar excess of topoisomerase bound. Lane 1, 50 fmol of supercoiled circle. Lane 2, 50 fmol of nicked circle. Lane 3, 50 fmol of the nicked circle was incubated in 50 μ l of assay buffer A. Then, *E. coli* DNA ligase supplemented with 50 μ M NADH was added and the mixture incubated for 40 minutes at 25 $^{\circ}$ C. Lane 4, the same as lane 3, but with 300 fmol of *E. coli* DNA gyrase added. Lane 5, the same as lane 3, but with 300 fmol of topo II added. Lane 6, the same as lane 3, but with 600 fmol of topo II added. Samples were analysed by 2-D electrophoresis in a 1% agarose gel in TBE buffer containing 0.1 μ g/ml chloroquine at 50 V for 12 hours in the first dimension (I), and TBE buffer containing 2 μ g/ml chloroquine at 70 V for four hours in the second dimension (II). The gel was blotted and probed with ³²P-labelled DNA. The positions of nicked (N) and ligated (R) DNA circles are indicated.

Lk . Nick ligation in the presence of gyrase (lane 4) generated a distribution of higher Lk values (the distribution arch turned clock-wise in the two-dimensional gel) due to the right-handed wrapping

of DNA around each bound enzyme.¹² Conversely, nick ligation in the presence of excess topo II did not affect the resulting *Lk* distributions (compare lanes 5 and 6 with lane 3).

Effect of topoisomerase II binding on the cyclisation efficiency of short DNA fragments

The effective concentration of one end of a linear polymer in the vicinity of the other end (*j*-factor) can be specified from the cyclisation efficiency of short DNA fragments.^{13,14} To examine whether topo II bends the G-segment, the *j*-factors for DNA fragments with or without bound-topo II were measured. To account for the effect of torsional orientation of the DNA ends, fragments of increasing number of base-pairs were used. To check that the DNA fragments had no more than one enzyme bound to them, the topo II–DNA molar ratios were titrated in parallel with the cyclisation reactions.

Figure 4(A) shows a representative experiment. A DNA fragment (L1) was incubated in the absence of topoisomerase, in the presence of *E. coli* DNA gyrase (positive control for DNA deformation) or in the presence of topo II. *E. coli* DNA ligase plus NADH was then added. Stopping the reactions at short time points resulted in partial ligation of the DNA, mostly shown by a mixture of monomeric circles (C1), linear dimers (L2) and other multimeric forms (C2, L3, C3). Experiments were only validated when the molar ratio of topo II bound per DNA fragment at the time of cyclisation was about 1. To determine this ratio, identical reactions were run in parallel but supplemented with AMPPNP, which promoted the formation of high-salt stable complexes of topo II around cyclised DNA fragments.² These complexes were retained in fibreglass filters¹⁵ and quantified. The average number of topo II bound to DNA was specified from the Poisson relation $-\ln x$, where x is the fraction of protein-bound DNA circles relative to total DNA circles (C1 in lanes F and B, respectively).

The *j*-factors measured for fragments of 241, 244, 247, 250 and 253 bp (Figure 4(B)) did not improve for DNA fragments interacting with topo II. In fact, the *j*-factors were slightly reduced. Curiously, the presence of topo II facilitated the formation of dimeric and trimeric circles rather than monomeric ones. The periodic variation of the *j*-factor for progressive DNA lengths was unaffected by topo II binding. These results contrasted with those obtained with DNA gyrase, which increased the *j*-factor values over one order of magnitude and changed their periodic variation.

Simultaneous interaction of topoisomerase II with three DNA segments

The increased formation of dimeric and trimeric circles observed above suggested that topo II brings two or three short DNA fragments together.

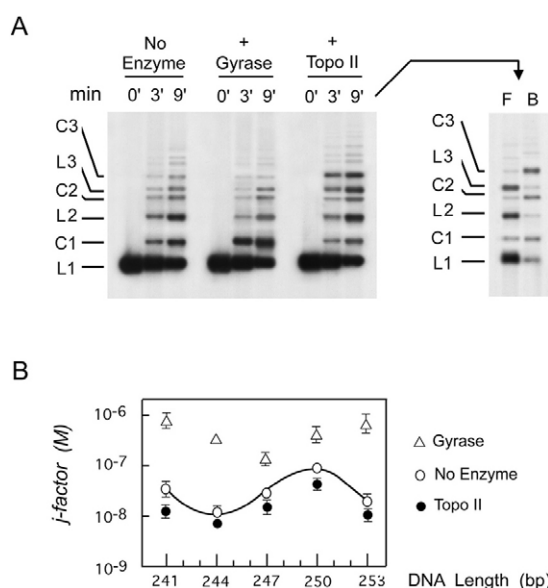


Figure 4. Effect of topo II binding on the cyclisation of short DNA fragments. (A) About 50 fmol of a 247 bp DNA fragment (L1) labelled with ³²P were incubated in the absence or presence of 50 fmol of *E. coli* DNA gyrase or 50 fmol of topo II in 60 μl of assay buffer A. The mixtures were then supplemented with *E. coli* DNA ligase plus NADH (50 μM) and incubated at 25 °C. Reactions were quenched for short times (0, 3 and 9 minutes) by addition of NaCl to 1 M plus EDTA to 20 mM. A duplicate of the last reaction was filtered through a fibreglass filter that retains protein–DNA complexes. The partially ligated DNA products, as well as the filter-eluted (lane F) and filter-retained (lane B) DNA fractions were analysed by gel electrophoresis and quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blot to a nylon membrane. L1, L2, and L3 indicate linear monomers, dimers and trimers, respectively. C1, C2 and C3 indicate circular monomers, dimers and trimers, respectively. Since 36% of the total amount of monomeric circles (C1) formed were in the protein-free fraction (compare lanes F and B), the topo II:DNA molar ratio was near 1. (B) *j*-factors for five DNA fragments of progressive length with no enzyme, with DNA gyrase, and with topo II bound to them. Error bars are standard deviations of duplicate experiments.

The plausible interaction with three DNA segments was tested in a competition assay. Topo II was added to an equimolar mixture of a supercoiled DNA plasmid (S2) and a catenane consisting of two singly linked supercoiled DNA rings (S:S). Since the catenane was generated from the supercoiled plasmid by the use of $\gamma\delta$ resolvase¹⁶ both DNA substrates had identical base-pair content and only differed in their topology. The retention of protein–DNA complexes on fibreglass filters was utilised to identify which DNA was preferentially bound to topo II.

Gels in Figure 5 show the protein-free (F) and the protein-bound (B) DNA fractions recovered from mixtures containing 0, 0.5 and 1 molar ratios of topo II relative to DNA. In the absence of topo II nearly all DNA was found in the protein-free fraction (compare lanes 1 and 2). Addition of topo II

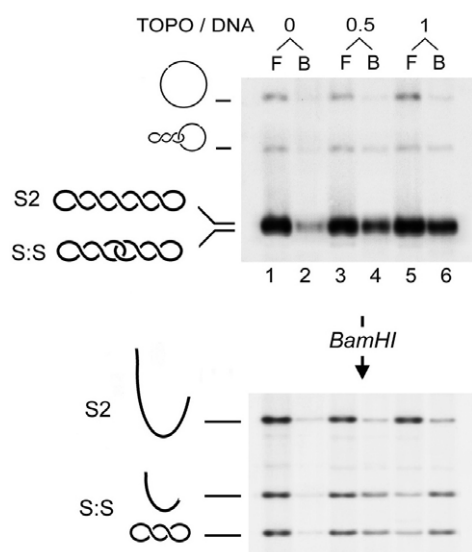


Figure 5. Preferential binding of topo II to a catenane of supercoiled DNA rings. Topo II (0, 25, 50 fmol) was added to mixtures of S2 and S:S (25 fmol each) in a 50 μ l volume of buffer A at 30 $^{\circ}$ C. The concentration of KCl was then gradually reduced from 150 mM to 50 mM. Each mixture was passed through a fibreglass filter. Filters were then washed with several portions of buffer A containing 50 mM KCl. The eluted volumes were combined to recover protein-free DNA fractions (lanes F). Next, filters were washed with several portions of buffer A containing 1 M NaCl and the eluted volumes combined to recover protein-bound DNA fractions (lanes B). DNA fractions were analysed by agarose gel electrophoresis in TBE buffer containing 50 μ g/ml ethidium (upper gel). In a parallel electrophoresis (lower gel), the same DNA fractions were analysed after being digested with *Bam*HI endonuclease. DNA products were quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blots probed with 32 P-labelled DNA. The positions of different forms of DNA are indicated.

increased the amount of DNA retained in the filter (lanes 4 and 6). Because S2 and S:S could not be distinguished by electrophoretic migration (upper gel), they were cut with *Bam*HI. This cut converted S2 into a linear molecule and S:S into a linear fragment plus a supercoiled ring (lower gel). Comparison of protein-free fractions (lanes 3 and 5) with their corresponding protein-bound fractions (lanes 4 and 6) revealed that, relative to S2, binding of topo II to S:S was favoured by a factor of 2–3. As discussed below, one feature by which topo II may distinguish between S:S and S2 is the juxtaposition probability of three DNA segments, which is higher in S:S than in S2.

Discussion

The Lk distributions generated by topoisomerase II are narrower than those at thermal equilibrium. This reduction in Lk variance ($\langle \Delta Lk^2 \rangle^S$) is comparable to that previously reported.⁹ However, the distributions narrowed by topo II have a higher mean

Lk (Lk^S) than the mean Lk at thermal equilibrium (Lk^0). Identical ($Lk^S - Lk^0$) values are observed in plasmids harbouring different base-pair sequences; and in all cases the Lk shift is neutralised by topo I activity. Therefore, this effect is unlikely to be caused by a structural feature of the DNA or by a contaminant in the reactions. The positive value for ($Lk^S - Lk^0$) indicates that topo II preferentially inverts a (–) node rather than a (+) one when a DNA circle is near Lk^0 . The simplest explanation for this asymmetry is that the DNA is deformed by topo II before the strand passage reaction. Inversion of (–) crossings in an Lk^0 circle is favoured if enzyme binding increases the helical repeat (reduces twist) or forms a left-handed arch (reduces writhe) along the G-segment. Such deformations were tested by comparison of the Lk^0 values of DNA circles with or without a molar excess of topo II bound. The results indicate that enzyme binding does not significantly deviate Lk^0 . However, these analyses do not rule out the possibility that the G-segment may be deformed either by a flat bend or by a helical bend compensated with a twist. Yet, by determining the j -factors in short DNA fragments with one topo II enzyme bound to them, significant bending or twisting of the G-segment is ruled out. A combination of twist and bend of exactly one helical turn is unlikely. The absence of bending or twisting of DNA is consistent with previous studies. Topo II has no preference for interacting with (+) or (–) supercoiled DNA.^{2,17} Hence, its interaction with the G-segment is insensitive to local twist or writhe. Single-molecule analysis of DNA also showed negligible bending of the duplex by topo II.¹⁸ The lack of deformation of DNA by topo II contrasts with that reported for topo IV, which sharply bends the G-segment.¹⁹ Topo II and topo IV could differ in their DNA binding mode.

If the G-segment is not deformed, the structural basis for the Lk^S shift must be found when potential T-segments (pT-s) interact with topo II. Features that the enzyme might exploit are the local conformation of pT-s or their juxtaposition angles relative to the G-segment. These parameters are relevant in highly supercoiled DNA molecules, but not in relaxed ones.^{20,21} For example, topo IV binds (+) and (–) supercoiled DNA with similar efficiency but relaxes the (+) supercoiled faster.²² DNA transport activity of topo IV may be sensitive to the shape of chiral crossings imposed by the left-handed superhelix of a (+) supercoiled DNA, rather than local twist or writhe.²³ However, when Lk values approach Lk^0 , both the occurrence and the average geometry of (+) and (–) crossings are similar.^{20,21} In a relaxed DNA circle, there appears to be no features to discern whether a pT-s establishes a (–) or a (+) crossing relative to the G-segment. The preferential removal of (–) crossings may be linked to the mechanism used by topo II to reduce the value of $\langle \Delta Lk^2 \rangle$ for thermal equilibrium.

The value of $\langle \Delta Lk^2 \rangle$ decreases with DNA

length.^{10,11} Therefore, if DNA were effectively shortened by topo II, $\langle\Delta Lk^2\rangle$ would be smaller than in equilibrium. The effective length of DNA would be reduced if several DNA segments were bound simultaneously by topo II. This possibility had been inferred from previous studies. The high efficiency of topo II in removing catenane links from supercoiled DNA circles suggested that topo II interacts with an additional DNA segment, as well as with the G- and T-segments.^{3,24} The effect of varying levels of (-) and (+) supercoiling on the efficiency of topo II to link and unlink DNA circles suggested that the structural basis for a triple interaction is the existence of two interaction sites for pT-s¹⁷ (Figure 6(A)). In the present study, the preferential binding of topo II to a dimeric catenane of supercoiled rings (S:S) relative to its parental supercoiled circle (S2), supports a three-segment interaction. Juxtaposition of two segments may be increased in S:S relative to S2 due to the more entropic localisation of the catenane crossing. Yet, the property that topo II might exploit better to distinguish these DNA is the juxtaposition probability of three DNA segments. A triple DNA node is readily formed in S:S by any plectonemic crossing and any segment of the other linked ring. Conversely, bringing three intra-molecular segments together in S2 requires extra writhe in DNA. Such a triple DNA interaction maximises the probability of interacting with both members of the catenane and, hence, clarifies why topo II is so efficient in decatenating supercoiled DNA rings. Yet, this conclusion has a more satisfying outcome. As discussed below, the capacity to interact with three DNA segments would not only decrease the value of $\langle\Delta Lk^2\rangle$ by shortening DNA, but it would also account for the asymmetric removal of DNA crossings in the absence of DNA deformation discovered here.

In a relaxed DNA circle, if the first potential T-segment (pT-s) interacting with a G-segment-topo II complex were always transported, the average probabilities of removing a (-) or a (+) crossing would be similar and little effect on the value of $\langle\Delta Lk^2\rangle$ could be expected. However, if the first interacting pT-s were not readily transported, the resulting complex would divide the DNA molecule into two domains. Then, if a second intra-molecular pT-s were to interact with the topoisomerase and be transported, the $\langle\Delta Lk^2\rangle$ value would decrease, since the domain providing the second pT-s would be shorter. The interaction with several DNA segments is limited, however, by the overall length of DNA. Once the topoisomerase is bound to a G-segment, the complex interacts with a pT-s at a certain optimal distance along the DNA. This distance is about 1 kb in linear DNA and is probably similar in relaxed DNA circles.²⁵ In small circles, the domains established after interaction with the first intra-molecular pT-s may become too short for more writhe to be easily accepted. Then, as the circle becomes shorter, the probability of interaction with a second intra-molecular pT-s

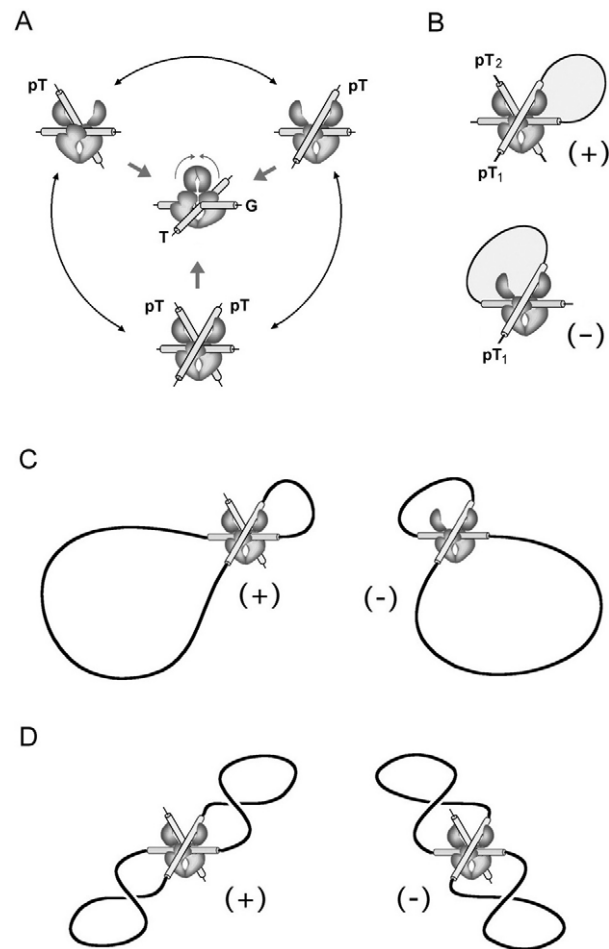


Figure 6. The orientation of topo II relative to the DNA contour in a three-segment interaction model. (A) Besides the G-segment (G), recognition of one on either side or simultaneous recognition of two potential T-segments (pT-s) is conceived from the dyadic structure of type-IIA topoisomerases. Closure of the protein clamp can lead to the capture and transport of one pT-s. (B) When the G-segment and the first interacting pT-s (pT₁) constitute an intra-molecular DNA crossing, the sign of this node determines the orientation of the topoisomerase relative to the DNA contour. This orientation favours or restrains the interaction with a second pT-s (pT₂), as its recognition site will be aligned to either outside or inside the DNA contour. For example, if interaction with a (-) crossing situates the interaction site for a second pT-s inside the DNA contour, then interaction with a (+) crossing situates the interaction site for a second pT-s outside. (C) The same complex interacting with a (+) or a (-) crossing in a relaxed circle. (D) The same complex interacting with a (+) or a (-) supercoiled circle. See the text for full comments.

would decline. This prediction matches the DNA length dependence of the topo II effects reported here. There is a limiting length (around 2 kb), below which both reduction of $\langle\Delta Lk^2\rangle$ and the $(Lk^S - Lk^0)$ difference vanish.

The other main implication of a three-segment interaction is that the sign of the crossing established by the G-segment and a first intra-molecular pT-s fixes the orientation of the topoisomerase

relative to the DNA contour.¹⁷ Then, the recognition site for a second pT-s is oriented to either inside or outside the DNA contour, depending on the sign of such a crossing (Figure 6(B)). Consequently, although in a relaxed circle the sign of the initial node can be (+) or (-) with similar probability, the overall likelihoods of inverting a (+) or a (-) node are different if a second intra-molecular pT-s can be transported. The interaction with a second intra-molecular pT-s is restricted when its recognition site is found inside a DNA contour that is too short to accept more writhe (Figure 6(C)). Yet, this restriction does not exist when the recognition site for the second pT-s is oriented to the outside. Following this scheme, inversion of more (-) than (+) nodes occurs when an initial (-) node (established by the G-segment and the first pT-s) fixes the site for a second pT-s in the inner contour of DNA (Figure 6(C), right). Since the interaction with a second intra-molecular pT-s would be restricted, it is likely that the enzyme would invert the initial (-) node. Conversely, when the initial node is (+), interaction with a second pT-s is not restricted and the probabilities of inverting a (+) or (-) are more comparable (Figure 6(C), left). Remarkably, this alignment is identical with that proposed to explain the effect of DNA supercoiling handedness on the preferences of topo II to transport an inter-molecular pT-s.¹⁷ Negative supercoiling favours decatenation because interaction with a (-) crossing fixes the interaction site for the second pT-s inside the DNA contour (Figure 6(D), right). Conversely, positive supercoiling favours catenation, because interaction with a (+) crossing fixes the interaction site for the second pT-s outside (Figure 6(D), left).

A further outstanding question is whether a three-segment interaction is part of the mechanism of topo II for reducing fractions of knotted and catenated DNA below thermodynamic equilibrium values. Three hypotheses have been put forward. Rybenkov *et al.*⁹ suggested a "corral effect" by which a topoisomerase traps a pT-s within a DNA loop by interacting with an intra-molecular DNA crossover. Movement of the enzyme along the DNA contour reduces the loop length and further facilitates the collision of the pT-s with the topoisomerase. Yan *et al.*^{26,27} suggested a "kinetic proofreading" mechanism, in which activation of the topoisomerase for the strand-passing reaction requires two consecutive collisions with pT-s. Vologodskii *et al.*¹⁹ proposed a "funnel effect" in which the topoisomerase bends the G-segment like a hairpin. Their computational analysis predicts that the probability of finding a pT-s inside such a sharp bend for knotted and catenated DNA molecules increases greatly. Yet, such deformation does not occur with topo II. In spite of this, if topo II can interact with two pT-s before transporting one of them, most aspects of all three hypotheses may well come into play. In knotted or catenated DNA circles, a loop enclosed by the G-segment and the first pT-s will produce a corral effect for a second

pT-s. Similarly, the juxtaposition angle formed between the G-segment and the first pT-s will produce a funnel effect to favour the interaction of a second pT-s. Finally, kinetic proofreading could also operate if a successive interaction of DNA in both pT-s sites has a synergistic effect on the efficiency of topo II in capturing a T-segment.

The capacity of type-IIA topoisomerases to simplify DNA topology is consistent with their physiological role. Supercoiling, knotting and catenation of DNA must be minimised to ensure proper DNA replication and chromosome segregation. Yet, it is a challenge to grasp just how these enzymes untangle DNA molecules against the thermal drive. Type-IIA topoisomerases have been compared to Maxwell's demon, which opens and closes a door in the middle of a box that contains gas.²⁸ The demon shifts the system away from equilibrium because it opens the door only for molecules moving in one direction. ATP usage and the two-gate mechanism of type-IIA topoisomerases are suited for this task. These enzymes just need a mechanism to change the topology of DNA in the proper direction. The asymmetric removal of supercoils and the three-segment interaction reported here hint at the mechanism that accounts for this last point.

Materials and Methods

Enzymes

T4 DNA ligase and *E. coli* DNA ligase were purchased from New England Biolabs Inc. Topoisomerase I of vaccinia virus was purified from *E. coli* strain harbouring the expression clone pET11vvtop1.²⁹ *E. coli* DNA gyrase was reconstituted from its subunits purified from overproducing strains containing separated *gyrA* and *gyrB* genes cloned in multicopy plasmids. DNA topoisomerase II of *S. cerevisiae* was purified from yeast strain BCY123 harbouring the expression clone YEpTOP2GAL1.³⁰

DNA substrates

Plasmid DNA were purified by density gradient centrifugation. Ethidium-free DNA fractions were obtained by phenol-extraction and ethanol-precipitation. Controlled nicking of plasmid DNA was done by incubation with an endonuclease in the presence of ethidium.³ Nicked plasmids were purified from individual bands in agarose gels. Dimeric catenanes (S:S), consisting of two identical singly linked 3.6 kb rings except for one *Bam*HI site in one of them, were generated from the 7.2 kb plasmid pKS5 by the use of $\gamma\delta$ resolvase.¹⁶

DNA topoisomerase assays

Buffer A contained 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol, and 100 μ g/ml bovine serum

albumin. In each experiment, the specified amount of enzymes and DNA were added to buffer A and supplemented with ATP (1 mM) or AMPPNP (1 mM) when indicated. Protein-mediated retention of DNA was carried out in GF/C Whatman fibreglass filters as described.^{2,15}

Analysis of Lk distributions

Thermal dispersions of Lk were analysed by agarose gel electrophoresis in TBE buffer containing 0.1 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine. In these conditions, relaxed DNA topoisomers adopt positive writhe so Lk distributions migrate away from nicked circles. The amount of every given topoisomer (p_i) in the Lk distributions was quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blots probed with ^{32}P -labelled DNA obtained by random priming. The centre of the Lk distributions generated at thermal equilibrium (Lk^0) or following topo II activity (Lk^S) was determined from the p_i values to calculate ($Lk^S - Lk^0$). The variance of the Lk distributions ($\langle \Delta Lk^2 \rangle$) was calculated as $\sum [p_i (\Delta Lk_i)^2] / \sum p_i$. Lk_i is the linking number of a given topoisomer relative to that of a reference topoisomer close to the centre of the Lk distribution.

Cyclisation frequency of DNA

DNA fragments with a common 239 bp sequence used for cyclisation assays were prepared by polymerase chain reaction and *Eco*RI digestion, purified by electrophoresis and end-labelled with ^{32}P using T4 polynucleotide kinase. DNA products of the cyclisation reactions were quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blot to a nylon membrane. The relative amounts of circular monomers (C1) and linear dimers (L2) were used to calculate j -factors as $2M_0 \lim_{t \rightarrow 0} [C1(t)/L2(t)]$, where M_0 is the initial concentration of the DNA fragment and t is the reaction time.¹³

Acknowledgements

This study was supported by grants PB98-0487 and BMC2002-03275 from the Spanish Ministry of Science and Technology.

References

- Wang, J. C. (1998). Moving one double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* **31**, 107–144.
- Roca, J. & Wang, J. C. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell*, **71**, 833–840.
- Roca, J. & Wang, J. C. (1994). DNA transport by a type II topoisomerase: evidence in favor of a two gate mechanism. *Cell*, **77**, 609–616.
- Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. & Wang, J. C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, **379**, 225–232.
- Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. H. & Wang, J. C. (1996). DNA transport by type II DNA topoisomerases: direct evidence of a two gate mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 4057–4062.
- Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev. MCB*, **3**, 430–440.
- Berger, J. M. (1998). Type II DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 26–32.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413.
- Rybenkov, V. V., Ullsperger, C., Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. (1997). Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science*, **277**, 690–693.
- Depew, R. E. & Wang, J. C. (1975). Conformational fluctuations of DNA helix. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4275–4279.
- Pulleyblank, D. E., Shure, M., Tang, D., Vinograd, J. & Vosberg, H. P. (1975). Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and nonsupercoiled closed circular DNA: formation of a Boltzmann distribution of topological isomers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 4280–4284.
- Liu, L. F. & Wang, J. C. (1978). DNA–DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell*, **15**, 979–984.
- Taylor, W. H. & Hagerman, P. J. (1990). Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure. II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat. *J. Mol. Biol.* **212**, 363–376.
- Crothers, D. M., Drak, J., Kahn, J. D. & Levene, S. D. (1992). DNA bending, flexibility, and helical repeat by cyclization kinetics. *Methods Enzymol.* **212**, 3–29.
- Roca, J. (1999). Filter binding assays for topoisomerase–DNA complexes. *DNA Topoisomerase Protocols, part II Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ pp. 75–80.
- Krasnow, M. A. & Cozzarelli, N. R. (1983). Site-specific relaxation and recombination by the Tn3 resolvase: recognition of the DNA path between oriented res sites. *Cell*, **32**, 1313–1324.
- Roca, J. (2001). Varying levels of positive and negative supercoiling differently affect the efficiency with which topoisomerase II catenates and decatenates DNA. *J. Mol. Biol.* **305**, 441–450.
- Strick, T. R., Croquette, V. & Bensimon, D. (2000). Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, **404**, 901–904.
- Vologodskii, A. V., Zhang, W., Rybenkov, V. V., Podtelezhnikov, A. A., Subramanian, D., Griffith, J. D. & Cozzarelli, N. R. (2001). Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3045–3049.
- Vologodskii, A. & Cozzarelli, N. R. (1996). Effect of supercoiling on the juxtaposition and relative orientation of DNA sites. *Biophys. J.* **70**, 2548–2556.
- Jian, H., Schlick, T. & Vologodskii, A. (1998). Internal motion of supercoiled DNA: Brownian dynamics simulations of site juxtaposition. *J. Mol. Biol.* **284**, 287–296.
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V. & Cozzarelli, N. R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase

- IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* **14**, 2881–2892.
23. Stone, M. D., Bryant, Z., Crisona, N. J., Smith, S. B., Vologodskii, A., Bustamante, C. & Cozzarelli, N. R. (2003). Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 8654–8659.
 24. Roca, J. & Wang, J. C. (1996). The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells*, **1**, 17–27.
 25. Shore, D. & Baldwin, R. L. (1983). Energetics of DNA twisting II. Topoisomer analysis. *J. Mol. Biol.* **170**, 983–1007.
 26. Yan, J., Magnasco, M. O. & Marko, J. F. (1999). A kinetic proofreading mechanism for disentanglement of DNA by topoisomerases. *Nature*, **401**, 932–935.
 27. Yan, J., Magnasco, M. O. & Marko, J. F. (2001). Kinetic proofreading can explain the suppression of supercoiling of circular DNA molecules by type-II topoisomerases. *Phys. Rev. E Stat. Phys. Plasmas Fluids Relat. Interdiscip. Topics*, **63**, 031909.
 28. Pulleyblank, D. E. (1997). Of topo and Maxwell's dream. *Science*, **277**, 648–649.
 29. Shuman, S., Golder, M. & Moss, B. (1988). Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 16401–16407.
 30. Worland, S. T. & Wang, J. C. (1989). Inducible overexpression, purification and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**, 4412–4416.

Edited by J. O. Thomas

(Received 29 August 2003; received in revised form 7 November 2003; accepted 10 November 2003)

Resum breu del segon article

La topoisomerasa II minimitza els creuaments d'ADN fent una revisió de la topologia de l'ADN abans de completar cada procés de transport.

La topoisomerasa II transporta una doble hèlix d'ADN (segment T) a través de un tall transitori en un altre doble cadena (segment G). Aquest enzim no només resol els problemes topològics de l'ADN, sinó que simplifica les distribucions de cadenats, nusos i superenrotllaments d'ADN per sota dels valors d'equilibri termodinàmic. És enigmàtica la forma en que els segments d'ADN son seleccionats per aconseguir aquesta simplificació i no està clara la rellevància biològica d'aquesta capacitat.

Per entendre el mecanisme de simplificació, en aquest article s'ha estudiat el transit del segment T a través de les tres portes de la topoisomerasa II (porta d'entrada N-terminal, porta del segment G, i porta de sortida C-terminal). Els resultats experimentals demostren que la probabilitat de transport de l'ADN no és determinada durant la captura del segment T per la porta N-terminal. En canvi, es demostra que quan un segment T ha estat capturat i ha creuat el segment G, encara pot retrocedir i sortir per la porta N-terminal enlloc de sortir per la porta C-terminal. Quan aquest retorn és impedit experimentalment be tancant la porta N-terminal o be deixant oberta la porta C-terminal, la topoisomerasa II transporta el segment T però ja no simplifica la distribució d'equilibri.

Es conclou que la porta C-terminal dificulta l'alliberament del segment T, cosa que permet a l'enzim revisar la topologia de l'ADN i aleshores completar o cancel·lar el cicle de transport. Aquesta activitat de comprovació aclareix com la topoisomerasa II simplifica la distribució d'equilibri de la topologia de l'ADN en solució lliure. Però també explicaria com la topoisomerasa II evita produir entrecreuaments de l'ADN a l'atzar entre regions cromosòmiques que estan properes o en contacte dins del nucli cel·lular.

Segon article

Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage

Belén Martínez-García, Xavier Fernández, Ofelia Díaz-Ingelmo, Antonio Rodríguez-Campos, Chaysavanh Manichanh and Joaquim Roca*

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Barcelona 08028, Spain

Received July 10, 2013; Revised October 9, 2013; Accepted October 10, 2013

ABSTRACT

By transporting one DNA double helix (T-segment) through a double-strand break in another (G-segment), topoisomerase II reduces fractions of DNA catenanes, knots and supercoils to below equilibrium values. How DNA segments are selected to simplify the equilibrium DNA topology is enigmatic, and the biological relevance of this activity is unclear. Here we examined the transit of the T-segment across the three gates of topoisomerase II (entry N-gate, DNA-gate and exit C-gate). Our experimental results uncovered that DNA transport probability is determined not only during the capture of a T-segment at the N-gate. When a captured T-segment has crossed the DNA-gate, it can backtrack to the N-gate instead of exiting by the C-gate. When such backtracking is precluded by locking the N-gate or by removing the C-gate, topoisomerase II no longer simplifies equilibrium DNA topology. Therefore, we conclude that the C-gate enables a post-DNA passage proofreading mechanism, which challenges the release of passed T-segments to either complete or cancel DNA transport. This proofreading activity not only clarifies how type-IIA topoisomerases simplify the equilibrium topology of DNA in free solution, but it may explain also why these enzymes are able to solve the topological constraints of intracellular DNA without randomly entangling adjacent chromosomal regions.

INTRODUCTION

Type-IIA topoisomerases (type-IIA) invert DNA crossovers by transporting one double helix (T-segment) through the transient double-strand break that they

produce in another (G-segment) (1). Studies over the past two decades have provided a general picture of type-IIA structure and mechanism (Figure 1A). Type-IIA are homodimers of four functional domains: the ATP-ase domains or N-gate, the DNA cleavage-rejoining core or DNA-gate, the hinge domain or C-gate and the less-conserved C-terminal domains (CTDs) (1,2). To catalyze DNA transport, a G-segment binds first to the cleavage-rejoining core to configure the DNA-gate (3). Binding of ATP causes the ATPase domains to dimerize, and when this closure of the N-gate leads to the capture of a T-segment, a cascade of conformational changes ensues (3). The T-segment is moved toward the DNA-gate, where the G-segment is transiently cleaved by means of transesterification reactions with a pair of symmetrically related tyrosine residues (4). On aperture of the DNA-gate, the passing T-segment reaches the central chamber of the enzyme and it is then released outside the complex by crossing the C-gate (5,6). ATP hydrolysis starts during T-segment transport and concludes to allow N-gate reopening and enzyme turnover (7,8).

Despite using the same general mechanism, distinct type-IIA topoisomerases (bacterial DNA gyrase, bacterial topo IV, eukaryotic topo II) differ in their DNA transport preferences. DNA gyrase selectively introduces (–) supercoils into DNA (9). To do this, the CTDs of gyrase wrap DNA to juxtapose contiguous G- and T-segments and enforce the inversion of (+) supercoil crossings (10). Topo II and topo IV do not have DNA supercoiling activity. They reduce instead the DNA crossovers found in catenated, knotted and supercoiled DNA molecules (11,12). The CTDs of topo II and topo IV are not required for DNA transport activity but enable different kinetics to unlink right- and left-handed interwinding of DNA duplexes (13,14).

In 1997, Rybenkov *et al.* (15) discovered that topo II and topo IV are able to produce steady-state fractions of catenane, knot and supercoil crossings that are many times lower than the corresponding equilibrium fractions.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 934020117; Fax: +34 934034979; Email: joaquim.roca@ibmb.csic.es

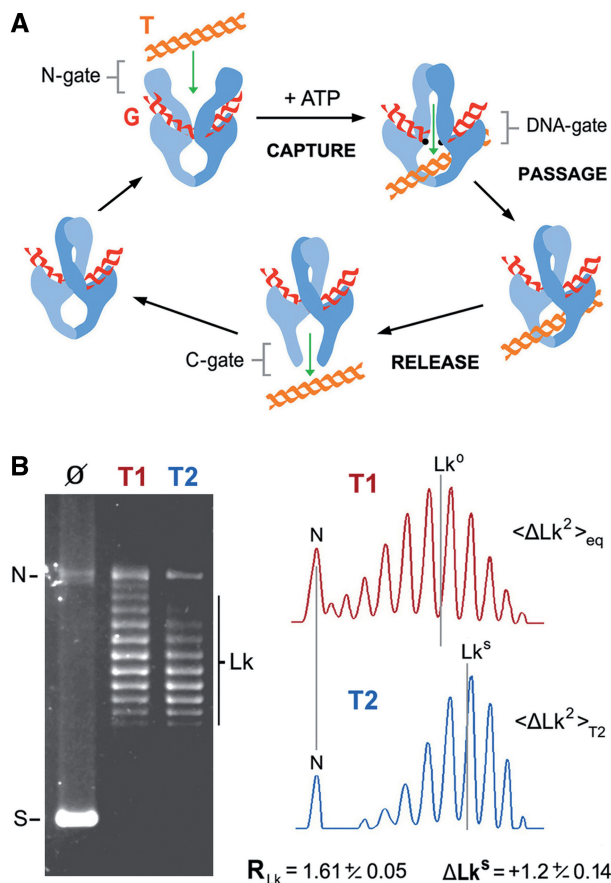


Figure 1. DNA transport mechanism and DNA supercoil simplification activity of topoisomerase II. (A) General structure and main steps of the DNA transport mechanism: T-segment capture at the N-gate, T-segment passage across the DNA-gate and T-segment release by the C-gate. CTDs, which are dispensable for DNA transport activity, are not shown. (B) Steady-state Lk distributions produced by vaccinia virus topoisomerase I (T1) and *S. cerevisiae* topoisomerase II (T2) after relaxation of a negatively supercoiled 7.9-kb plasmid (\emptyset). The reactions (enzyme/DNA molar ratio of 0.5:1, during 30 min at 37°C), DNA electrophoresis and analysis of Lk distributions were done as detailed in the ‘Materials and Methods’ section. The gel position of supercoiled (S), nicked (N) and Lk topoisomers (Lk) is indicated. Lane plots compare the variance ($R_{Lk} = \langle Lk^2 \rangle_{eq} / \langle Lk^2 \rangle_{T2}$) and the central value ($\Delta Lk^S = Lk^S - Lk^0$) of both Lk distributions. Mean \pm SD values of R_{Lk} and ΔLk^S are from three experiments.

This directionality of DNA transport has puzzled scientists ever since because it was enigmatic how T-segments could be selected locally to simplify the equilibrium topology of much larger DNA molecules (15,16). Several theories have been proposed. The active sliding model postulated that the topoisomerase forms and actively shortens a DNA loop to corral potential T-segments (15). The kinetic proofreading model proposed that DNA capture and transport requires two successive collisions with potential T-segments. As a result, DNA transport probability has a quadratic relationship with the DNA collision rate (17). The G-segment hairpin model postulated that the topoisomerase produces a sharp bend in the G-segment, which funnels T-segments to be transported preferentially from the inside to the outside of the bend (18). The three-segment interaction model

proposed the enzyme reduces the effective DNA contour length because it can interact simultaneously with two potential T-segments before capturing one of them (19). The inter-hooked DNA juxtaposition model postulated that the topoisomerase recognizes the geometry of interhooked DNA crossovers as potential G- and T-segments (20). Thus far, experimental results have discarded the sliding mechanism (16) and ruled out the kinetic proofreading (21). Only the hairpin model is backed by the experimental evidence of a strong bend induced by type-IIA topoisomerases in the G-segment (18,22). However, this bend is not sufficiently sharp to explain the degree of DNA topology simplification experimentally observed (18,23). Recent studies have also shown that bending angles produced by different type-IIA do not correlate with the simplification efficiency of the corresponding enzymes (24,25). Thus, the mechanism by which type-IIA simplifies equilibrium DNA topology remains controversial and its biological relevance poorly understood.

Here we examined the transit of the T-segment across the three gates of yeast topoisomerase II during the simplification of equilibrium fractions of DNA supercoils. Our results uncovered that simplification of equilibrium DNA topology occurs because, after T-segment capture and passage, the topoisomerase challenges the release of the T-segment with the C-gate, and that this constriction permits either the completion or backtracking of DNA transport. This post-DNA passage proofreading activity not only clarifies how type-IIA simplifies equilibrium DNA topology, but also suggests a crucial biological role by preventing the random entangling of intracellular DNA.

MATERIALS AND METHODS

DNA and topoisomerases

Plasmids pBR322 (4.3 kb) and YCp50 (7.9 kb) were purified by density gradient centrifugation in cesium chloride following standard procedures. Topoisomerase I of vaccinia virus (T1) was produced in *Escherichia coli* and purified as previously described (26). A CTD-less topoisomerase II of *Saccharomyces cerevisiae* (T2) was produced from pGAL1Top2(1196)-HMK-His (27) in the protease-deficient yeast strain BCY123-*Atop1*. This strain was constructed by disrupting the *TOP1* gene in BCY123, as previously described (28). T2 was purified following the procedures previously described for the full-length yeast topo II (4). T2 was stored at a concentration of 2 mg/ml at -80°C , and working stocks at 100 ng/ml were kept at -20°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 500 mM KCl, 7 mM 2-mercaptoethanol, 100 $\mu\text{g/ml}$ bovine serum albumin (BSA) and 50% (v/v) glycerol. The T2 derivative, in which the C-gate can be reversibly locked by a pair of engineered disulfide bonds, was obtained by mutating two amino residues, N1043C and K1127C, as previously described (6). This enzyme was produced and kept under the same conditions as T2, but omitting sulfhydryl reagents in all buffers.

DNA relaxation and analysis of *Lk* distributions

DNA plasmids (0.2 pmol) were incubated with T1 (catalytic excess) or T2 (at the specified molar ratio) in a 50- μ L volume of 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol and 100 μ g/ml BSA. T2 reactions were initiated by the addition of ATP (1 mM) when indicated. Temperature and incubation times are specified in each experiment. Reactions were stopped with the addition of 20 mM EDTA, 0.5% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS) and 100 μ g/ml proteinase K, and incubated for 15 min at 50°C. Reaction samples were loaded onto 0.8% (w/v) agarose gels. DNA electrophoresis was carried out at 1.6 V/cm for 18 h in TBE buffer (50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) containing 0.2 μ g/ml chloroquine. In these conditions, the distributions of *Lk* topoisomers of relaxed DNA circles adopt positive writhe and migrate faster than nicked circles. Gels were stained with ethidium bromide, destained in water and photographed over an ultraviolet light source with a Kodak GL1500 camera. Plots of *Lk* distributions and quantification of *Lk* topoisomers were done using Kodak Molecular Imaging Software v4.5 and Image 1.34s. The topoisomer variance of *Lk* distributions $\langle \Delta Lk^2 \rangle$ was calculated as $\Sigma [pi(\Delta Lki)^2] / \Sigma pi$, where *pi* is the amount of each topoisomer *i* in the distribution and ΔLki is the linking number for topoisomer *i* relative to that of a reference topoisomer near the center of the distribution.

T-segment capture in single *Lk* topoisomers

Individual *Lk* topoisomers of pBR322 (4.3 kb) were purified from unstained agarose gel slices. Approximately 50 fmol of DNA topoisomer and 25 fmol of T2 were mixed at 25°C in a 25- μ L volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 150 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 7 mM 2-mercaptoethanol and 100 mg/ml BSA. AMPPNP was added to 2 mM to close the N-gate and form high salt-resistant T2/DNA complexes (3). After 5 min of incubation, 1 volume of 2 M NaCl was added, and the mixture was passed through a GF/C (Whatman) fiberglass filter as described in (29). Free DNA molecules were recovered from the filtrate, and T2-bound DNA circles were eluted from the filter with 1% SDS. Both fractions were analyzed by electrophoresis (2 V/cm for 14 h) in 1% agarose in TBE buffer (50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) containing 0.2 μ g/ml chloroquine. DNA populations were quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blot probed with ³²P-labeled DNA obtained by random priming.

T-segment backtracking in single *Lk* topoisomers

Approximately 50 fmol of gel-purified *Lk_i* topoisomer and 25 fmol of the T2 derivative, in which the C-gate was locked by a pair of disulfide bonds, were mixed at 15°C in a 40- μ L volume of 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 25 mM KCl, 8 mM MgCl₂ and 100 mg/ml BSA. The mixture was supplemented either with ATP (1 mM) or AMPPNP (2 mM) and incubated for 5 min. Half of the mixture (20 μ L) was then shifted to 40°C. After 5 min of

incubation, both reactions were quenched with 1 volume of 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS. DNA products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel in TBE buffer (50 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) containing 0.2 μ g/ml chloroquine. DNA populations were quantified by phosphor-imaging analysis of the gel-blot probed with ³²P-labeled DNA obtained by random priming.

Construction of T2 Δ 83

Plasmid pGAL1Top2(1196)-HMK-His was used as polymerase chain reaction template to generate an 83-amino acid deletion between Leu1039 and Trp1122 of the *TOP2* gene. Primer Δ 83-Fwd, 5' *GCGGGTTGGTCATTGACC AAGGAAAG* 3', was complement to the 3367–3386 *TOP2* gene fragment and had a 5'-six nt tail (italicized) coding for Ala-Gly. Primer Δ 83-Rev, 5' *GGCCGCTAAC TCCTTTTCAATAATCA* 3', was reverse complement to the 3098–3117 *TOP2* gene fragment and included a 5'-six nt tail (italicized) coding for Ala-Ala. Both primers were extended in a thermal cycler by *Pfu* DNA polymerase. The reaction products were digested with *DpnI* endonuclease to degrade the initial template, and the amplified DNA was transformed into *E. coli* DH5 α electrocompetent cells. Transformants were screened for those containing the religated DNA plasmid that substituted the 83 amino acids by the spacer sequence Ala-Ala-Ala-Gly, which gave rise to unique *NotI* and *SacII* restriction sites. The modification was confirmed by DNA sequencing. The new plasmid, pGALT2 Δ 83HMK-His, was introduced in the BCY123-*Atop1* yeast strain to overexpress and purify T2 Δ 83, following the procedure described in (4).

RESULTS

Simplified distributions of DNA supercoils produced by topoisomerase II

Figure 1B compares the distributions of DNA linking number topoisomers (*Lk*) obtained after incubating a supercoiled DNA plasmid with topoisomerase I of *vacinia* virus (T1) and topoisomerase II of *S. cerevisiae* (T2). As expected, T2 generated an *Lk* distribution, the variance $\langle \Delta Lk^2 \rangle_{T2}$ of which was smaller than that of the thermal equilibrium *Lk* distribution $\langle \Delta Lk^2 \rangle_{eq}$ produced by T1 in the same reaction conditions. The parameter R_{Lk} , defined as $\langle \Delta Lk^2 \rangle_{eq} / \langle \Delta Lk^2 \rangle_{T2}$, was ~ 1.6 . Because the center of the non-equilibrium *Lk* distribution generated by T2 (Lk^S) did not always coincide with the equilibrium center (Lk^0) produced by T1, $Lk^S - Lk^0$ was defined as ΔLk^S . This simplification activity of T2 is efficient and robust. With T2/DNA molar ratios of 1:1, a negatively supercoiled 7.9-kb plasmid was relaxed and its thermal *Lk* distribution narrowed ($R_{Lk} \sim 1.6$) in ~ 1 min (Supplementary Figure S1A). Similar R_{Lk} values were achieved in a broad range of salt concentrations, from 10 to 250 mM KCl (Supplementary Figure S1B), and reaction temperatures, from 10 to 45°C (Supplementary Figure S1C). However, the symmetry of the narrowing process (ΔLk^S) highly depends on the reaction temperature. At 25°C, $\Delta Lk^S \sim 0$; at higher temperature, $\Delta Lk^S > 0$;

and, at lower temperature, $\Delta Lk^S < 0$. Thus, thermal changes do not deviate Lk^S as much as they deviate Lk^0 (Supplementary Figure SIC).

Supercoil simplification is not determined by T-segment capture

Figure 2A shows the Lk distributions produced by T1 and T2 on a 4.3-kb plasmid at 25°C. Because type-IIA topoisomerases change Lk in steps of two, the Lk distribution generated by T2 is in fact composed of two independent Lk distributions, one of odd values and one of even values. Therefore, topoisomers Lk^0 and Lk^{0-2} have steady-state concentrations (C_0 and C_{-2}) related by the equation $C_{-2}/C_0 = k_{(0,-2)}/k_{(-2,0)}$, where $k_{(0,-2)}$ is the rate constant for conversion of Lk^0 molecules into Lk^{0-2} , and $k_{(-2,0)}$ is the reverse rate constant (23,30). As expected, T2 activity produced a C_{-2}/C_0 ratio (0.17) much lower than that generated by T1 (0.35). To reduce C_{-2}/C_0 , T2 must decrease $k_{(0,-2)}/k_{(-2,0)}$. In a covalently closed DNA circle, any DNA transport event done by T2 results in a change in Lk . Therefore, rate constants $k_{(0,-2)}$ and $k_{(-2,0)}$ may relate directly to the corresponding probability (P) of capturing and passing a T-segment across the G-segment. It would then follow that $C_{-2}/C_0 = P_{(0,-2)}/P_{(-2,0)}$. Later, we present experimental evidence that disproves this equality.

Biochemical studies have shown that a T-segment cannot be accommodated between the closed N-gate and

the DNA-gate of T2 (31). This restraint is consistent with the swapped configuration of the closed N-gate (32), which enforces unidirectional passage of the T-segment across the DNA-gate following the capture step. Consequently, $P_{(0,-2)}$ and $P_{(-2,0)}$ can be calculated by examining the fractions of Lk^0 and Lk^{0-2} bound to T2 that interconvert after the irreversible closure of the N-gate with the non-hydrolysable ATP analog AMPPNP (Figure 2B) (33). Thus, we purified the Lk^0 and Lk^{0-2} topoisomers and conducted these one-step reactions in the same conditions used to calculate C_0 and C_{-2} . We found that the probability of capturing a T-segment to convert Lk^0 into Lk^{0-2} was 0.17, whereas the probability to convert Lk^{0-2} into Lk^0 was 0.50 (Figure 2C). These values predicted a $P_{(0,-2)}/P_{(-2,0)}$ ratio of 0.34. This value was similar to the C_{-2}/C_0 ratio at thermal equilibrium (0.35) and thus differed from the steady-state C_{-2}/C_0 ratio generated by T2 (0.17). Therefore, the mechanism that narrows the equilibrium distributions of DNA supercoils does not rely on T-segment capture probability.

Passed T-segment can backtrack across the DNA-gate and N-gate

Once the captured T-segment has crossed the DNA-gate, it can be accommodated in the central cavity of the topoisomerase (6,31). To complete DNA transport, the passed T-segment has to be expelled by the C-gate. Otherwise, if the N-gate reopens or loosens its swapped configuration,

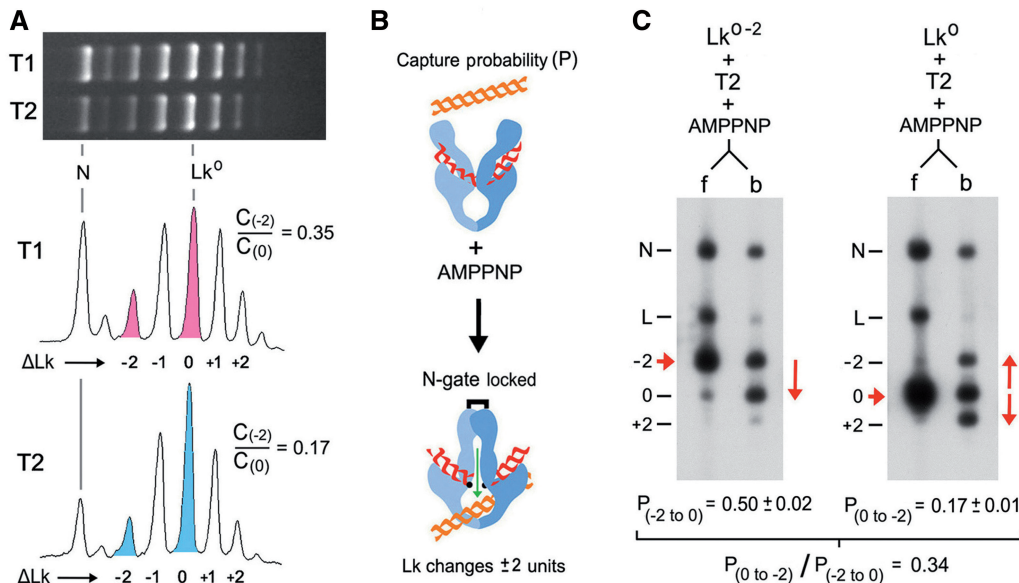


Figure 2. Interconversion of Lk topoisomers and their T-segment capture probability. (A) Lk distributions produced by T1 and T2 on a 4.3-kb plasmid at 25°C. Lane plots compare the concentration (C) of topoisomers Lk^{0-2} to Lk^0 in the equilibrium distribution generated by T1 (0.35) and in the non-equilibrium distribution produced by T2 (0.17). (B) A T2 enzyme bound to a G-segment will capture and pass a T-segment with some probability after the irreversible closure of the N-gate with AMPPNP. Thus, in a covalently closed DNA circle, DNA capture probability (P) is the fraction of G-segment-bound DNA molecules that change Lk (2 U) on addition of AMPPNP. (C) Topoisomers Lk^{0-2} and Lk^0 were purified and each was incubated at 25°C with T2 (enzyme/DNA molar ratio of 0.5:1). AMPPNP was added to irreversibly close the N-gate and thus allow only one DNA passage event per enzyme. Reaction mixtures were filtered through glass fibers to separate free DNA (f) from DNA circles bound to T2 (b). See 'Materials and Methods' section for details. The gel-blots show the DNA populations in f and b. The position of Lk^{0-2} , Lk^0 and Lk^{0+2} is indicated (-2, 0, +2). Nicked circles (N) and linear molecules (L) were generated during manipulation. The probability of capturing a T-segment to convert Lk^{0-2} into Lk^0 [$P_{(-2 \text{ to } 0)}$] was calculated as Lk^0 divided by the sum of circles bound to T2 ($Lk^{0-2} + Lk^0$). Likewise, the probability of capturing a T-segment to convert Lk^0 into Lk^{0-2} [$P_{(0 \text{ to } -2)}$] was calculated as Lk^{0-2} divided by the sum of circles bound to T2 ($Lk^0 + Lk^{0-2} + Lk^{0+2}$). Mean \pm SD values are from two experiments.

the T-segment could still backtrack across the DNA-gate and produce no net DNA transport. This uncoupling between T-segment capture and transport has been observed in DNA gyrase when the supercoiling density of DNA reaches a threshold (10). Later, we present experimental evidence that such backtracking can also occur in T2.

Previous studies have shown that when the C-gate of T2 is locked by means of engineered disulfide bonds, each enzyme bound to supercoiled DNA can change Lk only by 2 U because any T-segment passed ends up entrapped inside the topoisomerase (6,31). In those experiments, DNA supercoiling energy favored unidirectional movement of the T-segment, and backtracking was not observed. Here, we conducted a similar experiment but with relaxed DNA. To test backtracking, we purified a precise topoisomer (Lk_i) within the simplified Lk distribution produced by T2. Lk_i was chosen because $Lk_i < Lk^S$ at 15°C and $Lk_i > Lk^S$ at 40°C (Figure 3A). In this way, we could invert the preferential directionality of a T-segment across the DNA-gate by changing the reaction temperature from 15 to 40°C. Accordingly, we first incubated Lk_i with T2 (with the C-gate locked and in presence of ATP) at 15°C. As expected, a fraction of Lk_i was converted into Lk_{i+2} . Next, we raised the temperature to 40°C. As a result, the Lk_{i+2} fraction nearly disappeared and a fraction of Lk_{i-2} molecules developed (Figure 3B). The disappearance of the Lk_{i+2} revealed the backtracking of T-segments entrapped at 15°C. Likewise, the appearance of Lk_{i-2} indicated that such T-segments had escaped by the N-gate. Only by this way could new T-segments have been captured and passed at 40°C to produce the

population of Lk_{i-2} . We corroborated that backtracking requires the opening of the N-gate by doing an analogous experiment, in which we added AMPPNP instead of ATP. In this case, Lk_i were also converted into Lk_{i+2} at 15°C. However, because AMPPNP did not allow the N-gate to reopen, no more Lk changes occurred when the temperature was raised to 40°C (Figure 3C).

Simplified Lk distributions widen when T-segment backtracking is precluded

The above results indicated that backtracking of passed T-segments is possible when DNA topology is near equilibrium. Accordingly, we envisaged that T2 narrows equilibrium Lk distributions because passed T-segments driving Lk away from equilibrium are more prone to backtrack than those driving Lk toward it (Figure 4A). If this hypothesis is correct, interfering with the reopening of the N-gate while T2 is narrowing an Lk distribution, it should broaden the Lk distribution because none of the T-segments being passed at that time would be able to backtrack (Figure 4B). Thus, we relaxed a supercoiled plasmid with T2 in the presence of ATP. Once the reaction had reached the steady state, we blocked the reopening of the N-gate by adding an excess of AMPPNP over the initial ATP concentration. As seen in Figure 4C, the simplified Lk distribution generated by T2 readily increased its variance on the addition of AMPPNP. This broadening cannot be attributed to contaminating topo I because T2 was purified from $\Delta top1$ cells, and no trace of DNA relaxation activity was observed in the absence of ATP. Likewise, this broadening was unlikely to be produced by the structure

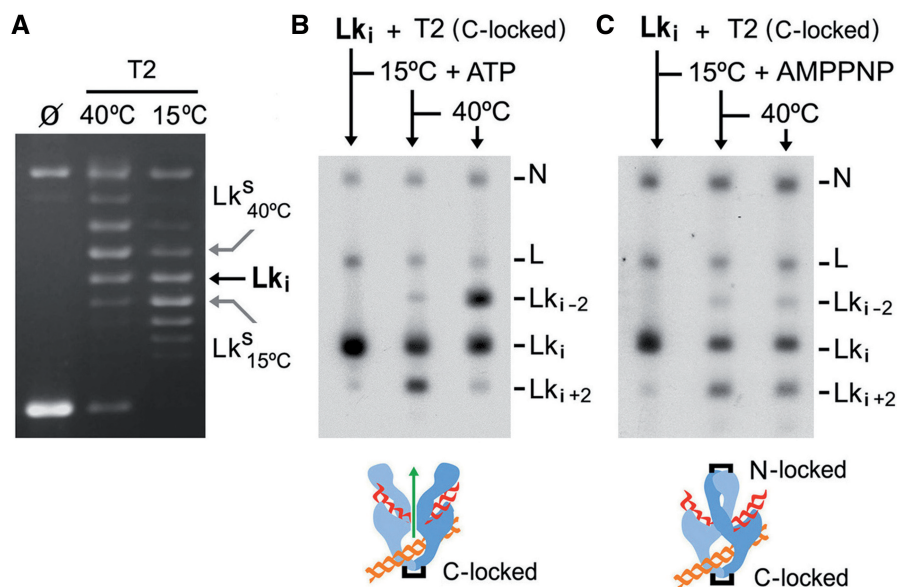


Figure 3. Backtracking of the T-segment across the DNA-gate and N-gate. (A) The gel compares Lk distributions of a 4.3-kb plasmid generated by T2 at 15 and 40°C. The position of the Lk_i topoisomer is indicated. Note that $Lk_i < Lk^S$ at 15°C and $Lk_i > Lk^S$ at 40°C. (B) The gel-blot shows the purified Lk_i topoisomer and its reaction with T2, which had the C-gate locked (enzyme/DNA molar ratio of 0.5:1). The mixture was first incubated at 15°C during 5 min in the presence of ATP and sampled. The mixture was then shifted to 40°C for 5 more minutes and sampled. See 'Materials and Methods' section for details. (C) Experiment done as in (B), but in the absence of ATP and with AMPPNP added at 15°C. In this way, both the C-gate and N-gate were locked after T-segment passage. The position of topoisomers Lk_{i-2} , Lk_i and Lk_{i+2} is shown. Nicked circles (N) and linear molecules (L) were generated during manipulation.

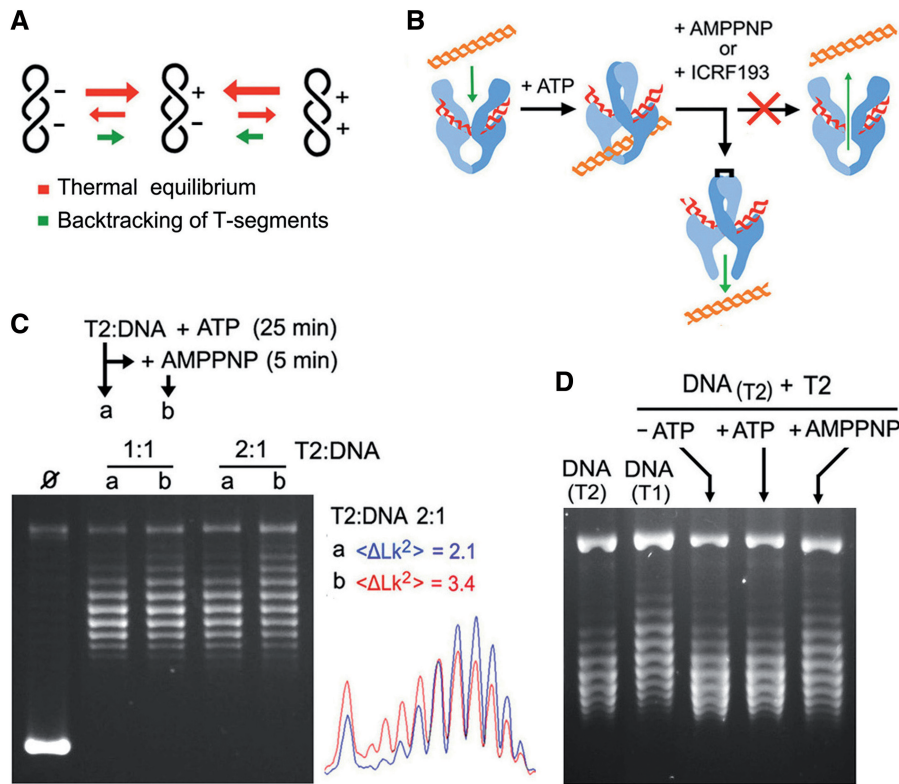


Figure 4. Simplified Lk distributions widen when T-segment backtracking is precluded. (A) We hypothesize that the narrowing of Lk distributions occurs because T-segments that deviate Lk from equilibrium are those more prone to backtrack. (B) Compounds that block the reopening of the N-gate (AMPPNP or ICRF-193) impede DNA backtracking, and therefore they should interfere with the simplification activity of T2 during steady state. (C) A 7.9-kb supercoiled DNA plasmid was incubated with T2 (T2/DNA molar ratios of 1:1 and 2:1) in the presence of ATP (0.1 mM) at 30°C. After 25 min, half of each reaction was sampled (lane a), and AMPPNP (2 mM) was added to the other half for 5 more minutes (lane b). Gel plots compare the variance of Lk distributions ($\langle \Delta Lk^2 \rangle$) before and after the addition of AMPPNP (T2/DNA molar ratio of 2:1). (D) Lanes DNA_(T1) and DNA_(T2) show the Lk distributions of a 7.9-kb plasmid produced by T1 and T2, respectively. The DNA_(T2) sample was purified and incubated again with T2 (T2/DNA molar ratio of 2:1) during 5 min in the absence of ATP, in the presence of ATP (1 mM) and in the presence of AMPPNP (2 mM). Reaction settings, gel electrophoresis and analyses of Lk populations were as described in the ‘Materials and Methods’ section.

of T2/AMPPNP complexes, as previous studies indicated that they do not significantly alter the topology of the interacting DNA (19). Yet, because each T2/AMPPNP complex precluded at most one backtracking event, this effect had to be stoichiometric and, effectively, the widening increased with the molar ratio of T2 to DNA. Note also that the widening was not symmetric. This shift occurred because $Lk^S > Lk^0$ at 30°C (Supplementary Figure S1C). Accordingly, most DNA passage events displaced the non-equilibrium distribution (centered in Lk^S) toward the equilibrium distribution (centered in Lk^0). Remarkably, an identical result was obtained by blocking the reopening of the N-gate in a different way. Instead of adding AMPPNP to compete with ATP, we added the N-gate inhibitor ICRF193 (34,35) (Supplementary Figure S2).

To further verify that supercoil simplification depends on the backtracking of passed T-segments that drive Lk away from equilibrium, we conducted a similar experiment but using as initial DNA substrate a purified Lk distribution previously narrowed by T2. As seen in Figure 4D, the simplified Lk distribution was not altered after T2 incubation, either in the absence or presence of ATP. However, it clearly broadened when incubation with

T2 was followed by the addition of AMPPNP. As expected, without possible backtracking of passed T-segments, most DNA passage events tended to convert the non-equilibrium Lk distribution into the thermal equilibrium Lk distribution produced by T1.

C-gate integrity is required to simplify equilibrium Lk distributions

The mechanism for topology simplification inferred from the above results predicted another experimental outcome: if the C-gate were deleted to leave the central chamber of T2 open, all passed T-segments would readily exit the enzyme and produce net transport. Consequently, topology simplification that relies on DNA backtracking would not occur. To test this hypothesis, we engineered a T2 polypeptide chain (T2 Δ 83), in which 83 amino residues of the C-gate of T2 (36), between L1039 and W1122, were substituted by a short residue linker (AAAG) (Figure 5A). T2 Δ 83 was produced in the yeast strain BCY123-*Atop1* and purified to test its activity (Supplementary Figure S3). Filter-binding assays (29) revealed that, although T2 Δ 83 binds DNA, it does not form high salt-stable complexes with circular DNA following AMPPNP addition

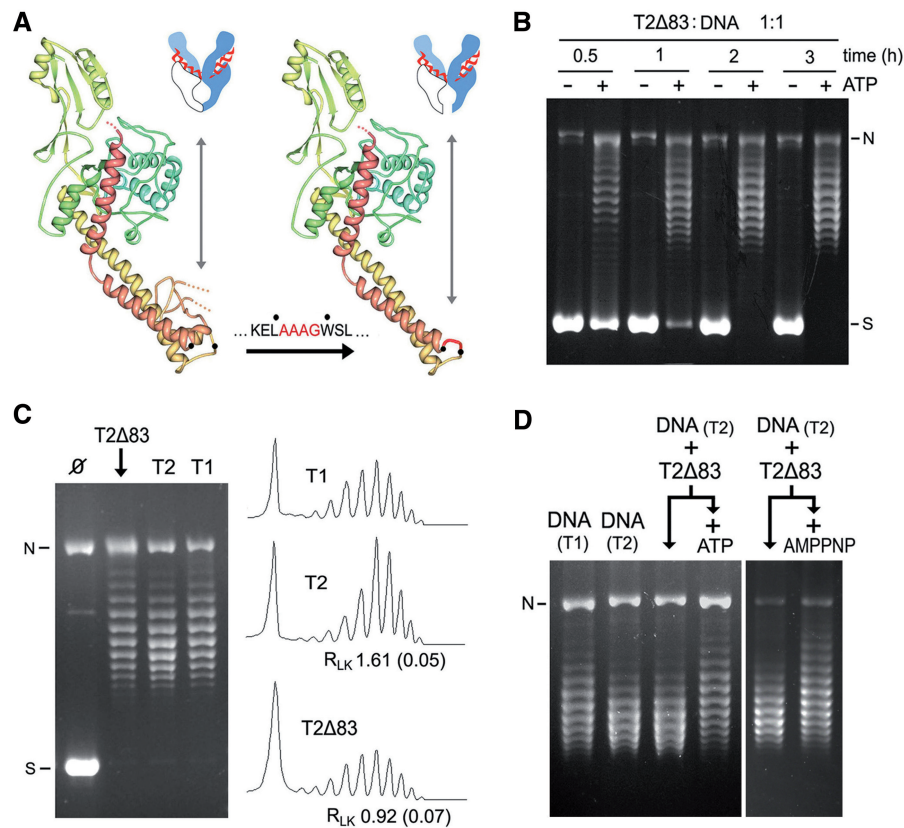


Figure 5. Disruption of the C-gate precludes the simplification of equilibrium DNA topology. (A) Structure of the promoter region that configures the central chamber of T2 and the replacement of 83 amino residues of the C-gate domain, between L1039 and W1122, by an AAAG linker (T2Δ83). (B) Time course relaxation of a negatively supercoiled DNA plasmid (7.9 kb) with T2Δ83 (E/DNA molar ratio of 1, 37°C) in the absence and presence of ATP (1 mM). (C) Comparison of the steady-state Lk distributions produced by T2Δ83, T2 and T1 (E/DNA molar ratio of 1:1, 37°C, 6 h). Plots of the Lk distributions and mean R_{Lk} (SD) values of from three experiments are shown. (D) Lanes DNA_(T1) and DNA_(T2) show Lk distributions produced by T1 and T2. The DNA_(T2) sample was purified and incubated with T2Δ83 (E/DNA molar ratio of 1:1, 37°C, 30 min) in the absence and presence of ATP (1 mM). The DNA_(T2) sample was also incubated with T2Δ83 (E/DNA molar ratio of 5:1, 37°C, 30 min) alone or following the addition of AMPPNP (2 mM). Reaction settings, gel electrophoresis and analyses of Lk populations were as described in the 'Materials and Methods' section. N, nicked circles. S, supercoiled DNA.

(Supplementary Figure S4). This observation corroborated that the disruption of the C-gate lets the central chamber of the enzyme permanently open and, hence, it cannot produce a toroid around DNA on closure of the N-gate.

T2Δ83 relaxed supercoiled DNA in an ATP-dependent manner (Figure 5B). However, the specific activity of T2Δ83 was near two orders of magnitude below that of T2 because it required a 2-h incubation at an enzyme/DNA molar ratio of 1:1 to produce steady-state Lk distributions (Figure 5B). This reduced activity was expected, as the global stability of the enzyme could be altered and its interdomain couplings could be less efficient in the absence of the C-gate interface. When we compared the steady-state Lk distributions produced by T2Δ83, T2 and T1 in the same reaction conditions and longer incubation times (6 h), we found that T2Δ83 was not able to simplify DNA topology to below equilibrium (Figure 5C). This outcome could not be attributed to contaminating topo I because T2Δ83 was purified from $\Delta top1$ cells. To further corroborate that simplified Lk distributions were not the final product of T2Δ83 activity, we use as initial DNA

substrate of the relaxation reaction an Lk distribution previously narrowed by T2. As shown in Figure 5D, incubation of the simplified Lk distribution with T2Δ83 in the absence of ATP produced no changes. However, in the presence of ATP, T2Δ83 broadened and shifted the Lk distribution into a shape similar to that produced by T1. Therefore, the C-gate integrity was not essential for relaxing DNA supercoils but it was required for narrowing Lk distributions to below the equilibrium values.

Given that T2Δ83 has the C-gate permanently open, it is conceivable that this enzyme may be able to conduct DNA transport in reverse. However, when a simplified Lk distribution was incubated with T2Δ83 and AMPPNP was added (instead of ATP), a broadening effect was also observed (Figure 5D, right). Because a T-segment cannot be held between the DNA-gate and the closed N-gate, this observation argued against DNA passage in reverse. Yet, it cannot be fully discredited that a T-segment enters by the open C-gate, crosses the DNA-gate and then exits by the N-gate before it closes on nucleotide binding.

DISCUSSION

The experiments reported here uncover several new traits of the DNA transport mechanism of topoisomerase II. First, T-segment capture probability is determined mostly by DNA thermodynamics. Therefore, the mechanism that simplifies equilibrium DNA topology must operate after the capture of the T-segment. Second, once a passed T-segment has reached the central chamber of the topoisomerase, it is able to backtrack across the DNA-gate and N-gate, thus reverting DNA transport. This possibility elucidates why T-segment capture is not the sole determinant of DNA transport probability. This notion of T-segment backtracking is not entirely new, as it has been also observed in DNA gyrase (10). Third, simplification of equilibrium DNA topology does not occur when the backtracking of T-segments is prevented. We supported this conclusion in two ways: by blocking the reopening of the N-gate and by removing the C-gate. All these findings strongly suggest that the C-gate of topoisomerase II challenges the release of passed T-segments, and that this restraint allows proofreading DNA topology after T-segment passage, either to complete or to cancel DNA transport.

The factors that control the C-gate of type-IIA are unknown. The C-gate status could depend on the DNA-gate, such that the closure of either gate permits the aperture of the other (37,38). However, crystal images of type-IIA with both gates closed indicate that DNA-gate closure does not strictly enforce C-gate opening (39,40). Thus, C-gate aperture could be triggered by the steric hindrance of the passed T-segment after the DNA-gate closes (31,41). In any case, the exit of the T-segment across the C-gate is a dissociation process, the rate of which must be affected by the molecular environment (i.e. friction and electrostatic protein–DNA interactions) and the global DNA topology (i.e. thermodynamic energy of the crossover of the G-segment with the passed T-segment). Consequently, T-segment dissociation is likely to be fast when DNA transport is energetically favorable, but slow when DNA transport reaches or eventually departs from topology equilibrium. In this last case, if the N-gate reopens before the T-segment has escaped by the C-gate, our results demonstrate that backtracking of the T-segment can occur. We envisaged then that equilibrium DNA distributions are narrowed because passed T-segments that deviate DNA topology from the equilibrium center are those more likely to backtrack. Accordingly, removing the C-gate should increase the dissociation rate of such T-segments and preclude the simplification activity, as demonstrated by our results.

The simplification of DNA topology to below equilibrium values is an uphill reaction that, like DNA supercoiling by gyrase, could not occur without consuming ATP. However, in contrast to DNA supercoiling by gyrase, the amount of free energy required here is insignificant (<1%) compared with the total free energy available from ATP hydrolysis (16). Actually, all type-IIA consume ATP, regardless of the energetics of the topology interconversions (42,43). These premises have led to the proposal that the main and ancestral role of ATP is the coordination of the enzyme gates to prevent DNA double-strand breaks (41,44).

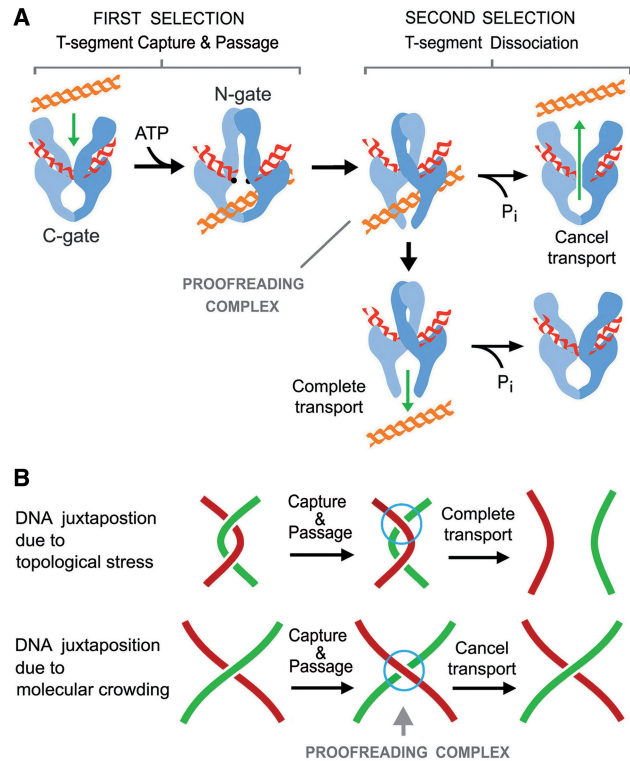


Figure 6. Post-DNA passage proofreading mechanism of topoisomerase II. (A) Under PPR, DNA transport probability results from two levels of selection. First, DNA juxtaposition probability determines T-segment capture by the closure of the N-gate on ATP binding. Second, after T-segment capture and passage, the C-gate challenges the T-segment to dissociate from the ‘proofreading complex’. When DNA topology favors quick dissociation, the T-segment crosses the C-gate and completes DNA transport. However, when dissociation is not favored, ATP hydrolysis and reopening of the N-gate occurs before the T-segment has escaped by the C-gate. In this case, the T-segment backtracks and produces no net DNA transport. (B) PPR permits the removal of topological constraints generated during DNA transcription and replication (quick dissociation of passed T-segments). PPR prevents the entanglement of independent chromosome domains when their DNA strands come in proximity due to molecular crowding (slow dissociation of passed T-segments).

In this regard, our present findings provide additional insight on the role of ATP. Enzymatic proofreading requires some irreversible steps to improve the selectivity of a reaction. The capture of a T-segment by the N-gate and its subsequent release, by either the C-gate or N-gate, are separated by the irreversible use of ATP. Therefore, the ATP cycle of type-IIA enables a proofreading scheme, in which the first step of selection (capture) is either enhanced or neutralized by the second (release). While T-segment capture probability relies mainly on DNA topology, the dissociation rate of the T-segment depends again on DNA topology and the constraints of the C-gate. Therefore, combination of both selection levels can produce an acute non-linear relationship between DNA capture probability and effective DNA transport (Figure 6A).

A striking observation in our study is the effect of temperature on ΔLk^S (Supplementary Figure S1C). Previous studies postulated that ΔLk^S could result from three-segment interaction geometry (19). This hypothesis is no

longer valid because it fails to explain why Lk^S does not parallel the thermal changes of Lk^0 . The reduced thermal deviations of Lk^S observed here suggest that DNA behaves as if its free length were shorter. This shortening effect may reflect the formation of the proofreading complex, which entraps a crossover of the G-segment and the passed T-segment. Thus, the DNA is transiently divided into two smaller thermodynamic domains during the proofreading step.

The biological relevance of the type-IIA capacity to simplify the equilibrium topology of DNA in free solution has been enigmatic because this activity cannot be extrapolated to *in vivo* systems (16). We believe that the post-DNA passage proofreading mechanism (PPR) disclosed here elucidates this matter. Unlike other models of topology simplification (15,17–20), in which DNA transport probability is determined just by T-segment capture, the PPR mechanism weighs the dissociation rate of passed T-segments. Dissociation across the C-gate is likely to be favored when the topoisomerase inverts DNA crossovers generated by topological stress (i.e. catenanes between newly replicated DNA duplexes and supercoils arising during DNA replication and transcription). However, dissociation may be less favored when the topoisomerase inverts transient juxtapositions of intracellular DNA that are merely due to molecular crowding. In this case, PPR can cancel DNA transport and prevent type-IIA topoisomerases from randomly entangling the vast concentration of intracellular DNA (Figure 6B). Thus, PPR may play a fundamental role in preserving the high compartmentalization of chromosomal territories during interphase, and in keeping sister chromatids topologically unlinked even though they are in close contact until anaphase. This crucial discrimination of intracellular DNA juxtapositions could not be possible if DNA transport selectivity of type-IIA were determined solely by T-segment capture probability.

Because all type-IIA topoisomerases that simplify equilibrium DNA topology present high structural conservation of the N-gate, DNA-gate and C-gate (1,2), the PPR mechanism may be a common trait of these enzymes. In this regard, the more distant related family of type-IIB topoisomerases (i.e. archaea topo VI) does not have a C-gate to challenge the release of passed T-segments and, remarkably, these enzymes do not simplify DNA topology to below equilibrium values (45).

PPR complements the other mechanisms that control the DNA transport selectivity of type-IIA enzymes *in vivo*. While the geometry of the interacting DNA segments optimizes the removal of harmful knots and catenanes, the PPR mechanism minimizes the random formation of such entanglements in the first place. Uncovering the DNA damage and chromosomal aberrations that result from interfering with the PPR mechanism opens up an interesting area for future research.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

FUNDING

The Plan Nacional de I+D+I of Spain [BFU2008-00366 and BFU2011-23851 to J.R.]; Pla de Recerca de Catalunya [2009SGR01222 to J.R.]; Xarxa de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya. Funding for open access charge: Plan Nacional de I+D+I of Spain [BFU2011-23851 to J.R.].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Wang, J.C. (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q. Rev. Biophys.*, **31**, 107–144.
- Corbett, K.D. and Berger, J.M. (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 95–118.
- Roca, J. and Wang, J.C. (1992) The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell*, **71**, 833–840.
- Worland, S.T. and Wang, J.C. (1989) Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4412–4416.
- Roca, J. and Wang, J.C. (1994) DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell*, **77**, 609–616.
- Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.C. and Wang, J.C. (1996) DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 4057–4062.
- Baird, C.L., Harkins, T.T., Morris, S.K. and Lindsley, J.E. (1999) Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 13685–13690.
- Baird, C.L., Gordon, M.S., Andrenyak, D.M., Marecek, J.F. and Lindsley, J.E. (2001) The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II. Slow rates of ATP resynthesis and P(i) release. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27893–27898.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. and Nash, H.A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 3872–3876.
- Kampranis, S.C., Bates, A.D. and Maxwell, A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 8414–8419.
- Goto, T. and Wang, J.C. (1982) Yeast DNA topoisomerase II. An ATP-dependent type II topoisomerase that catalyzes the catenation, decatenation, unknotting, and relaxation of double-stranded DNA rings. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5866–5872.
- Peng, H. and Marians, K.J. (1995) The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25286–25290.
- Corbett, K.D., Schoeffler, A.J., Thomsen, N.D. and Berger, J.M. (2005) The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J. Mol. Biol.*, **351**, 545–561.
- McClendon, A.K., Gentry, A.C., Dickey, J.S., Brinch, M., Bendsen, S., Andersen, A.H. and Osheroff, N. (2008) Bimodal recognition of DNA geometry by human topoisomerase II alpha: preferential relaxation of positively supercoiled DNA requires elements in the C-terminal domain. *Biochemistry*, **47**, 13169–13178.
- Rybenkov, V.V., Ullsperger, C., Vologodskii, A.V. and Cozzarelli, N.R. (1997) Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science*, **277**, 690–693.
- Stuchinskaya, T., Mitchenall, L.A., Schoeffler, A.J., Corbett, K.D., Berger, J.M., Bates, A.D. and Maxwell, A. (2009) How do type II topoisomerases use ATP hydrolysis to simplify DNA topology beyond equilibrium? Investigating the relaxation reaction of nonsupercoiling type II topoisomerases. *J. Mol. Biol.*, **385**, 1397–1408.

17. Yan, J., Magnasco, M.O. and Marko, J.F. (1999) A kinetic proofreading mechanism for disentanglement of DNA by topoisomerases. *Nature*, **401**, 932–935.
18. Vologodskii, A.V., Zhang, W., Rybenkov, V.V., Podtelezchnikov, A.A., Subramanian, D., Griffith, J.D. and Cozzarelli, N.R. (2001) Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 3045–3049.
19. Trigueros, S., Salceda, J., Bermudez, I., Fernandez, X. and Roca, J. (2004) Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology. *J. Mol. Biol.*, **335**, 723–731.
20. Liu, Z., Mann, J.K., Zechiedrich, E.L. and Chan, H.S. (2006) Topological information embodied in local juxtaposition geometry provides a statistical mechanical basis for unknotting by type-2 DNA topoisomerases. *J. Mol. Biol.*, **361**, 268–285.
21. Seol, Y., Hardin, A.H., Strub, M.P., Charvin, G. and Neuman, K.C. (2013) Comparison of DNA decatenation by *Escherichia coli* topoisomerase IV and topoisomerase III: implications for non-equilibrium topology simplification. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4640–4609.
22. Dong, K.C. and Berger, J.M. (2007) Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature*, **450**, 1201–1205.
23. Vologodskii, A. (2009) Theoretical models of DNA topology simplification by type IIA DNA topoisomerases. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3125–3133.
24. Hardin, A.H., Sarkar, S.K., Seol, Y., Liou, G.F., Osheroff, N. and Neuman, K.C. (2011) Direct measurement of DNA bending by type IIA topoisomerases: implications for non-equilibrium topology simplification. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5729–5743.
25. Lee, I., Dong, K.C. and Berger, J.M. (2013) The role of DNA bending in type IIA topoisomerase function. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5444–5456.
26. Shuman, S., Golder, M. and Moss, B. (1988) Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16401–16407.
27. Li, W. and Wang, J.C. (1997) Footprinting of yeast DNA topoisomerase II lysyl side chains involved in substrate binding and interdomain interactions. *J. Biol. Chem.*, **272**, 31190–31195.
28. Roca, J., Gartenberg, M.R., Oshima, Y. and Wang, J.C. (1992) A hit-and-run system for targeted genetic manipulations in yeast. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4671–4672.
29. Roca, J. (2001) Filter binding assays for topoisomerase-DNA complexes. *Methods Mol. Biol.*, **95**, 75–80.
30. Yan, J., Magnasco, M.O. and Marko, J.F. (2001) Kinetic proofreading can explain the suppression of supercoiling of circular DNA molecules by type-II topoisomerases. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, **63**, 031909.
31. Roca, J. (2004) The path of the DNA along the dimer interface of topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*, **279**, 25783–25788.
32. Schmidt, B.H., Osheroff, N. and Berger, J.M. (2012) Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1147–1154.
33. Roca, J. and Wang, J.C. (1996) The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells*, **1**, 17–27.
34. Roca, J., Ishida, R., Berger, J.M., Andoh, T. and Wang, J.C. (1994) Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 1781–1785.
35. Classen, S., Olland, S. and Berger, J.M. (2003) Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 10629–10634.
36. Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C. and Wang, J.C. (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, **379**, 225–232.
37. Schmidt, B.H., Burgin, A.B., Dewese, J.E., Osheroff, N. and Berger, J.M. (2010) A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature*, **465**, 641–644.
38. Wendorff, T.J., Schmidt, B.H., Heslop, P., Austin, C.A. and Berger, J.M. (2012) The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J. Mol. Biol.*, **424**, 109–124.
39. Laponogov, I., Veselkov, D.A., Sohi, M.K., Pan, X.S., Achari, A., Yang, C., Ferrara, J.D., Fisher, L.M. and Sanderson, M.R. (2007) Breakage-reunion domain of *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV: crystal structure of a gram-positive quinolone target. *PLoS ONE*, **2**, e301.
40. Bax, B.D., Chan, P.F., Eggleston, D.S., Fosberry, A., Gentry, D.R., Gorrec, F., Giordano, I., Hann, M.M., Hennessy, A., Hibbs, M. *et al.* (2010) Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*, **466**, 935–940.
41. Roca, J. (2009) Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 721–730.
42. Bates, A.D. and Maxwell, A. (2010) The role of ATP in the reactions of type II DNA topoisomerases. *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 438–442.
43. Bates, A.D. and Maxwell, A. (2007) Energy coupling in type II topoisomerases: why do they hydrolyze ATP? *Biochemistry*, **46**, 7929–7941.
44. Bates, A.D., Berger, J.M. and Maxwell, A. (2011) The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6327–6339.
45. Corbett, K.D., Benedetti, P. and Berger, J.M. (2007) Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 611–619.

SUPPLEMENTARY DATA

Topoisomerase II minimizes DNA entanglements by proofreading DNA topology after DNA strand passage

Belén Martínez-García, Xavier Fernández, Ofelia Díaz-Ingelmo, Antonio Rodríguez-Campos, Chaysavanh Manichanh and Joaquim Roca*

Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB); Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC); Barcelona, 08028; Spain.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +34 934020117; Fax: +34 934034979; Email: joaquim.roca@ibmb.csic.es

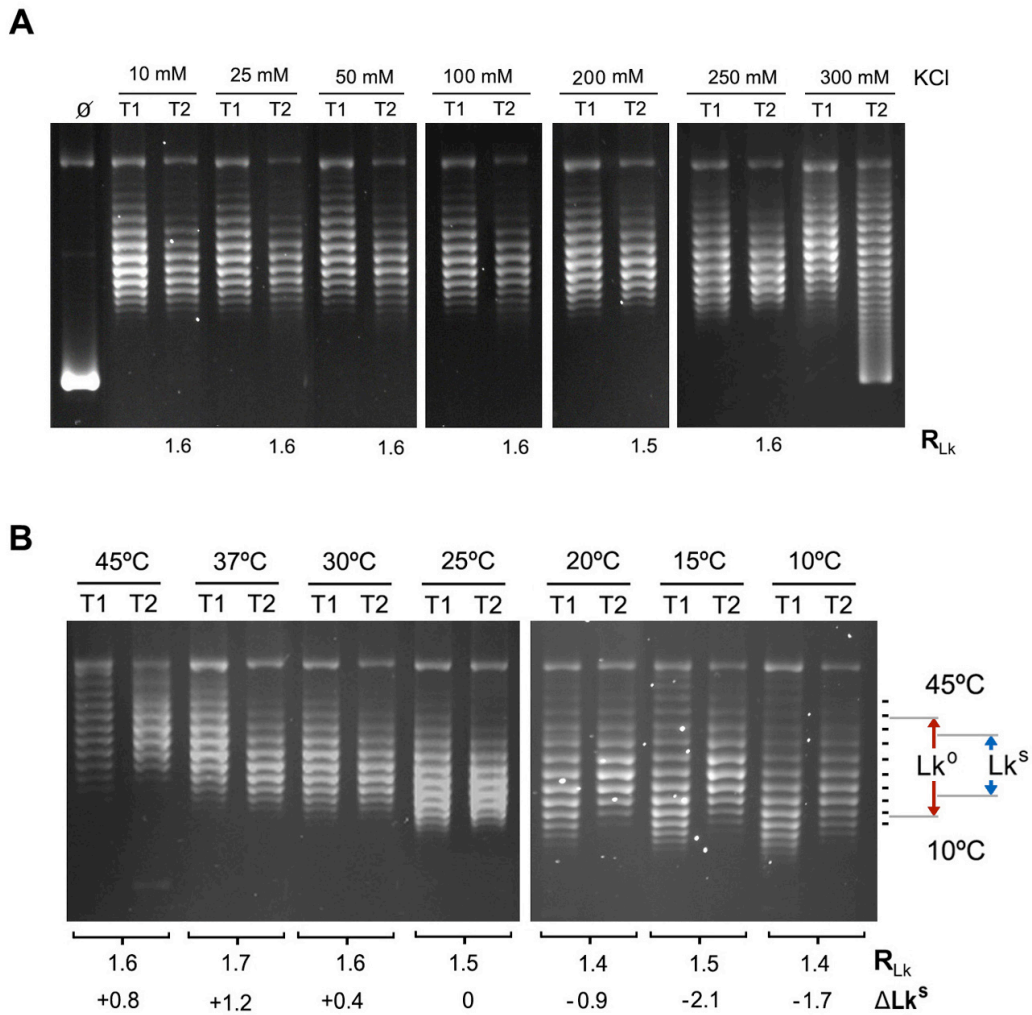


Figure S1. Simplification of equilibrium Lk distributions in different reaction conditions. (A) Effect of salt concentration (KCl) on Lk distributions produced by *vaccinia virus* topoisomerase I (T1) and *S. cerevisiae* topoisomerase II (T2). Reactions containing a negatively supercoiled 7.9-kb plasmid (\emptyset) and T1 or T2 (E:DNA molar ratio 0.5:1) were done at 37°C during 30 min. R_{Lk} values ($\langle Lk^2 \rangle_{T1} / \langle Lk^2 \rangle_{T2}$) calculated for each salt concentration are indicated. (B) Effect of temperature (°C) on Lk distributions produced by T1 and T2. Reactions containing a negatively supercoiled 7.9-kb plasmid (\emptyset) and T1 or T2 (E:DNA molar ratio 0.5:1, 150 mM KCl) were done at the indicated temperature during 30 min. R_{Lk} values and ΔLk^S values produced at each temperature are indicated. The range of thermal changes of Lk^0 and Lk^S are compared in the right (from 10°C to 45°C). General reaction settings, DNA electrophoresis and analysis of Lk distributions were conducted as described in the methods.

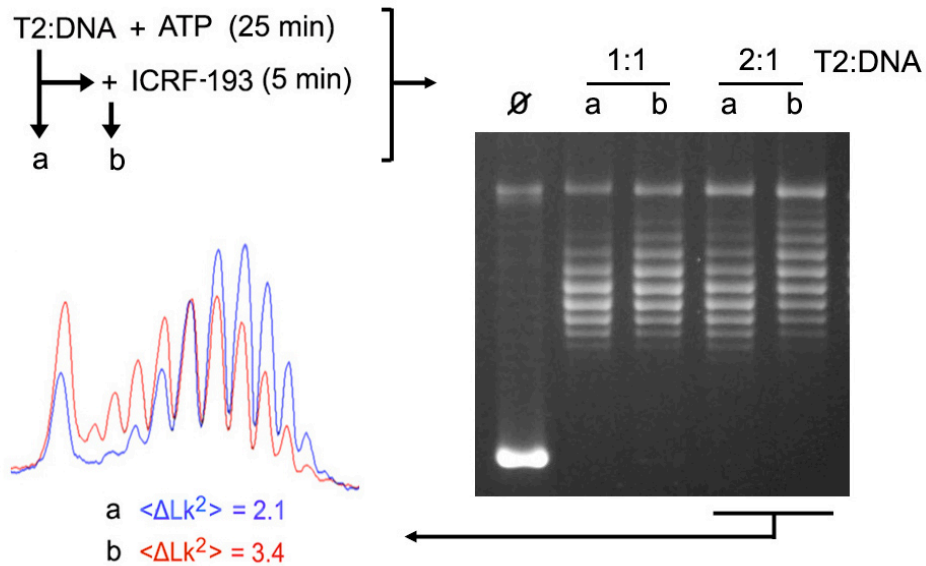


Figure S2. Widening of simplified Lk distributions when T-segment backtracking is precluded by locking the N-gate with ICRF-193. A 7.9 kb DNA supercoiled plasmid (\emptyset) was incubated with T2 (T2:DNA molar ratios 1:1 and 2:1) and ATP (0.1 mM) at 30°C. After 25 min, one half of each reaction was sampled (lane a) and ICRF-193 (100 μ M) was added to the other half for 5 more min (lane b). Gel plots compare the variance of Lk distributions ($\langle \Delta Lk^2 \rangle$) produced before and after the addition of ICRF-193 at the T2:DNA molar ratio 2:1. Reaction settings, gel electrophoresis and analyses of Lk populations were as described in the methods.

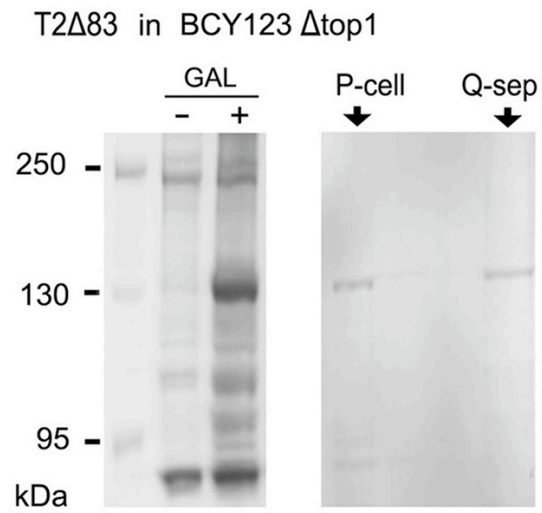


Figure S3. Overproduction of T2Δ83 in yeast cells. Left, *S. cerevisiae* BCY123-Δtop1 cells were transformed with pGALT2Δ83HMK-His and expression of the T2Δ83 gene construct under the galactose-inducible promoter pGAL1 produced the expected 130 kDa protein. Right, T2Δ83 was purified following the same procedure described for T2. The coomassie stained gel shows pooled fractions containing T2Δ83 after its elution from P-cell and Q-sepharose columns.

Resum breu del tercer article

La topoisomerasa II, en lloc de la topoisomerasa I, és la principal relaxasa de l'ADN nucleosomal

Aquest article recull el primer estudi de l'activitat de les topoisomerases eucariòtiques I i II sobre cromatina, el substrat natural d'aquests enzims. Si bé les topoisomerases I i II eliminen eficientment la tensió helicoidal en molècules d'ADN nu, aquesta activitat no ha estat mai examinada a l'ADN nucleosomal.

En aquest treball s'han obtingut minicromosomes circulars de llevat amb tensió helicoidal (+) i han estat incubats amb els dos tipus de topoisomerases. Es demostra que la densitat superhelicoidal de l'ADN *in vivo* pot arribar a superar el valor de +0'04 sense desplaçament de les histones, ja que al relaxar l'ADN es recupera la densitat superhelicoidal fisiològica de l'ADN nucleosomal (-0'05). En contrast amb el que s'observa a l'ADN nu, la topoisomerasa II relaxa l'ADN nucleosomal més després que la topoisomerasa I. El mateix efecte dominant de la topoisomerasa II passa en extractes cel·lulars que contenen els nivells fisiològics de topoisomerases I i II.

Per explicar els resultats, es proposa que el mecanisme de la topoisomerasa I de lliure rotació d'ADN no és eficient en la cromatina on es dificulta la difusió de *twist*. En canvi, el mecanisme de la topoisomerasa II d'inversió de creuaments es afavorit a la cromatina on es facilita la juxtaposició de l'ADN. Per tant, la topoisomerasa II és la principal relaxasa de l'ADN a les fibres de cromatina, mentre que la topoisomerasa I ajudaria allà on l'estructura de la cromatina no afavoreix la juxtaposició de segments de l'ADN però permet la difusió de *twist*.

Tercer article

Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA

Javier Salceda, Xavier Fernández and Joaquim Roca*

Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Barcelona, Spain

Eukaryotic topoisomerases I and II efficiently remove helical tension in naked DNA molecules. However, this activity has not been examined in nucleosomal DNA, their natural substrate. Here, we obtained yeast minichromosomes holding DNA under (+) helical tension, and incubated them with topoisomerases. We show that DNA supercoiling density can rise above +0.04 without displacement of the histones and that the typical nucleosome topology is restored upon DNA relaxation. However, in contrast to what is observed in naked DNA, topoisomerase II relaxes nucleosomal DNA much faster than topoisomerase I. The same effect occurs in cell extracts containing physiological dosages of topoisomerase I and II. Apparently, the DNA strand-rotation mechanism of topoisomerase I does not efficiently relax chromatin, which imposes barriers for DNA twist diffusion. Conversely, the DNA cross-inversion mechanism of topoisomerase II is facilitated in chromatin, which favors the juxtaposition of DNA segments. We conclude that topoisomerase II is the main modulator of DNA topology in chromatin fibers. The nonessential topoisomerase I then assists DNA relaxation where chromatin structure impairs DNA juxtaposition but allows twist diffusion.

The EMBO Journal advance online publication, 18 May 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7601142

Subject Categories: chromatin & transcription; genome stability & dynamics

Keywords: chromatin dynamics; DNA transcription; DNA twist; DNA writhing; nucleosome dynamics

Introduction

Helical tension in double-stranded DNA occurs during most chromosomal transactions. During DNA transcription, the template rotates relative to RNA polymerase, causing overwinding ahead of the traversing complex and unwinding behind it. Similarly, rotation of the duplex entering a replication complex overwinds DNA ahead of replication forks. Chromatin assembly and remodeling also induce changes of helical tension, as nucleosomes constrain DNA supercoils. The scarcity of DNA free-ends inside the cell precludes simple winding to dissipate helical stress. The enzymes responsible for resolving this problem are the ubiquitous DNA topo-

isomerases, which produce temporary single- or double-strand DNA breaks (reviewed in Champoux, 2001; Wang, 2002).

Eukaryotic cells have two classes of topoisomerases, type-1B and type-2, to remove helical tension from DNA. The type-1B, including the eukaryotic topo I (encoded by *TOP1*) and poxvirus topo I, use an active-site tyrosine as a nucleophile to cleave one strand of duplex DNA, generating a covalent 3'-phosphotyrosyl bond. This reaction leaves a 5'-hydroxyl DNA end that can rotate in either direction around the uncleaved strand, allowing relaxation of (+) and (–) helical stress. In the rejoining reaction, the 5'-hydroxyl group acts as a nucleophile to attack the 3'-phosphotyrosyl linkage and restores the continuity of the double helix (Stewart *et al.*, 1998; Krogh and Shuman, 2000). As this 'strand rotation' mechanism of type-1B topoisomerases functions without energetic cofactor, only DNA torque and friction drive one or several integral rotations of the duplex (Koster *et al.*, 2005). The type-2 topoisomerases, that is, the eukaryotic topo II (encoded by *TOP2*), are functional homodimers that use ATP to transport one DNA duplex through a transient double-strand break in another duplex (Wang, 1998). The gated duplex, termed G-segment, is cleaved with a four-base stagger generating a 5'-phosphotyrosyl bond with each dimer subunit of the enzyme. The transported duplex, termed T-segment, enters one side the dimer interface, crosses the transiently gated G-segment, and exits the topoisomerase through the opposite side (Roca *et al.*, 1996). This 'cross-inversion' mechanism allows topo II to remove (+) and (–) DNA supercoils, as well as knot-unknot or catenate-decatenate DNA molecules, depending on the intra- or intermolecular location of the G- and T-segments.

Despite the advances in understanding the DNA relaxation mechanism of eukaryotic topoisomerases I and II, their relative contributions to the supercoiling of intracellular DNA remain unclear. Topo I concentrates in the nucleolus (Muller *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 1988) and in highly transcribed regions (Fleischmann *et al.*, 1984; Mao *et al.*, 2002), whereas topo II is more evenly distributed throughout the interphase nucleus (Gasser *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 2002). These observations had supported a general view of topo I as the relaxase of helical tension generated during transcription and other DNA-tracking processes, and of topo II as devoted to unlinking replicated DNA duplexes and preparing chromosomes for segregation (Holm *et al.*, 1985; Uemura *et al.*, 1987; Adachi *et al.*, 1991). However, numerous observations argue against this simple partition of roles and indicate that topo II participates also in DNA relaxation tasks. Although topo I is required during development in higher eukaryotes (Zhang *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002), it is dispensable for cell viability in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* (Uemura and Yanagida, 1984). In these cells, topo II relaxes DNA supercoils in the absence of topo I (Saavedra and Huberman, 1986; Brill and Sternglanz, 1988; Giaever and Wang, 1988). Accordingly,

*Corresponding author. Institut de Biologia Molecular de Barcelona, CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain. Tel.: 34 934 006 178; Fax: 34 932 045 904; E-mail: jrbbmc@cid.csic.es

Received: 21 February 2006; accepted: 18 April 2006

DNA replication can proceed in yeast cells as long as one of the two topoisomerases is active (Kim and Wang, 1989b). In addition, inactivation of either topo I or topo II does not significantly affect DNA transcription, whereas inactivation of both enzymes markedly reduces rRNA synthesis (Schultz *et al*, 1992) and, to a lesser extent, mRNA synthesis (Cavalli *et al*, 1996; Collins *et al*, 2001). Finally, yeast $\Delta top1 top2$ -ts double mutants, but not single mutants, show mitotic hyper-recombination (Christman *et al*, 1988), increased excision of rDNA as extrachromosomal rings (Kim and Wang, 1989a), and multimerization of circular minichromosomes (Trigueros and Roca, 2001).

The apparently exchangeable activities of topoisomerases I and II indicate that either enzyme can relax the helical tension of intracellular DNA. Yet, a deeper analysis of their normal contributions is impaired by the complexity of *in vivo* experimental systems and the multiple functions in which they are involved. So far, the catalytic efficiency of eukaryotic topoisomerases has been examined *in vitro* on naked DNA molecules, by using supercoiled plasmids and DNA single-molecule assemblies (Charvin *et al*, 2003; Koster *et al*, 2005). However, their activities on nucleosomal DNA, their natural substrate, have not been contrasted. Here, we report the first comparative analysis of the extent to which topoisomerases I and II relax (+) supercoiled DNA in native yeast minichromosomes. We show that histones do not dissociate from DNA under high (+) helical tension and that DNA relaxation restores the typical nucleosome topology. In contrast to what is observed with naked DNA, however, topoisomerase II relaxes nucleosomal DNA more efficiently than topoisomerase I. This finding highlights a differential effect of chromatin hydrodynamics on the DNA strand-passage mechanisms of topoisomerases I and II. Functional implications to the supercoiling of intracellular DNA are discussed.

Results

High DNA supercoiling density can be generated in eukaryotic chromatin

DNA relaxation by topoisomerases I and II prevent the accumulation of helical tension in circular minichromosomes in *TOP1 TOP2* yeast cells. However, when *Escherichia coli* topo I, a type-1A topoisomerase that relaxes (–) supercoils by acting on unwound regions of the duplex, is expressed in a $\Delta top1 top2$ -ts mutant, (+) supercoils accumulate upon thermal inactivation of topo II (Giaever and Wang, 1988). We used this unbalanced relaxation of supercoils to determine a threshold of (+) DNA helical tension that transcription or other DNA-tracking processes can generate *in vivo* (Liu and Wang, 1987). We transformed the strain JCW28 ($\Delta top1 top2$ -4) with plasmid pJRW13, a vector for constitutive expression of *E. coli* topo I; and with plasmid Yp4.4, our reporter minichromosome. The cells were cultured at 26°C (permissive temperature) and shifted to 35°C to inactivate topo II. Native yeast minichromosomes were extracted at different times, and their DNA was displayed by two-dimensional gel electrophoresis to examine the linking number (*Lk*) of the Yp4.4 circles (Figure 1).

By the electrophoresis conditions described in Figure 1A, gel bands corresponding to *Lk* topoisomers of Yp4.4 are distributed in an arch, in which higher *Lk* values migrate

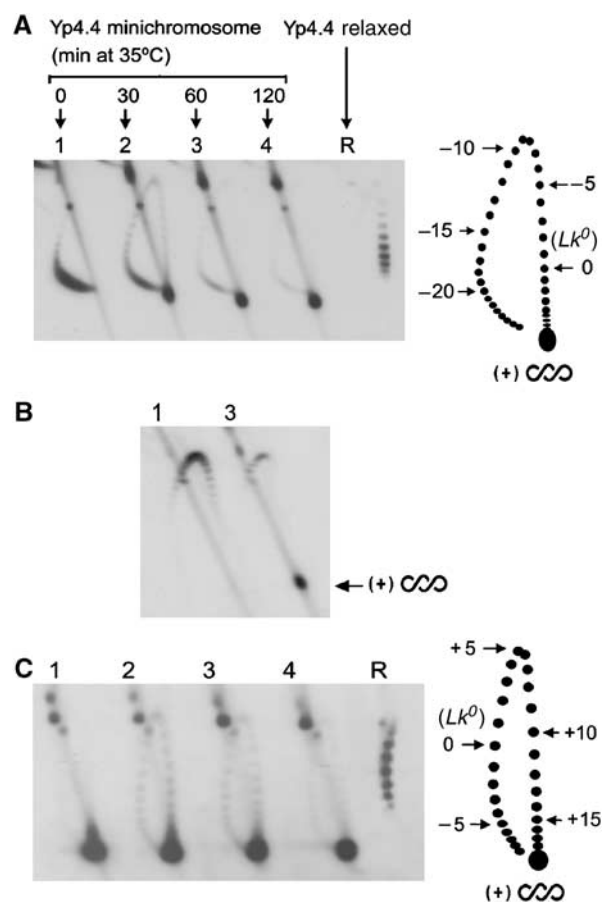


Figure 1 DNA supercoiling density in yeast circular minichromosomes. (A) Lanes 1–4, DNA topology in Yp4.4 minichromosomes extracted from JCW28 cells that expressed of *E. coli* topo I, and were then shifted to 35°C to inactivate topo II for the indicated times (min). Lane R, Yp4.4 plasmid relaxed *in vitro* at 35°C with topoisomerase I. Two-dimensional electrophoresis of DNA was carried at 25°C in a 0.8% agarose gel in TBE buffer at 50 V for 14 h in the first dimension (top to bottom), and TBE buffer plus 2 μg/ml of chloroquine, at 60 V for 8 h in the second dimension (left to right). The gel-blot was probed for Yp4.4. The scheme depicts gel migrations of Yp4.4 topoisomers, indicating ΔLk values relative to relaxed DNA. (B) DNA samples (lanes 1 and 3 as in A) analyzed like above but in TBE buffer plus 3 μg/ml of chloroquine in the first dimension, and TBE buffer plus 15 μg/ml of chloroquine in the second dimension. (C) DNA samples (all as in A) analyzed by two-dimensional electrophoresis at 4°C in a 0.8% agarose gel in TBE buffer plus magnesium acetate 5 mM at 33 V for 40 h in the first dimension (top to bottom), and TBE buffer alone at 60 V for 4 h in the second dimension (left to right). The scheme depicts gel migrations of Yp4.4 topoisomers, indicating ΔLk values relative to relaxed DNA.

clockwise. Yp4.4 minichromosomes extracted from cells cultured at 26°C (lane 1) had linking number difference (ΔLk) near –22 relative to the Lk^0 position determined in the relaxed Yp4.4 plasmid (lane R). Since Lk^0 is about 420 (4414/10.5), the DNA supercoiling density (σ) in these minichromosomes is about –0.052 (–22/420). After thermal inactivation of topo II (lanes 2–4), increasing amounts of the Yp4.4 circles migrated toward one end of the topoisomer arch. An electrophoresis in the presence of high chloroquine concentration (Figure 1B) confirmed that these circles were positively supercoiled ($Lk > Lk^0$). To resolve their *Lk* distribution, we used electrophoresis at 4°C and in the presence of magnesium

ions in the first gel dimension (Panyutin *et al*, 1989; Xu and Bremer, 1997). These conditions decrease the writhe of (+) supercoiled DNA and, as a result, the migration of *Lk* topoisomers shifts counter-clockwise (Bednar *et al*, 1994; Rybenkov *et al*, 1997). Although we achieved the largest shift with the gel depicted in Figure 1C, the *Lk* distribution of (+) supercoiled circles remained unresolved. Relative to Lk^0 (lane R), these molecules had a ΔLk above +18, which translates into σ greater than +0.042 (18/420). Similar results were obtained for the yeast 2- μ m circle and other yeast circular minichromosomes, for which the *Lk* distribution of (+) supercoiled circles could not be resolved. Yet, since *E. coli* topo I had to act on unwound regions of the duplex to accumulate (+) helical tension, local values of σ *in vivo* must be substantially higher than +0.042. Thus far, this σ value establishes the helical tension against which DNA-tracking ensembles still are able to move along eukaryotic chromatin.

Nucleosomal organization is preserved in DNA under positive helical tension

To examine whether DNA supercoiling generated *in vivo* was constrained by chromatin, we incubated native yeast minichromosomes, for which $\sigma \sim -0.05$ and for which $\sigma > +0.04$, with catalytic amounts of type-1B topoisomerase (*S. cerevisiae* topo I or vaccinia virus topo I) and type-2 topoisomerase (*S. cerevisiae* topo II). All reactions contained also an excess of a (-) supercoiled plasmid, which had been added during minichromosome extraction. This plasmid served as internal control to calibrate the DNA relaxation activity of the topoisomerases, as well as to quench nonspecific protein-DNA interactions. DNA topology in minichromosomes and their accompanying control plasmids was then analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (Figure 2A). Incubation of minichromosomes for which $\sigma \sim -0.05$ (lane 1) with topo I (lane 2) or topo II (lane 3) did not significantly change their ΔLk value and merely induced slight broadening of the *Lk* distributions. In the same mixtures, however, the control plasmid was fully relaxed by the topoisomerases. Therefore, the ΔLk of these minichromosomes reflects the (-) supercoils constrained by typical chromatin structure, in which each nucleosome stabilizes roughly one (-) DNA supercoil. Incubation of Yp4.4 minichromosomes for which $\sigma > +0.04$ (lane 5) with topo I (lane 6) and topo II (lane 7) produced *Lk* distributions that, surprisingly, were nearly identical to those constrained by typical chromatin (compare lanes 2 and 3, with lanes 6 and 7). In the same reactions, the control plasmid had no constrained supercoils and was again fully relaxed by the topoisomerases. This complete recovery of (-) supercoils was observed in different yeast circular minichromosomes, was independent of the topoisomerase used, and persisted even when relaxations were carried out in the presence of a large excess of control plasmid (Figure 2B).

To corroborate the recovery of the typical chromatin structure upon relaxation of (+) supercoiled minichromosomes, we used micrococcal nuclease to footprint nucleosome positions along the *TRP1 ARS1* region of Yp4.4 (Figure 3). Minichromosomes for which $\sigma \sim -0.05$ (B) showed preferential DNA cleavage sites that were consistent with the nucleosome positions determined by Thoma *et al*

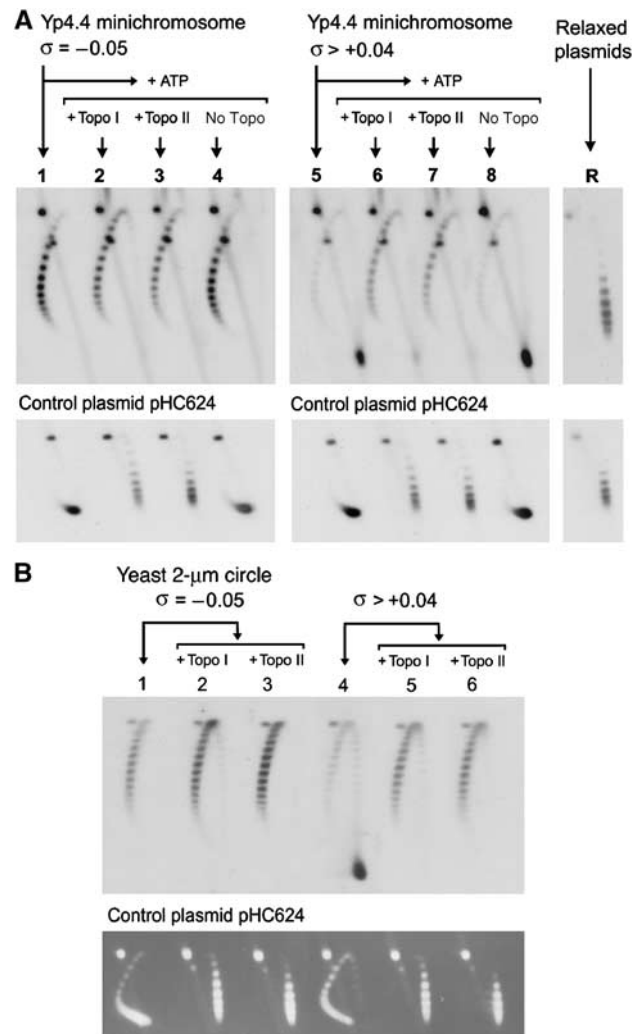


Figure 2 Relaxation of yeast minichromosomes by DNA topoisomerases. (A) Yeast minichromosomes, for which $\sigma \sim -0.05$ (lane 1) and for which $\sigma > +0.04$ (lane 5) were incubated at 30°C for 30 min with catalytic amounts of vaccinia virus topo I (lanes 2 and 6), *S. cerevisiae* topo II (lanes 3 and 7) or no enzyme (7 and 8). Plasmids Yp4.4 and pHC624 were also relaxed *in vitro* (lane R). Two-dimensional electrophoresis of DNA was carried out at 25°C in a 0.8% agarose gel in TBE buffer plus 0.6 μ g/ml of chloroquine at 50 V for 14 h in the first dimension (top to bottom), and TBE buffer plus 3 μ g/ml of chloroquine, at 60 V for 8 h in the second dimension (left to right). Gel-blots were probed for Yp4.4 (upper panel) and for the control plasmid pHC624 (lower panel). (B) Yeast minichromosomes, for which $\sigma \sim -0.05$ (lane 1) and for which $\sigma > +0.04$ (lane 4) were supplemented with an excess of control plasmid pHC624 (1 mg/ml), and incubated with catalytic amounts of *S. cerevisiae* topo I (lanes 2 and 5) or *S. cerevisiae* topo II (lanes 3 and 6) at 30°C for 30 min. After two-dimensional electrophoresis of DNA, gels were blotted and probed for the yeast 2- μ m circle (upper panel) or ethidium stained to visualize pHC624 (lower panel).

(1984). Minichromosomes for which $\sigma > +0.04$ (C) showed few additional cleavage sites, which indicated an alteration of chromatin structure. Following their incubation with topo I (D) or topo II (E), however, such additional sites disappeared and the footprints became nearly identical to those of the typical chromatin (B). Therefore, when intracellular DNA undergoes (+) helical tension, the bulk of histones seem to remain bound to DNA and conformational changes of chromatin apparently revert by DNA relaxation.

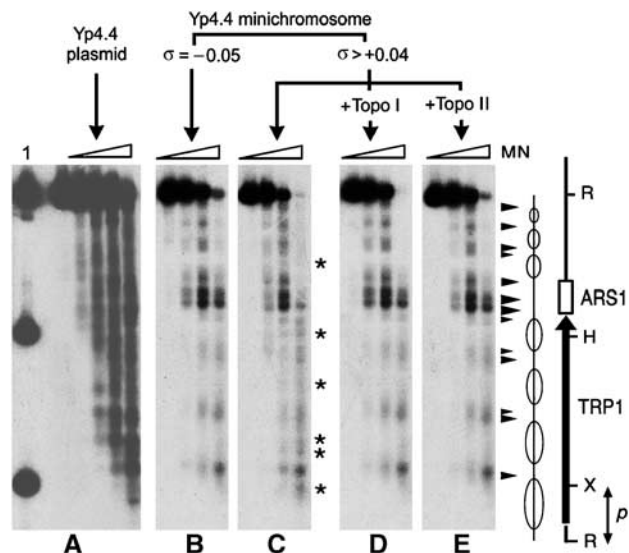


Figure 3 Chromatin structure upon relaxation of yeast minichromosomes. Preferential DNA cleavage sites by micrococcal nuclease (MN) digestion along the *TRP1-ARS1* region of Yp4.4 were mapped on the following substrates: Yp4.4 plasmid (A), Yp4.4 minichromosome for which $\sigma \sim -0.05$ (B), Yp4.4 minichromosomes for which $\sigma > +0.04$ (C), and after their relaxation by *S. cerevisiae* topo I (D) or *S. cerevisiae* topo II (E). Digested DNA samples were restricted with endonuclease *EcoRI*, separated on a 1% agarose gel, blotted and probed with the radio-labeled 186 bp *EcoRI-XbaI TRP1* fragment (*p*). Lane 1, *XbaI* and *HindIII* site markers. Arrowheads denote main DNA cleavage sites visible in (B, C, D, E). Asterisks denote additional DNA cleavage sites visible in (C). The scheme depicts nucleosome positions determined by Thoma *et al* (1984) along the *TRP1-ARS1* yeast DNA segment.

Topoisomerase II relaxes supercoiled chromatin more efficiently than topoisomerase I

In the above experiments, we had noticed that more type-1B than type-2 topoisomerase activity was required to completely relax the yeast minichromosomes. Hence, control plasmids added during minichromosome extraction allowed us to normalize the catalytic amount of topo I and of topo II needed to relax naked DNA at comparable rates and thereby compare their relaxation kinetics on supercoiled chromatin. In these conditions (Figure 4A), (+) supercoiled minichromosomes were relaxed by topo II faster than by topo I. The same result was found when comparing topo II with vaccinia virus topo I. This kinetic divergence was also observed in the yeast 2- μ m circle and other yeast minichromosomes, and it persisted in a broad range of ionic conditions: KCl or NaCl from 80 to 200 mM, and MgCl₂ from 2 to 12 mM. Therefore, the difference in the efficiency with which type-1B than type-2 topoisomerases relax supercoiled chromatin was probably not attributable to DNA sequences or reaction conditions.

As control plasmids were (-) supercoiled and minichromosomes were (+) supercoiled, we also ruled out an effect of DNA supercoiling handedness (Figure 4B). We deproteinized (+) supercoiled Yp4.4 minichromosomes to obtain (+) supercoiled Yp4.4 plasmid. This DNA was mixed with the (-) supercoiled pHC624 and adjusted to the reaction conditions used to relax minichromosomes. We then compared the relaxation rates of (-) supercoiled DNA, (+) supercoiled DNA, and (+) supercoiled chromatin by topoisomerase I and II. Topo I (lanes 1-5) and topo II (lanes 6-10) did not show any significant bias in relaxing (+) and (-)

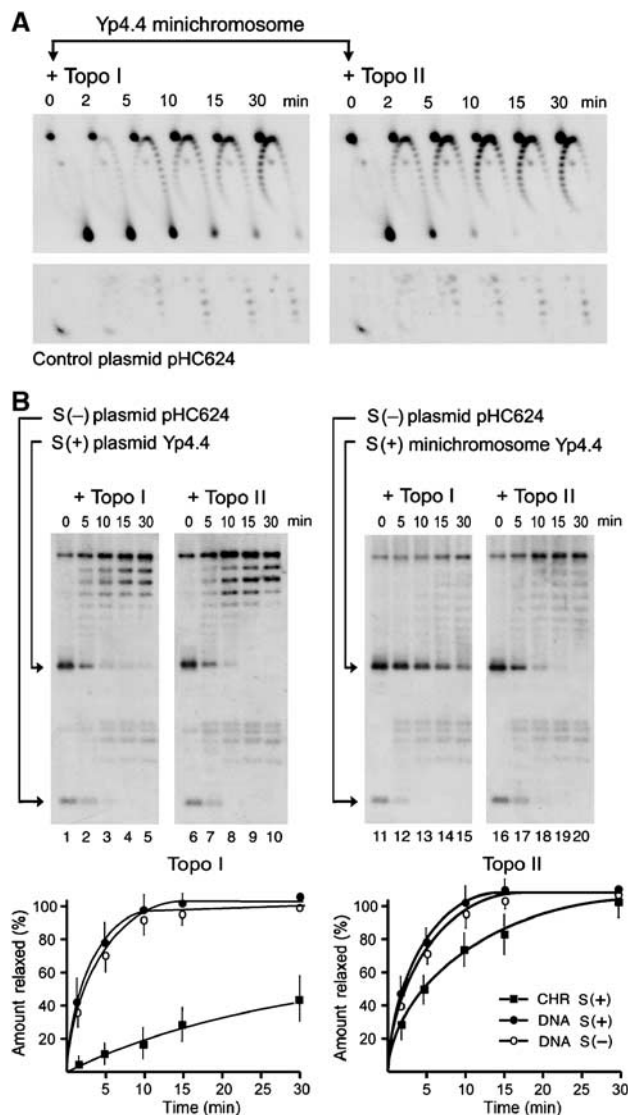


Figure 4 Relaxation kinetics of supercoiled chromatin. (A) Positively supercoiled Yp4.4 minichromosomes and their accompanying control plasmid pHC624 were incubated with catalytic amounts of topoisomerase I or topoisomerase II (as indicated). Reactions were quenched at the indicated periods (min). Following DNA electrophoresis, the gel-blots were probed for Yp4.4 (up) and for pHC624 (down). Note that topoisomerase I and II activities were adjusted to relax the control plasmid at comparable rates. (B) Mixtures containing (+) supercoiled Yp4.4 plasmid plus (-) supercoiled pHC624 plasmid, or containing (+) supercoiled Yp4.4 minichromosome plus (-) supercoiled pHC624 plasmid were relaxed with catalytic amounts of topoisomerase I or topoisomerase II (as indicated). Reactions were quenched at the indicated periods (min). DNA electrophoresis was carried at 25°C in a 0.9% agarose gel in TBE buffer at 40V for 14 h. Gel-blots were probed for Yp4.4 plus pHC624. DNA relaxation rates, by topoisomerases I and II, for supercoiled minichromosomes (CHR S(+)) and supercoiled plasmids (DNA S(-), DNA S(+)) were determined by measuring the gain of relaxed topoisomers excluding nicked ones. Graphs represent the average of four experiments with error bars indicating s.d.'s from the mean.

supercoiled plasmids. This result was consistent with that observed in previous studies on naked DNA (Charvin *et al*, 2003; Koster *et al*, 2005). However, in the same catalytic conditions, topo I relaxed the supercoiled minichromosomes (lanes 11-15) about 15 times slower than the control plasmids. This difference markedly contrasted with that of topo

II, which relaxed the minichromosomes (lanes 16–20) only 1.5 times slower than the plasmids.

Intracellular topoisomerase II is the main relaxase of supercoils in nucleosomal DNA

To assess the biological relevance of the high efficiency with which topo II relaxes chromatin, we measured the specific DNA relaxation activities of intracellular topoisomerases I and II in yeast. We incubated (+) supercoiled minichromosomes and control plasmids with serial dilutions of extracts from $\Delta top1 TOP2$ and $TOP1 TOP2$ yeast cells, and determined DNA relaxation rates in the absence or presence of ATP (Figure 5A). In the absence of ATP, topo I is the only cellular enzyme to relax supercoiled DNA efficiently. Accordingly, extracts from $\Delta top1 TOP2$ cells showed no significant ATP-independent DNA relaxase activity; whereas, in similar conditions, extracts from $TOP1 TOP2$ cells relaxed the control plasmids and to a lesser extent the minichromosomes. In the presence of ATP, however, the minichromosomes and the control plasmids were relaxed with comparable efficiency by the $\Delta top1 TOP2$ yeast extracts,

as well as by the $TOP1 TOP2$ yeast extracts. This ATP-dependent DNA relaxase is topo II; thus, no other relaxase activity is detected in extracts from $\Delta top1 TOP2$ cells containing the topo II inhibitor ICRF-193, or extracts from $\Delta top1 top2-ts$ cells inactivated at 35°C. Therefore, ATP-independent and ATP-dependent DNA relaxation rates allowed us to calculate relative specific activities of yeast topoisomerases I and II within their physiological dosages (Figure 5B). The results indicated that yeast topo I activity relaxed naked DNA twice as fast as that of topo II. However, yeast topo II activity relaxed chromatin five times as fast as that of topo I. These figures were consistent with the relaxation rates determined with the purified enzymes, in which topo II relaxed chromatin about 10-fold faster than topo I.

Discussion

We have shown that DNA superhelical density can rise above +0.04 in eukaryotic chromatin without displacement of the

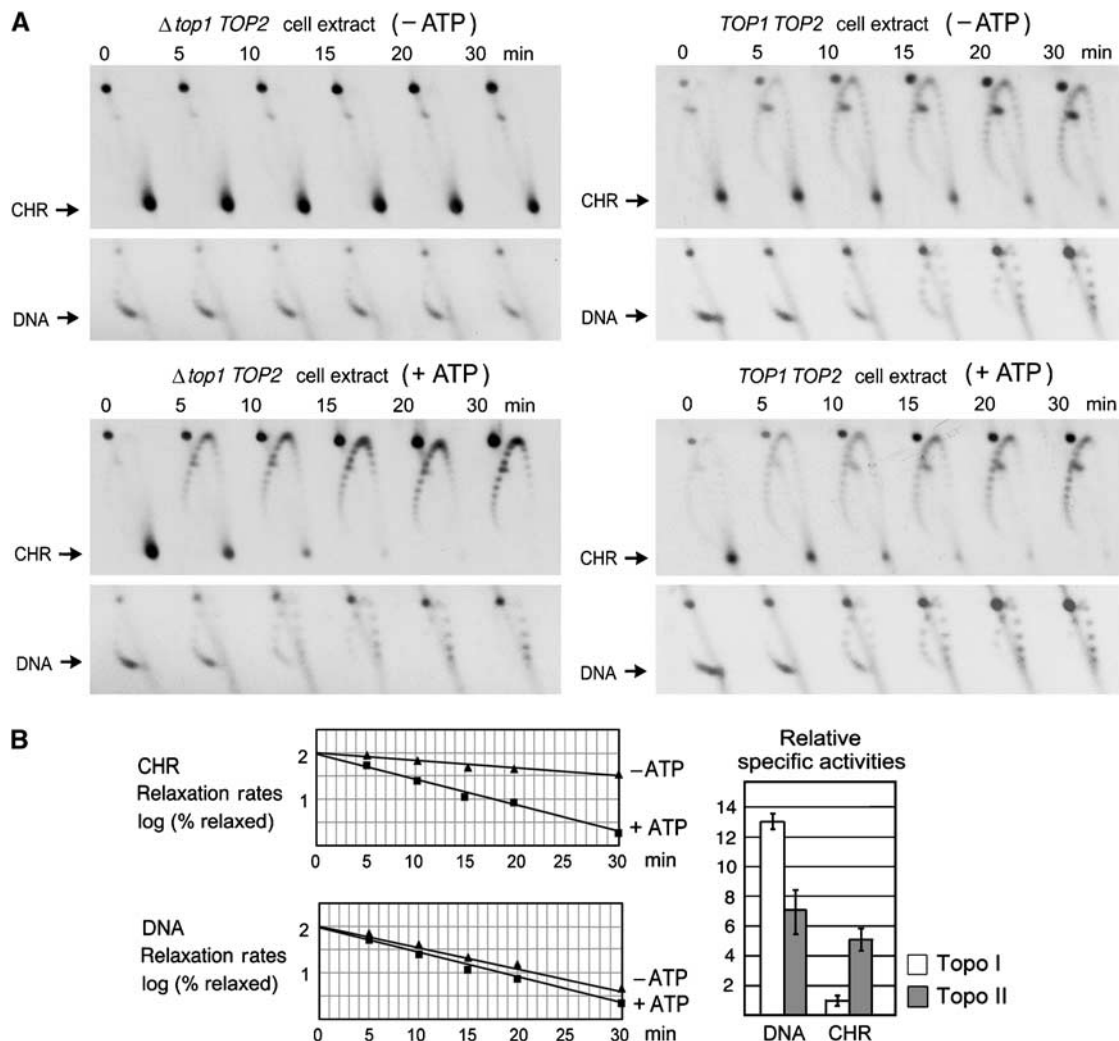


Figure 5 Relative relaxase activities of intracellular topoisomerases I and II. (A) Positively supercoiled Yp4.4 minichromosomes (CHR) and their accompanying control plasmid pHC624 (DNA) were supplemented with extracts from $\Delta top1 TOP2$ or $TOP1 TOP2$ yeast cells, as indicated. Incubations proceeded at 30°C in the absence or presence of ATP, and were quenched at the indicated time periods (min). Two-dimensional electrophoresis of DNA was as in Figure 2A and the gel blots were probed for Yp4.4 and pHC624. (B) Right, rates of chromatin and DNA relaxation, in the presence and the absence of ATP, determined by measuring the gain of relaxed topoisomers excluding nicked ones. Left, relative specific activities of topo I (ATP-independent rate) and topo II (ATP-dependent minus ATP-independent rate). Error bars denote the s.d. from the mean of five different experiments.

histones or disruption of the nucleosome organization. This σ value establishes an helical tension below which DNA-tracking ensembles still operate in eukaryotic chromatin. We have also shown that, in contrast to what occurs in naked DNA, eukaryotic topo II is more efficient than topo I in relaxing nucleosomal DNA. This divergence has biological relevance, thus we found that topo II is the dominant relaxase of nucleosomal DNA in cell extracts containing physiological dosages of topoisomerase I and II. These findings reveal novel interactions between DNA supercoiling, chromatin dynamics and the functions of topoisomerases I and II.

The first question raised by our results is how DNA can preserve its nucleosome organization under (+) helical stress. Lee and Garrard (1991) had reported the presence of bound histones in (+) supercoiled circles extracted from yeast. We found that, indeed, the bulk of histones may remain bound to (+) supercoiled DNA, and that the native nucleosome organization is recovered by relaxation alone. Although histones can form nucleosome-like structures in (+) supercoiled DNA *in vitro* (Clark and Felsenfeld, 1991), we do not know whether such structures are comparable to those of the supercoiled minichromosomes generated *in vivo*. In canon nucleosomes, the core DNA (~145 bp) has positive twist ($\Delta Tw_C \sim +0.8$) and negative writhe ($\Delta Wr_C \sim -1.8$), whereas linker DNA segments (30–90 bp) do not bear significant twist (ΔTw_L) or writhe (ΔWr_L) deformations. As $\Delta Lk = \Delta Wr + \Delta Tw$, a typical nucleosome stabilizes DNA helical tension equivalent to about $-1 \Delta Lk$. Given that a nucleosome-like organization is preserved at $\sigma > +0.04$, each nucleosome had to accommodate on average DNA deformations equivalent to $\sim +0.8 \Delta Lk$. Such deformations can hardly be confined to the linker regions. As $[\Delta Wr_C + \Delta Tw_C]$ is ~ -1 , $[\Delta Wr_L + \Delta Tw_L]$ would be $+1.8$! Probably, torsion energy alters also the conformation of the core DNA, by changing the phase of histone–DNA superhelical interactions (ΔTw_C), or the wrapping of DNA around the histone octamer (ΔWr_C).

Our results demonstrate that chromatin adapts to (+) helical tension with a conformation that reverts upon relaxation. On that basis, we modeled plausible conformations that could support σ values $> +0.04$ while preserving most native histone–DNA interactions (Figure 6). In model *a*, entry and exit DNA segments in each nucleosome flip to form a (+) instead of the typical (–) crossing, as proposed by Sivolob and Prunell (2003). This model, however, could hardly support σ values greater than $+0.05$. In model *b*, core DNA unwraps by roughly one turn in each nucleosome and then folds in left-handed plectoneme branches. In model *c*, further unwrapping of DNA is associated with unfolding of the histone octamer and a switch in the helical handedness of the histone (H3–H4)₂ tetramer, as proposed by Hamiche *et al* (1996). The presence of additional micrococcal nuclease cleavage sites in (+) supercoiled chromatin supports DNA unwrapping conformations *b* and *c*. However, a general model is difficult to assess experimentally. Intermediate states might occur, and individual nucleosomes may equilibrate differently according to their DNA sequences and histone modifications.

The second question raised by our results is why topo II relaxes chromatin more efficiently than topo I. This difference is unlikely to be related to DNA-binding hindrance. Both enzymes interact with DNA segments of comparable length (Figure 7A). If access to DNA were impaired by chromatin structure, one would expect topo II, which is larger and

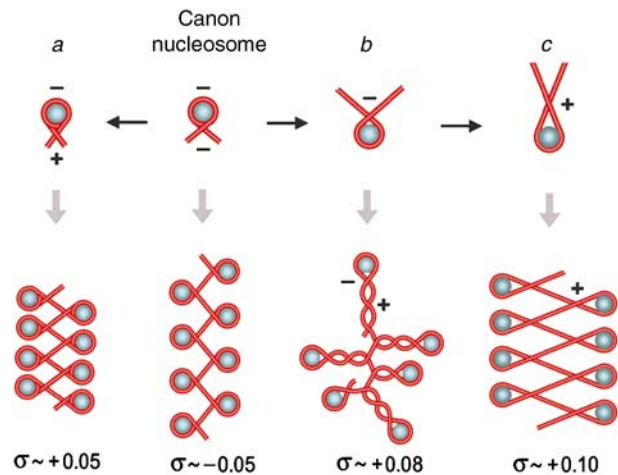


Figure 6 Plausible chromatin conformations that accommodate positive helical tension of DNA. The topology of DNA in the canon nucleosome and in models *a*, *b*, and *c* is explained in the text. To calculate approximate σ values supported in each model, the ratio of the change in writhe to the change in twist was fixed at $\sim 2.6:1$ in histone-free DNA regions (Boles *et al*, 1990). For σ over $+0.03$, the twist regime tends to saturate and deformation occurs mainly by the writhe regime (Koster *et al*, 2005). We then took ΔTw values no higher than $1-U/200$ bp and ΔWr values by averaging (–) and (+) crossings in several planar projections of a given conformation. For simplicity, we depicted histone octamers as spheres, although partial unfolding of octamers may occur in models *b* and *c*.

interacts with two DNA segments, to have more restrictions than topo I. The different efficiencies of topoisomerases I and II in relaxing nucleosomal DNA are more likely attributable to their mode of interaction and manipulation of DNA strands. In the first place, chromatin structure may differently affect their substrate availability. Torsional elasticity of chromatin could be smaller than for naked DNA, leading to a smaller driving torque and thus to a low activity of topo I. Conversely, chromatin might favor DNA transport activity of topo II by increasing the juxtaposition probability of DNA segments (Sun *et al*, 2005). Such increase may be significant in (+) supercoiled chromatin. Numerous (+) DNA crossings can occur if chromatin hydrodynamics deviates the normal partition between twist and writhe deformations of DNA (Boles *et al*, 1990). Moreover, as seen in Figure 6, many (+) DNA crossings may also happen to overcome twist saturation and residual wrapping of DNA around histone octamers. In the second place, chromatin structure may affect the efficiencies of topoisomerases I and II during their strand passage step. Topo I cleaves one DNA strand allowing the duplex to complete one or more rotations around the intact phosphodiester bond on the uncleaved strand. For naked DNA in free solution, axial rotation is fast, allowing the duplex to spin like a speedometer-cable. Only DNA bends increase the effective hydrodynamic volume of the duplex and, hence, the viscous drag against axial rotation (Nelson, 1999). However, in a nucleosomal DNA, axial rotation of the duplex comes up against friction barriers. Twist diffusion is delayed because the interaction of DNA with histone octamers converts chromatin into a bundle of DNA bends. Alternatively, rotation of entire nucleosomes implies large hydrodynamic volumes, especially when the angle between the entry and exit DNA segment in each nucleosome is small. Finally, other protein–DNA interactions or clashes may further increase viscous

friction and restrict twist diffusion. Therefore, when DNA is folded in chromatin, topo I must encounter kinetic limitations to complete axial rotations of the cleaved duplex. Conversely, the DNA cross-inversion mechanism of topo II only involves a short and unidirectional translocation of the T-segment across the G-segment (Roca, 2004). This ATP-dependent process might be barely perturbed by friction outside the enzyme–DNA complex. Hence, we envisage that the spatial arrangement and hydrodynamics of DNA in chromatin fibers affect the efficiencies of type-1B and type-2 topoisomerases, but in opposite ways (Figure 7B).

Further inference from the relaxation of chromatin by eukaryotic topoisomerases concerns the cleavage-religation equilibrium of DNA. Because transiently cleaved-DNA complexes can be converted into DNA lesions (Liu, 1989), the assignment of cellular functions of topo I and II must minimize the risk of genome damage. For topo II, ATP-driven conformational changes enforce a very transient DNA gating step (Roca, 2004). For topo I, however, cleavage-religation equilibrium is governed by DNA torque and friction (Koster *et al*, 2005). Then, the religation of DNA could be stalled owing to twist diffusion barriers imposed by chromatin. In

our experiments, however, we could not detect an increase of cleaved-DNA intermediates when topo I interacted with supercoiled chromatin. Hence, we augur that topo I–DNA friction might create an energy landscape that prevents non-productive releases of the cleaved strand when the duplex is unlikely to complete a full turn.

Given that nucleosomal DNA is an optimal substrate for relaxation by topoisomerase II, what is then the role of topoisomerase I? We believe that topo I contributes to DNA relaxation in chromatin regions where topo II is not proficient. As topo II activity depends on the juxtaposition probability of DNA segments (Roca and Wang, 1996), topo II will relax helical tension as long as there is substantial deformation of DNA by the writhe regime. In regions where the transcription rate is high, however, molecular crowding and DNA-pulling forces may preclude the local formation of supercoils. Helical tension would then deform DNA mostly by the twist regime, allowing topo I to be more efficient than topo II. This scheme is consistent with the preferential localization of topo I in highly transcribed regions (Fleischmann *et al*, 1984; Mao *et al*, 2002) and mainly in the nucleolus (Muller *et al*, 1985; Zhang *et al*, 1988), where topo I interacts directly with the RNA polymerase I holoenzyme (Christensen *et al* 2004). These interactions may induce topo I to function where full turn rotations of the duplex are fast, thereby increasing the overall efficiency of DNA relaxation and avoiding the stall of cleaved-DNA intermediates. Another scenario where topo I may be efficient is chromatin assembly. Either topo I or topo II can provide the relaxation activity required for replication-independent nucleosome assembly in budding yeast (Garinther and Schultz, 1997). Furthermore, nucleosome assembly in *Xenopus* egg extracts have suggested that in this system DNA relaxation is largely performed by topo I (Almouzni and Mechali, 1988). During chromatin assembly, histones are deposited on naked DNA and (+) helical tension rises locally to balance the (–) writhe of DNA in nucleosomes. Thus, global supercoiling density is never positive. Therefore, the initial conformation of this substrate is not equivalent to that of the (+) supercoiled chromatin ($\sigma > +0.04$) reported here. Hence, DNA relaxation by topo I may be efficient, especially in early stages of chromatin assembly when rotations of the duplex can be fast. Topo I, however, is dispensable for cell viability in budding and fission yeast (Uemura and Yanagida, 1984; Saavedra and Huberman, 1986; Brill and Sternglanz, 1988; Giaever and Wang, 1988). This observation was surprising because no other cellular topoisomerase uses a DNA strand-rotation mechanism. Hence, topo I, rather than topo II, was considered the proficient relaxase of DNA in eukaryotic cells. Now, our results clarify why topo II suffices to modulate supercoiling of DNA in the absence of topo I. The molar amount of topo I and topo II in *S. cerevisiae* had been estimated to about 3000 and 5000 copies per cell, respectively (Ghaemmaghami *et al*, 2003). These quantities are consistent with our results showing that the topo II activity relaxing nucleosomal DNA in yeast extracts dominates by a factor of five that of topo I. Therefore, topo II is not only more efficient than topo I in relaxing chromatin, but probably accounts for the bulk of this cellular activity.

Numerous observations had denoted that topo II might have cellular roles other than unlinking newly replicated DNA strands. For example, Topo II alleviates transcription repression by chromatin (Mondal and Parvin, 2001) and affects

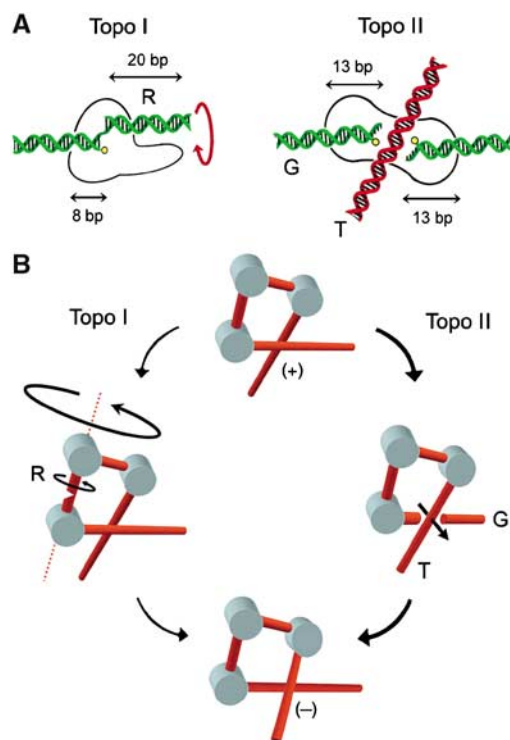


Figure 7 Comparative mechanics of topoisomerases I and II in relaxing nucleosomal DNA. (A) DNA segment lengths required for the function of eukaryotic topoisomerases are represented according to structural and biochemical data. Topo I clamps around 8 bp of DNA up to the cleavage site. Then, about 20 bp of duplex (R) should be free to rotate without colliding with the protruding domains of the enzyme (Stewart *et al*, 1998). Topo II interacts with the gated duplex (G) along 26 bp of DNA. The transported duplex (T) must cross the 50-Å wide dimer interface of the enzyme (Fass *et al*, 1999). (B) In nucleosomal DNA, bending of the duplex slows twist diffusion, and rotation of entire nucleosomes implies high viscous friction. Consequently, driving torque is small and a duplex cleaved by topo I comes up against kinetic limitations to complete axial rotations. Conversely, chromatin folding may favor the juxtaposition of DNA segments. Then, the cross-inversion mechanism of topo II involves a short translocation of the T-segment across the G-segment.

nucleosome positioning (Germe and Hyrien, 2005). Topo II, rather than topo I, cleaves DNA ahead of replication forks (Holm *et al*, 1989; D'Arpa *et al*, 1990). Topo II, rather than topo I, is active in post replicative spermatogenic cells that undergo the nucleo-histone nucleo-protamine transition (Roca and Mezquita, 1989). The β -isoform of topo II found in higher eukaryotes is not required for cell proliferation, but involved in the regulation of cell fate (Lyu and Wang, 2003). The topological interconversions of DNA underlying these molecular processes are largely unknown. Our results suggest that, in addition to relaxing DNA supercoils, topo II can be an efficient modulator of chromatin structure by altering the topology of nucleosomal DNA. This role of topo II may be as relevant for the topology of cellular DNA, as that of other type-2 topoisomerases in bacterial cells. In most bacteria, both topo IV and DNA gyrase modulate the supercoiling of DNA (Champoux, 2001; Wang, 2002). Remarkably, bacteria do not have a type-1B topoisomerase to assist the relaxation of (+) helical tension under the twist regime. However, unlike topo II, bacterial gyrase enforces the juxtaposition of DNA segments to invert (+) crossings. In light of our results, we anticipate that eukaryotic chromatin may configure optimal DNA crossings to be inverted by topo II. Further studies may decipher whether this prospect has deeper implications for the eukaryotic gene regulation.

Materials and methods

Strains, plasmids, and enzymes

S. cerevisiae strains JCW27 ($\Delta top1 TOP2$) and JCW28 ($\Delta top1 top2-4$), carrying the null mutation $\Delta top1$ or the thermo-sensitive mutation $top2-4$, are derivatives of FY251 ($TOP1 TOP2 MATa his3-\Delta 200 leu2-\Delta 1 trp1-\Delta 63 ura3-52$) (Roca *et al*, 1992). Plasmid JRW13, a derivative of YEpl3, carries the *E. coli topA* gene under constitutive pGPD yeast promoter. Plasmid Yp4.4 (4414 bp) carries the 1.4 kbp *EcoRI TRP1ARS1* chromosomal fragment of *S. cerevisiae*. Plasmid pHC624 (2065 bp) is a derivative of pBR322 containing the ampR-oriC sequences. DNA Topoisomerase I of vaccinia virus was purified from *E. coli* cells harboring the expression clone pET11vv-top1 (Shuman *et al*, 1988). DNA topoisomerase I of *S. cerevisiae* was purified from yeast cells harboring the expression clone YCpGAL-TOPI (Bjornsti and Fertala, 1999). DNA topoisomerase II of *S. cerevisiae* was purified from yeast cells harboring the expression clone YEptTOP2GAL1 (Worland and Wang, 1989).

Extraction of minichromosomes

Yeast cells were grown at 26°C in synthetic selective media. Thermal inactivation of topo II was carried out during exponential

growth (OD \sim 0.8) by shifting cell cultures to 35°C. Cells from a 100 ml culture were harvested and washed in Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, at 4°C. Cells were resuspended at 4°C in 1 ml of buffer L (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0.1%, pepstatin 1 μ g/ml, leupeptin 1 μ g/ml, PMSF 1 mM, and 10 μ g/ml of supercoiled plasmid pHC624). About 1 ml of glass beads was added and the suspension was stirred six times by 30-s pulses at 4°C. Supernatants were recovered after two successive centrifugations (20 000 g at 4°C) and then loaded on a Sephacryl S-300 column equilibrated with buffer L at 4°C. Yeast circular minichromosomes and supercoiled plasmids were eluted in the first filtration volume.

Micrococcal nuclease digestions

Plasmids and minichromosomes were solubilized in buffer L plus CaCl₂ adjusted to 5 mM. Following preincubation at 37°C for 5 min, micrococcal nuclease was added at 2–250 U/ml and digestions proceeded at 37°C for 2 min. Reactions were terminated by the addition of one volume of buffer K (EDTA 40 mM, SDS 1%, proteinase K, RNase A). After 1 h at 60°C, samples were extracted by phenol and DNA was recovered by EtOH precipitation.

Topoisomerase reactions

Mixtures containing yeast minichromosomes and control plasmids were adjusted to 8 mM MgCl₂ and 1 mM ATP (when indicated), preincubated at 30°C for 5 min, and then supplemented with catalytic amounts of topoisomerases. Mixtures were also supplemented with serial dilutions of cell extracts of JCW27 or FY251 obtained by physical cell disruption, as described above. Following incubations at 30°C, reactions were quenched at indicated times by adding one volume of buffer K (EDTA 40 mM, SDS 1%, proteinase K, RNase A). Following 1 h incubation at 60°C, samples were extracted by phenol and DNA was recovered by EtOH precipitation.

DNA electrophoresis and topology analysis

DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis in the conditions specified in figure legends. Gel-blot hybridization was carried out using ³²P-labeled DNA probes obtained by random priming on purified DNA sequences. DNA linking number (*Lk*) distributions was analyzed by quantifying the amount of every given topoisomer by phosphorimaging the probed gel-blots. DNA supercoiling density (σ) was calculated with $\sigma = \Delta Lk/Lk^0$ (Wang *et al*, 1982). Linking number difference (ΔLk) was determined with $\Delta Lk = Lk - Lk^0$, in which $Lk^0 = N/h^0$, where *N* is the DNA circle size (in bp) and *h*⁰ (10.5 bp/turn) the most probable helical repeat of DNA in the relaxation conditions used (Horowitz and Wang, 1984).

Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Plan Nacional I + D + I (Ministerio de Educación y Ciencia de España) and DURSI (Generalitat de Catalunya). JS was recipient of a FPU fellowship from the Spanish Government.

References

- Adachi Y, Luke M, Laemmli UK (1991) Chromosome assembly *in vitro*: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* **64**: 137–148
- Almouzni G, Mechali M (1988) Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *EMBO J* **7**: 4355–4365
- Bednar J, Furrer P, Stasiak A, Dubochet J, Egelman EH, Bates AD (1994) The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. *J Mol Biol* **235**: 825–847
- Bjornsti MA, Fertala J (1999) Overexpression and purification of DNA topoisomerase I from yeast. *Methods Mol Biol* **94**: 179–186
- Boles TC, White JH, Cozzarelli NR (1990) Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J Mol Biol* **213**: 931–951
- Brill SJ, Sternglanz R (1988) Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* **54**: 403–411
- Cavalli G, Bachmann D, Thoma F (1996) Inactivation of topoisomerases affects transcription-dependent chromatin transitions in rDNA but not in a gene transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **15**: 590–597
- Clark D, Felsenfeld G (1991) Formation of nucleosomes on positively supercoiled DNA. *EMBO J* **10**: 387–395
- Collins L, Weber A, Levens D (2001) Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol Cell Biol* **21**: 8437–8451
- Champoux J (2001) DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**: 369–413
- Charvin G, Bensimon D, Croquette V (2003) Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9820–9825
- Christensen MO, Krokowski RM, Barthelme HU, Hock R, Boege F, Mielke C (2004) Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* **279**: 21873–21882
- Christensen MO, Larsen MK, Barthelme HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C (2002) Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* **157**: 31–44

- Christman MF, Dietrich FS, Fink GR (1988) Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* **55**: 413–425
- D'Arpa P, Beardmore C, Liu LF (1990) Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* **50**: 6919–6924
- Fass D, Bogden CE, Berger JM (1999) Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat Struct Biol* **6**: 322–326
- Fleischmann G., Pflugfelder G, Steiner EK, Javaherian K, Howard GC, Wang JC, Elgin SC (1984) *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6958–6962
- Garinther W, Schultz M (1997) Topoisomerase function during replication-independent chromatin assembly in yeast. *Mol Cell Biol* **17**: 3520–3526
- Gasser SM, Laroche T, Falquet J, Boy de la Tour E, Laemmli UK (1986) Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J Mol Biol* **188**: 613–629
- Germe T, Hyrien O (2005) Topoisomerase II-DNA complexes trapped by ICRF-193 perturb chromatin structure. *EMBO Rep* **6**: 729–735
- Ghaemmghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephore N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–741
- Giaever GN, Wang JC (1988) Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* **55**: 849–856
- Hamiche A, Carot V, Alilet M, De Lucia F, O'Donohue M, Revet B, Prunell A (1996) Interaction of the histone (H3-H4)₂ tetramer of the nucleosome with positively supercoiled DNA minicircles: potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7588–7593
- Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y (1989) Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res* **49**: 6365–6368
- Holm C, Goto T, Wang JC, Botstein D. (1985) DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* **41**: 553–563
- Horowitz DS, Wang JC (1984) Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling. *J Mol Biol* **173**: 75–91
- Kim RA, Wang JC (1989a) A subthreshold level of DNA topoisomerases leads to the excision of yeast rDNA as extrachromosomal rings. *Cell* **57**: 975–985
- Kim RA, Wang JC (1989b) Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **208**: 257–267
- Klein FT, Laroche ME, Cardenas J, Hofmann F, Schweizer D, Gasser SM (1992) Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *J Cell Biol* **117**: 935–948
- Koster DA, Croquette V, Dekker C, Shuman S, Dekker NH (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature* **434**: 671–674
- Krogh BO, Shuman S (2000) Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB. *Mol Cell* **5**: 1035–1041
- Lee M, Garrard W (1991) Positive DNA supercoiling generates a chromatin conformation characteristic of highly active genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9675–9679
- Liu LF (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* **58**: 351–375
- Liu LF, Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7024–7027
- Lyu YL, Wang JC (2003) Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7123–7128
- Mao Y, Mehl IR, Muller MT (2002) Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1235–1240
- Mondal N, Parvin JD (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* **413**: 435–438
- Muller MT, Pfund WP, Mehta VB, Trask DK (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *EMBO J* **4**: 1237–1243
- Nelson P (1999) Transport of torsional stress in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14342–14347
- Panyutin IG, Kovalsky OI, Budowsky EI (1989) Magnesium-dependent supercoiling-induced transition in (dG)_n (dC)_n stretches and formation of a new G-structure by (dG)_i strand. *Nucleic Acid Res* **17**: 8257–8271
- Roca J (2004) The path of the DNA along the dimer interface of topoisomerase II. *J Biol Chem* **279**: 25783–25788
- Roca J, Berger JM, Harrison SH, Wang JC (1996) DNA transport by type II DNA topoisomerases: direct evidence of a two gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4057–4062
- Roca J, Gartenberg M, Oshima Y, Wang JC (1992) A hit-and-run system for targeted genetic manipulations in yeast. *Nucleic Acids Res* **20**: 4671–4672
- Roca J, Mezquita C (1989) DNA topoisomerase II activity in non-replicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *EMBO J* **8**: 1855–1860
- Roca J, Wang JC (1996) The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells* **1**: 17–27
- Rybenkov VV, Vologodskii AV, Cozzarelli NR (1997) The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling. *Nucleic Acids Res* **25**: 1412–1418
- Saaavedra RA, Huberman JA (1986) Both DNA topoisomerases I and II relax 2 micron plasmid DNA in living yeast cells. *Cell* **45**: 65–70
- Schultz MC, Brill SJ, Ju Q, Sternglanz R, Reeder RH (1992) Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev* **6**: 1332–1341
- Shuman S, Golder M, Moss B (1988) Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 16401–16407
- Sivolob A, Prunell A (2003) Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. *J Mol Biol* **331**: 1025–1040
- Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux J (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science* **279**: 1534–1541
- Sun J, Zhang Q, Schlick T (2005) Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8180–8185
- Takahashi T, Matsuhara S, Abe M, Komeda Y (2002) Disruption of a DNA topoisomerase I gene affects morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 2085–2093
- Thoma F, Bergman LM, Simpson RT (1984) Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J Mol Biol* **177**: 715–733
- Trigueros S, Roca J (2001) Circular minichromosomes become highly recombinogenic in topoisomerase-deficient yeast cells. *J Biol Chem* **276**: 2243–2249
- Uemura T, Ohkura H, Adachi Y, Morino K, Shiozaki K, Yanagida M (1987) DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* **50**: 917–925
- Uemura T, Yanagida M (1984) Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *EMBO J* **3**: 1737–1744
- Wang JC (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* **31**: 107–144
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 430–440
- Wang JC, Peck LJ, Becherer K (1982) DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function. *Cold Spring Harbor Symp Quan Biol* **47**: 85–91
- Worland ST, Wang JC (1989) Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264**: 4412–4416
- Xu YC, Bremer H (1997) Winding of the DNA helix by divalent metal ions. *Nucleic Acids Res* **25**: 4067–4071
- Zhang CX, Chen AD, Gettel NJ, Hsieh TS (2000) Essential functions of DNA topoisomerase I in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **222**: 27–40
- Zhang H, Wang JC, Liu LF (1988) Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1060–1064

Resum breu del quart article

La cromatina regula la tensió helicoïdal de l'ADN afavorint la relaxació de superenrotllament positiu per la topoisomerasa II.

A eucariotes, les topoisomerases I i II relaxen l'estrès torsional generat durant la replicació i la transcripció de l'ADN. El nostre laboratori ha demostrat prèviament que els minicromosomes circulars amb tensió helicoïdal positiva son relaxats més eficientment mitjançant l'inversió de creuaments de l'ADN produït per la topoisomerasa II, que mitjançant la lliure rotació del bris de l'ADN produït per la topoisomerasa I.

En el present estudi es fa el primer anàlisi comparatiu entre les activitats de les topoisomerases I i II en cromatina amb un excés de tensió helicoïdal positiva i negativa a l'ADN. Es troba que, mentre que la topoisomerasa I es capaç de relaxar la tensió helicoïdal positiva i negativa a velocitats similars, la topoisomerasa II es capaç de relaxar la tensió helicoïdal positiva més ràpidament que la negativa. D'acord amb aquestes diferències, es troba que la velocitat de relaxació de la tensió positiva per las topoisomerases endògens es molt superior a la velocitat de relaxació de la tensió negativa. Aquesta asimetria en les capacitats relaxadores explica l'acumul de tensió superhelicoïdal negativa que s'observa *in vivo* durant la transcripció d l'ADN en mutants $\Delta top1$.

Aquest resultats indiquen que diferències de conformació entre la cromatina amb tensió helicoïdal positiva i negativa serien les responsables de les diferents capacitats relaxadores de les topoisomerases I i II cel·lulars. Es proposa que mentre una ràpida relaxació dels superenrotllaments positius facilitaria l'avanç de les polimerases de ARN i ADN, una relaxació lenta de la tensió helicoïdal negativa mantindria mes obertes i accessibles regions específiques dels cromosomes.

Quart article

Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils

Xavier Fernández, Ofelia Díaz-Ingelmo, Belén Martínez-García & Joaquim Roca*

Abstract

Eukaryotic topoisomerases I (topo I) and II (topo II) relax the positive (+) and negative (−) DNA torsional stress (TS) generated ahead and behind the transcription machinery. It is unknown how this DNA relaxation activity is regulated and whether (+) and (−)TS are reduced at similar rates. Here, we used yeast circular minichromosomes to conduct the first comparative analysis of topo I and topo II activities in relaxing chromatin under (+) and (−)TS. We observed that, while topo I relaxed (+) and (−)TS with similar efficiency, topo II was more proficient and relaxed (+)TS more quickly than (−)TS. Accordingly, we found that the relaxation rate of (+)TS by endogenous topoisomerases largely surpassed that of (−)TS. We propose a model of how distinct conformations of chromatin under (+) and (−)TS may produce this unbalanced relaxation of DNA. We postulate that, while quick relaxation of (+)TS may facilitate the progression of RNA and DNA polymerases, slow relaxation of (−)TS may serve to favor DNA unwinding and other structural transitions at specific regions often required for genomic transactions.

Keywords gyrase; nucleosome; supercoiling; transcription; yeast

Subject Categories Chromatin, Epigenetics, Genomics & Functional Genomics; DNA Replication, Repair & Recombination

DOI 10.15252/embj.201488091 | Received 31 January 2014 | Revised 11 April 2014 | Accepted 29 April 2014 | Published online 23 May 2014

The EMBO Journal (2014) 33: 1492–1501

Introduction

In eubacteria, such as *Escherichia coli*, the free energy of negative DNA supercoiling is required to initiate chromosome replication, modulate gene expression and shape the nucleoid architecture (Hatfield & Benham, 2002; Travers & Muskhelishvili, 2005). Unconstrained (−) supercoiling or, more precisely, (−) torsional stress (TS) is sustained by DNA gyrase, a type-2 topoisomerase that reduces the linking number (*Lk*) of the DNA double helix (Gellert *et al.*, 1976). Remarkably, a DNA supercoiling enzyme analogous to

DNA gyrase is not present in eukaryotic cells (Corbett & Berger, 2004; Chen *et al.*, 2013). In eukaryotic chromatin, (−) supercoiling of DNA is mostly constrained by the periodic folding of DNA into nucleosomes (Prunell, 1998). In this landscape, cellular topoisomerases (topo I and topo II) relax the TS that is generated by DNA tracking motors (i.e. RNA and DNA polymerases, DNA helicases) and other processes that change DNA topology (i.e. nucleosome assembly-disassembly) (Roca, 2011). During DNA transcription, rapid rotation of the double helix relative to the RNA polymerase is challenged by the viscous drag of intracellular chromatin (Nelson, 1999). Consequently, (+) and (−)TS are generated at the same rate ahead and behind the transcribing complex, respectively (Liu & Wang, 1987; Giaever & Wang, 1988). Likewise, (+)TS also occurs in front of DNA replication forks. TS can dissipate near the telomeres but it cannot diffuse from the internal regions of linear chromosomes (Joshi *et al.*, 2010; Kegel *et al.*, 2011). Thus, the relaxation of TS by cellular topoisomerases is required for the correct progression of DNA transcription and replication (Wang, 2002). However, it is unclear whether cellular topoisomerases play more specific roles in tuning TS across eukaryotic chromatin.

Numerous observations indicate a functional redundancy of topo I and topo II in the relaxation of TS. DNA replication forks stall when both enzymes are defective but can progress at normal rates in the presence of either topo I or topo II (Kim & Wang, 1989; Bermejo *et al.*, 2007). The relaxation of (+)TS by either topo I or topo II is sufficient for normal advancement of RNA polymerases (Mondal & Parvin, 2001; Mondal *et al.*, 2003; Garcia-Rubio & Aguilera, 2012). Accordingly, yeast *Δtop1* mutants are viable and show minor alterations of gene expression (Brill *et al.*, 1987; Lotito *et al.*, 2008). Likewise, although topo II is essential for chromosome segregation, its inactivation does not preclude RNA synthesis in yeast (Bermejo *et al.*, 2009; Durand-Dubief *et al.*, 2010). Only in yeast *Δtop1 top2-ts* double mutants global RNA synthesis is decreased (Brill *et al.*, 1987; Schultz *et al.*, 1992; Sperling *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012). However, other studies have described that the DNA relaxation activities of topo I and topo II are not always interchangeable or able to compensate each other. Circular minichromosomes with DNA under (+)TS are relaxed more efficiently by topo II than by topo I in comparison to naked DNA plasmids (Salceda *et al.*, 2006). Accordingly, topo II

rather than topo I is required in yeast to relax the (+)TS that stalls Pol II during the transcription of long genes (Joshi *et al*, 2012). Likewise, topo II is preferentially localized near long genes and required for their proper expression in mammalian cells (King *et al*, 2013; Thakurela *et al*, 2013). Specific roles of cellular topoisomerases in DNA relaxation have also been observed at the ribosomal genes, in which twin domains of (–) and (+)TS generated during Pol I transcription are preferentially relaxed by the activities of topo I and topo II, respectively (El Hage *et al*, 2010; French *et al*, 2011).

The distinct efficiency or specific preferences of topo I and topo II to relax intracellular DNA have been explained in terms of the interplay between chromatin structure and topoisomerase mechanisms (Salceda *et al*, 2006). Topo I temporarily cleaves one strand of the duplex and permits one free end to rotate in either direction around the uncleaved strand (Stewart *et al*, 1998; Krogh & Shuman, 2000). As this “strand rotation” mechanism does not require an energetic cofactor, DNA torque and friction drive integral rotations until the relaxation of (+) or (–)TS is completed (Koster *et al*, 2005). Accordingly, topo I should be effective in chromatin configurations that facilitate axial rotation of DNA. Topo II produces instead a transient double-strand break at one DNA segment, through which it passes another segment of duplex DNA in an ATP-dependent manner (Wang, 1998). This “cross-over inversion” removes the (+) and (–) DNA supercoils that may occur when DNA is under (+) and (–)TS. Accordingly, topo II should be effective in chromatin configurations that favor supercoil extrusion or juxtaposition of DNA segments. These premises explained why topo II is more proficient than topo I in relaxing chromatin under (+)TS (Salceda *et al*, 2006). In this regard, it remains to be explored whether the same happens when chromatin is under (–)TS. This comparison is important to address a fundamental issue, namely whether cellular topoisomerases are able to remove with similar efficiency the twin domains of (+) and (–)TS generated during *in vivo* DNA transcription regardless of other factors that may regulate the localization and catalytic activity of these enzymes.

To tackle the above questions, here we revisited an earlier study by Brill and Sternglanz (1988), which reported that transcriptionally active circular minichromosomes in yeast $\Delta top1$ and $\Delta top1 top2-ts$ mutants undergo a large reduction of *Lk*. Our experiments corroborate this observation and show that the DNA superhelical density of the minichromosomes falls from -0.05 (typical of chromatin) to values as low as -0.12 ; and that this change results from an accumulation of (–)TS that preserves the nucleosomal organization of DNA. Therefore, we used these minichromosomes to conduct the first comparative analysis of topo I and topo II activities in relaxing (+) and (–)TS in native chromatin. We show that, while topo I relaxes (–) and (+)TS slowly and at similar speed, topo II relaxes (+)TS more quickly than (–)TS. This imbalance is consistent with the accumulation of (–)TS observed in $\Delta top1$ mutants and altogether indicates that the intracellular relaxation rate of (+)TS largely surpasses that of (–)TS. We present a model to explain how distinct configurations of chromatin under (+) and (–)TS affect the DNA relaxation capacity of cellular topoisomerases. We postulate that chromatin promotes the rapid relaxation of (+)TS in order to facilitate the progression of RNA and DNA polymerases, while it delays the relaxation of (–)TS in order to keep the DNA torsional energy that is often required for genome transactions.

Results

Inactivation of topo I and topo II reduces the DNA linking number of yeast circular minichromosomes

Eukaryotic chromatin constraints on average about one negative helical turn of DNA per nucleosome. Consequently, the average linking number (*Lk*) of chromatinized DNA is smaller than of freely relaxed DNA (Lk^0) and this *Lk* difference ($\Delta Lk = Lk - Lk^0$) roughly correlates to the number of assembled nucleosomes. In this regard, we observed that the *Lk* values of some circular minichromosomes in yeast topoisomerase mutants were markedly reduced. This phenomenon is shown in Fig 1A, which displays by two-dimensional DNA gel electrophoresis the *Lk* distributions of various plasmids extracted from $\Delta top1 top2-4$ double mutants before and after inactivation of the thermo-sensitive topo II enzyme (1 h at 37°C). In these gels, *Lk* topoisomers distribute along an arch, where *Lk* values increased clockwise (+) and decreased anti-clockwise (–). In the case of multi-copy plasmids YEpTA1, YEp13 and 2- μ m, the *Lk* reduction occurred after the cells were shifted to 37°C. In the case of single-copy plasmids YCpTA1 and YCp50, the decrease in the *Lk* was incipient at 28°C and affected nearly all the plasmid molecules when the cells were shifted to 37°C (Fig 1A and D). While the bulk of single-copy plasmids underwent *Lk* reduction, only subfractions of the multi-copy plasmids were affected, even after extending the topo II inactivation time (Fig 1B). Regardless of the plasmid copy-number, this reduction in *Lk* did not occur in the parental *TOP1 TOP2* strain or in the $\Delta top1$ or $top2-4$ single mutants (Fig 1C and D). Therefore, this change in DNA topology was caused by a defect in topoisomerase activity and was not related to the thermal shift.

DNA transcription causes the *Lk* reduction in yeast topoisomerase mutants

To examine whether the *Lk* reduction was associated with DNA transcription, replication or centromere activities we constructed plasmid YCp321, which has two 58-bp direct repeats that are recognized by the site-specific recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* (Matsuzaki *et al*, 1990). Site-specific recombination splits YCp321 into one circle containing the CEN4 and ARS1 elements and another circle containing the *URA3* gene (Fig 2A). These two circles were produced in $\Delta top1 top2-4$ yeast mutants, which contained YCp321 and the recombinase expression plasmid pHM53, by shifting the cells from glucose- to galactose-containing media for 6 h. Following topo II inactivation, *Lk* reduction occurred in the circle containing the *URA3* gene but not in that holding the CEN and ARS elements (Fig 2A).

To further assess the dependence of the *Lk* reduction on transcription activity, we constructed the plasmid YCp50 *pGAL1:LacZ*, in which the *E. coli LacZ* gene was under the galactose-inducible *GAL1* yeast promoter (*pGAL1*). We introduced the plasmid in $\Delta top1 top2-4$ yeast mutants and induced high transcription of *LacZ* by shifting the cells from glucose- to galactose-containing media. Next, we inactivated topo II and checked the plasmid topology at a range of time points (Fig 2B). In the cells kept in glucose medium, the reduction in *Lk* occurred after topo II inactivation since this plasmid contained the *URA3* gene. However, in those cells shifted to galactose medium, the *Lk* value of virtually all the plasmid

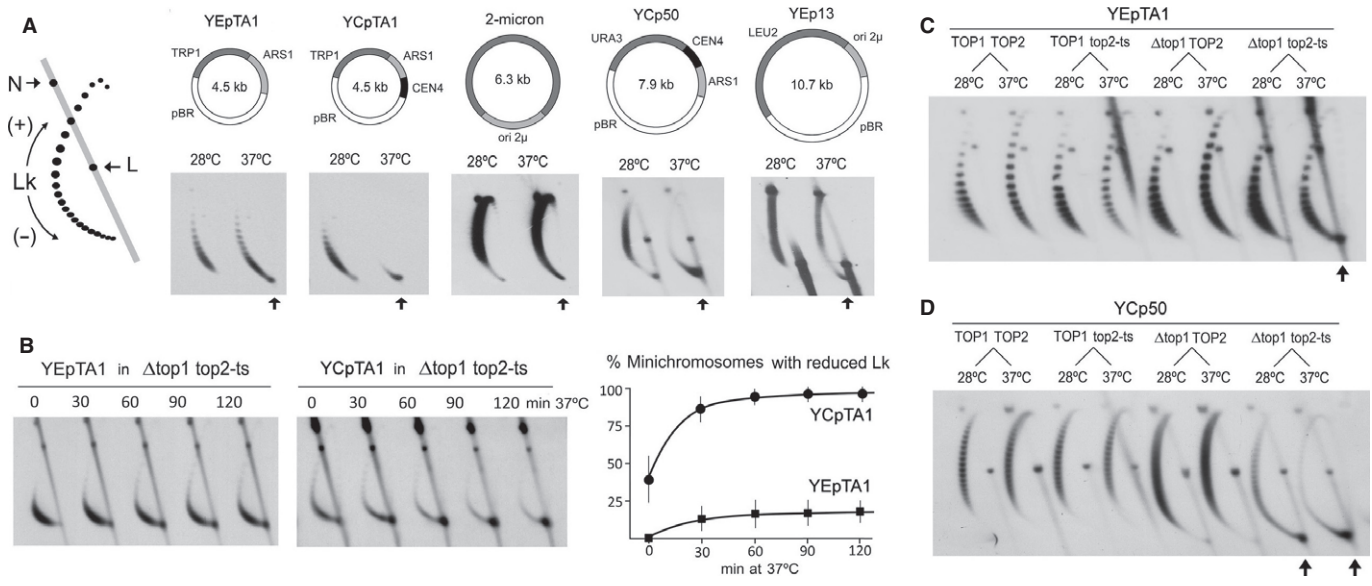


Figure 1. Reduction of DNA linking number of circular minichromosomes in yeast topoisomerase mutants.

A The 2D diagram (left) shows the relative positions of nicked (N), linear (L), and linking number (*Lk*) distribution of supercoiled DNA topoisomers (*Lk*). The 2D gel-blots show the *Lk* distributions of plasmids YEptA1, YCpTA1, 2- μ , YCp50 and YEpt13 hosted in yeast $\Delta top1 top2-4$ double mutants before (28°C) and after thermal inactivation of topo II (1 h at 37°C). Arrows indicate the DNA populations with reduced *Lk*. Plasmid schemes show the position of their functional elements.

B The 2D gel-blots show the *Lk* distributions of YEptA1 and YCpTA1 at different time points after thermal inactivation of topo II in the yeast $\Delta top1 top2-4$ double mutant. The graph (right) plots the mean and s.d. of the plasmid fractions with reduced *Lk* in three experiments.

C, D The 2D gel-blots compare the *Lk* distributions of YEptA1 and YCp50 hosted in the parental *TOP1 TOP2* strain and its *TOP1 top2-4*, $\Delta top1 TOP2$ and $\Delta top1 top2-4$ derivatives. Cells were sampled before (28°C) and after thermal inactivation of topo II (1 h at 37°C). Arrows indicate the DNA populations with reduced *Lk*.

molecules decreased before the inactivation of topo II. This *Lk* reduction was reverted when cells were shifted back to glucose-containing media that inhibits *pGAL1* (Fig 2C, left). This correlation between *Lk* reduction and induced transcription did not occur in the parental plasmid YCp50 that lacks *pGAL1* (Fig 2C, right). We next examined the topology of YCp50 *pGAL1:LacZ* in the parental *TOP1 TOP2* strain or in the $\Delta top1$ or *top2-4* single mutants (Fig 2D). No significant changes occurred in *TOP1 TOP2* cells or in the *TOP1 top2-4* single mutant, even after topo II inactivation. However, the plasmid in the $\Delta top1 TOP2$ single mutant presented an *Lk* reduction resembling that detected in the $\Delta top1 top2-4$ double mutant. Therefore, when DNA was highly transcribed, the *Lk* reduction occurred even in presence of normal topo II activity.

***Lk* reduction in $\Delta top1 top2-ts$ yeast cells doubles the typical DNA supercoiling density of chromatin and it is not constrained**

Figure 3A compares the *Lk* distributions of YCpTRP1 extracted from *TOP1 TOP2* and $\Delta top1 top2-4$ yeast cells after 1 h incubation at 37°C and of the same plasmid relaxed *in vitro* with topo I at 37°C. The *Lk* difference between the relaxed plasmid (Lk^0) and the chromatinized plasmid in *TOP1 TOP2* cells was about -22. As YCpTRP1 is 4,512 bp in length, its Lk^0 is about 428 (4,512 bp/10.5). Therefore, the specific *Lk* difference or DNA supercoiling density ($\sigma = \Delta Lk/Lk^0$) of YCpTRP1 in *TOP1 TOP2* cells was roughly -0.05 (-22/428). To calculate σ of YCpTRP1 in $\Delta top1 top2-4$ cells, we used higher chloroquine concentrations in the electrophoresis such that individual topoisomers within the population of reduced *Lk* values could be counted. YCpTRP1 from $\Delta top1$

top2-4 cells presented a broad *Lk* distribution with ΔLk values ranging from about -22 down to -52 (Fig 3B). Thus, the DNA supercoiling density of the minichromosome reached levels as low as -0.12 (-52/428).

We next addressed whether this gain of negative DNA supercoiling density produced in $\Delta top1 top2-4$ mutants was stabilized by some structure (i.e. DNA unwinding proteins, DNA-RNA interactions, non-B-DNA conformations) or could instead be relaxed as free (-)TS. For this purpose, we solubilized the native YCpTRP1 minichromosomes from lysates of *TOP1 TOP2* and $\Delta top1 top2-4$ cells after 1 h incubation at 37°C. The minichromosomes were then incubated with an excess of topo I in the presence of another supercoiled plasmid that served as a DNA relaxation control. The *Lk* distribution of the YCpTRP1 minichromosome solubilized from *TOP1 TOP2* cells did not change after incubation with topo I, whereas the control plasmid included in the reaction was relaxed (Fig 3C). The control plasmid was partially relaxed even without the addition of topo I, most likely by the endogenous topoisomerase activity present in the *TOP1 TOP2* lysate. These results confirmed that the negative DNA supercoiling density of YCpTRP1 ($\sigma \sim -0.05$) was stabilized by nucleosomes. In contrast, the incubation with topo I of the minichromosome solubilized from $\Delta top1 top2-4$ cells (σ down to -0.12) produced an *Lk* distribution very similar to that observed in *TOP1 TOP2* cells (Fig 3C). Therefore, the gain of negative DNA supercoiling density produced in $\Delta top1 top2-4$ mutants was not stabilized. Otherwise, the *Lk* distribution would have remained unaltered while the control plasmid was relaxed. Therefore, the *Lk* reduction stands as free (-)TS, and seemingly

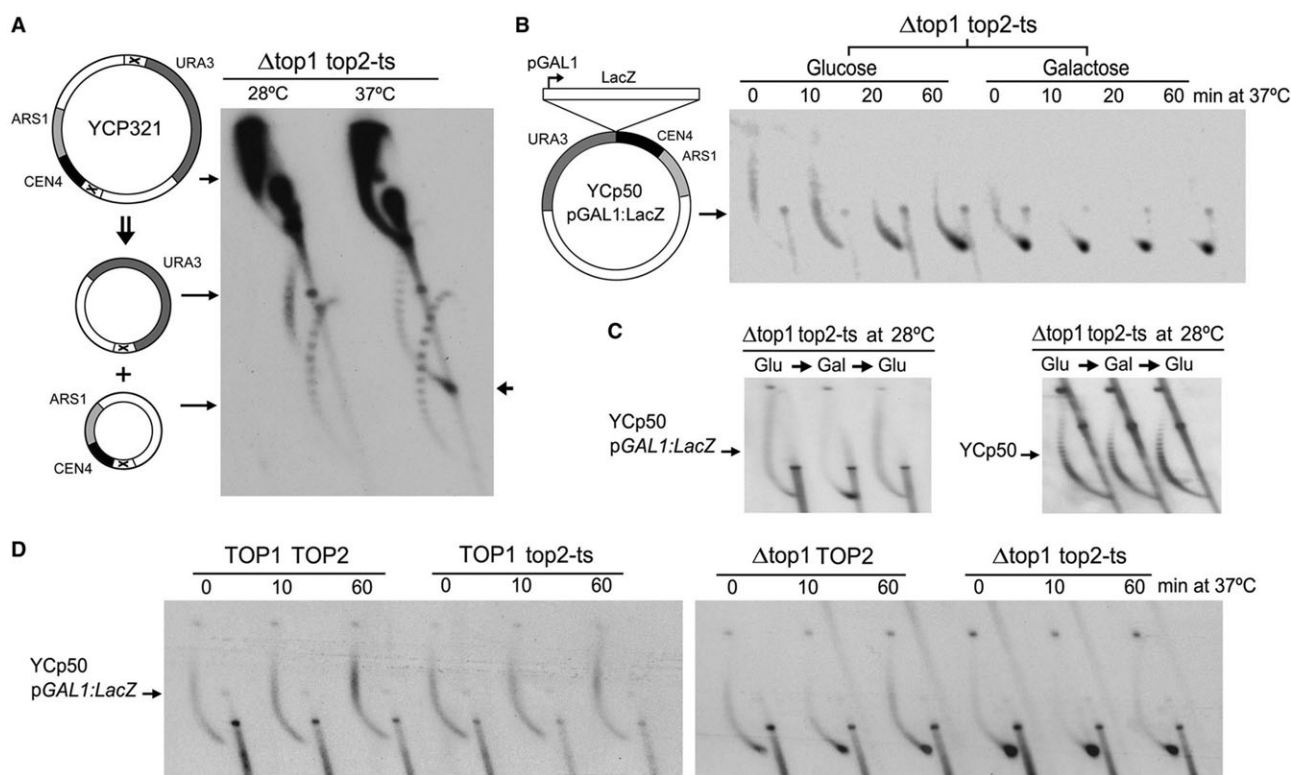


Figure 2. Dependence of the linking number (Lk) reduction on DNA transcription activity.

- A The 2D gel-blot shows the topology of YCP321 and its two site-specific recombination circles in yeast $\Delta top1 top2-4$ double mutants before (28°C) and after thermal inactivation of topo II (1 h at 37°C). The arrow in the right indicates the Lk reduction in the circle containing the *URA3* gene.
- B The 2D gel-blot shows the topology of YCP50 *pGAL1:LacZ* in yeast $\Delta top1 top2-4$ double mutants after thermal inactivation of topo II for the indicated times (min). The experiment compares cells that grew in selective media containing 2% glucose and cells that were shifted to 2% galactose-containing media for 3 h to activate the transcription of *LacZ*.
- C The 2D gel-blots compare the topology of YCP50 *pGAL1:LacZ* and YCP50 in $\Delta top1 top2-4$ cells after the induction and repression of *pGAL1* at permissive temperature (28°C). Cells were sampled in media containing 2% glucose, shifted to 2% galactose-containing media for 3 h and shifted back to 2% glucose-containing media for 2 h.
- D Experiment conducted as in (B), but comparing yeast strains *TOP1 TOP2*, *TOP1 top2-4*, $\Delta top1 TOP2$ and $\Delta top1 top2-4$. The 2D gel-blots show the topology of YCP50 *pGAL1:LacZ* after shifting the cells to the galactose-containing media.

this (–)TS did not disrupt the nucleosomal organization of DNA, since the minichromosome recovered its typical DNA topology ($\sigma \sim -0.05$) upon relaxation.

Topoisomerase II relaxes chromatin under (+)TS faster than under (–)TS

Our previous studies showed that yeast minichromosomes with DNA under (+)TS are efficiently relaxed by topo II but not by topo I (Salceda *et al.*, 2006). The accumulation of (–)TS in yeast minichromosomes reported here provided the opportunity to conduct the first comparative analysis of topo I and topo II activities in relaxing (+)TS and (–)TS in native chromatin. Thus, we solubilized the YCPTRP1 minichromosome under (–)TS ($\sigma -0.05$ to -0.12) from $\Delta top1 top2-4$ yeast mutants. Likewise, we solubilized the same minichromosome under (+)TS ($\sigma > +0.04$) from $\Delta top1 top2-4$ yeast mutants constitutively expressing the *E. coli* topoisomerase I. As previously reported, (+)TS accumulates in this condition because the bacterial topoisomerase selectively relaxes (–)TS (untwisted DNA regions) and no other activity has the capacity to

relax (+)TS after topo II inactivation (Giaever & Wang, 1988). We incubated equivalent amounts of the minichromosomes under (+) and (–)TS with purified yeast topo I and topo II enzymes and compared their relaxation rates (Fig 4). Both topoisomerases relaxed the (+) and (–)TS of the minichromosomes and produced final Lk distributions of DNA supercoiling density of about -0.05 . This outcome corroborated that native nucleosomes were not evicted by (+) or (–)TS. However, the relative relaxation rates produced by topo I and topo II were distinct. While the former relaxed the minichromosomes under (+) and (–)TS at a similar speed, the latter relaxed those under (+)TS over 3-fold faster than those under (–)TS (Fig 4).

The capacity of endogenous topoisomerases to relax chromatin under (+)TS largely surpasses that under (–)TS

The accumulation of (–)TS in yeast minichromosomes reported here suggested that the capacity of cellular topoisomerases to relax chromatinized DNA under (+) and (–)TS is not equal. Thus, we examined whether the unbalanced relaxation of (+) and (–)TS

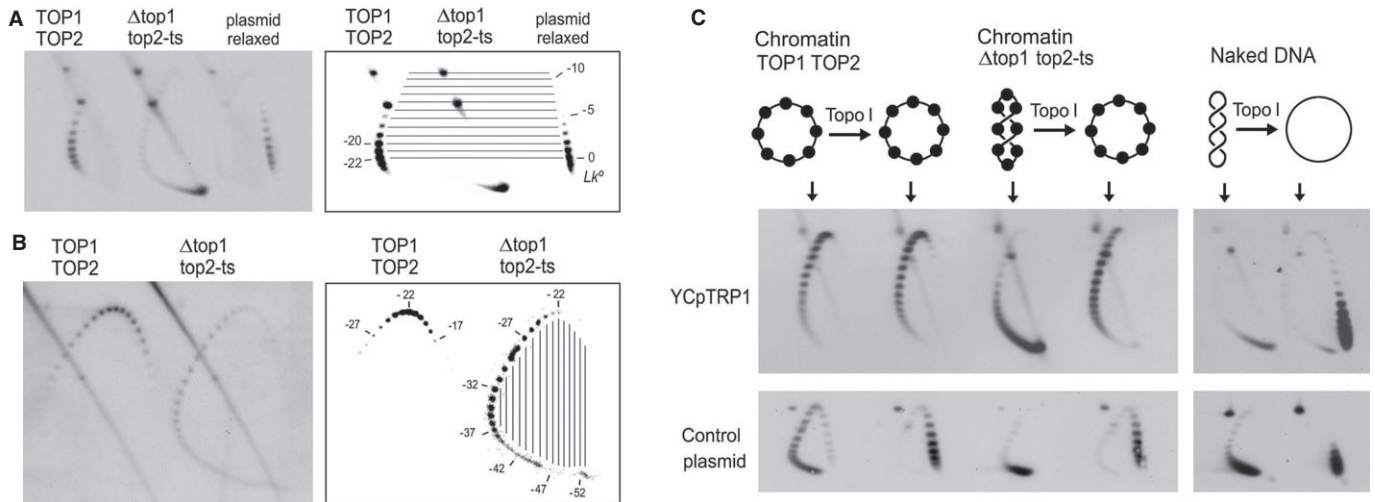


Figure 3. DNA supercoiling density and relaxation of yeast minichromosomes with reduced linking number (Lk) values.

- A The 2D gel-blot compares the Lk distributions of YCpTRP1 from *TOP1 TOP2* and $\Delta top1 top2-4$ yeast mutants after a 1-h incubation at 37°C and of the naked YCpTRP1 plasmid relaxed with topo I at 37°C. The diagram (right) was used to calculate ΔLk between the relaxed plasmid (Lk^0) and the minichromosome in *TOP1 TOP2* cells.
- B 2D-gel electrophoresis of the same yeast samples of YCpTRP1 described in (A), but by increasing the chloroquine concentration to 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the first dimension and to 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the second. The diagram (right) was used to calculate ΔLk between the minichromosomes in *TOP1 TOP2* cells and $\Delta top1 top2-4$ mutants.
- C The 2D gel-blot shows the Lk distributions of YCpTRP1 minichromosomes (chromatin) that were solubilized from $\Delta top1 top2-4$ (1 h at 37°C) and *TOP1 TOP2* yeast cells, and then incubated at 30°C with and without vaccinia virus topo I for 30 min. The lower panel shows the topology of the control plasmid included in the incubations. For comparison, panels in the right show the topology of YCpTRP1 (naked DNA) and the control plasmid that were separately relaxed with topo I. Electrophoresis was done with 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloroquine in the first dimension and with 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the second.

observed with the purified topoisomerases is reflected in the endogenous DNA relaxation activity of yeast cells. For this purpose, we prepared YCpTRP1 minichromosomes under (+) and (–)TS as described above and incubated them with fresh lysates of *TOP1 TOP2* yeast cells, either in the presence or absence of ATP (Fig 5). As we showed in previous studies, incubation in the absence of ATP allowed the activity of topo I, whereas incubation in the presence of ATP allowed the combined activity of topo I and topo II (Salceda *et al*, 2006). Endogenous topo I activity relaxed the minichromosomes under (+) and (–)TS with comparable efficiency. Upon addition of ATP, both forms of the minichromosome were relaxed more quickly, thus reflecting the contribution of endogenous topo II. However, while the relaxation rate improved by two fold in the case of (–)TS, it increased by nearly six fold for (+)TS (Fig 5). These results were consistent with the relaxation efficiencies observed with the purified enzymes and indicated that the cellular dosage of topo II provides more specific activity than the dispensable topo I to relax chromatinized DNA in yeast. Therefore, the global relaxation rate of (+)TS affected by the endogenous topoisomerases largely surpassed that of (–)TS.

Discussion

Our study corroborates the earlier observation of Brill and Sternglanz (1988) that transcriptionally active circular minichromosomes in yeast $\Delta top1$ mutants undergo a large reduction in their DNA Lk value. Accordingly, the Lk reduction affects the bulk of single-copy minichromosomes and only subfractions of multi-copy ones, in which the recruitment of transcription machinery is limited. In this

regard, we show that this alteration does not occur in transcriptionally inactive DNA circles and that it is enhanced in highly transcribed ones. We demonstrate that this Lk reduction changes the typical supercoiling density of chromatinized DNA ($\sigma -0.05$), reducing it to values twice as low ($\sigma -0.12$). Remarkably, this gain in supercoiling density does not disrupt the nucleosomal organization of DNA since the minichromosomes recover their normal DNA topology ($\sigma -0.05$) upon *in vitro* relaxation by topoisomerases. These findings provided thus the opportunity to investigate the interplay between (–)TS, chromatin structure and topoisomerase activities.

Given that eukaryotic cells do not have gyrase-like activity, the accumulation of (–)TS in yeast $\Delta top1$ mutants is possibly the result of an unbalanced relaxation of (+) and (–)TS generated during DNA transcription. This imbalance could be explained in two ways. One is that topo I, not topo II, functions as the main relaxase of (–)TS. The Lk reduction therefore occurs in the absence of topo I because topo II or some other activity in *top2-ts* mutants selectively removes (+)TS. This scenario, however, is not consistent with the accumulation of (+)TS observed in $\Delta top1 top2-ts$ double mutants that express *E. coli* topoisomerase I (Giaever & Wang, 1988). It appears that upon inactivation of topo II in $\Delta top1 top2-ts$ double mutants, no other cellular activity is able to relax (+)TS. In addition, it is unlikely that intracellular topo I relaxes the (–) but not the (+)TS. In such a scenario, (+)TS would accumulate in the *TOP1 top2-ts* mutants, and we did not observe this alteration even in highly transcribed minichromosomes. The second explanation for the Lk reduction is that intracellular topo II removes (+)TS faster than (–)TS, whereas topo I relaxes both indistinctively. Thus a reduction in Lk occurs in $\Delta top1 top2-ts$ mutants because their low topo II activity becomes limiting to remove (–) but not (+)TS.

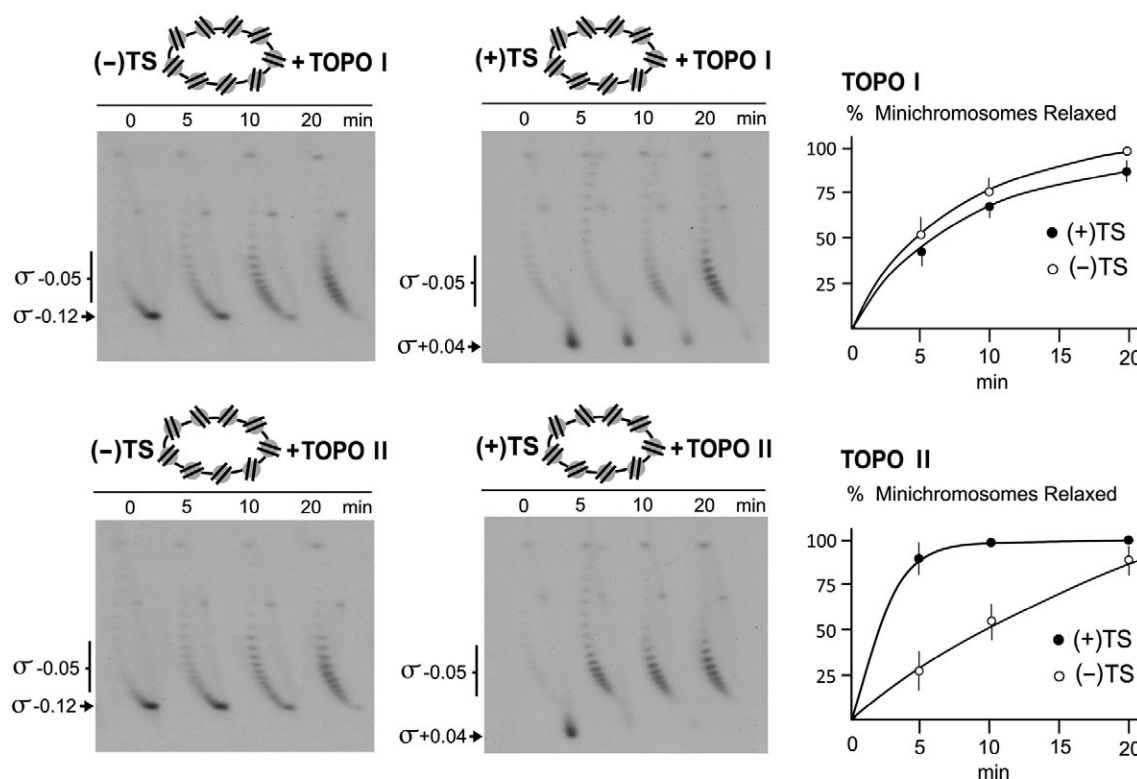


Figure 4. Relaxation of chromatin under (+) and (-)torsional stress (TS) by topo I and topo II enzymes.

YCpTRP1 minichromosomes under (-)TS ($\sigma -0.05$ to -0.12) or under (+)TS ($\sigma > +0.04$) were included (normalized amounts) in reaction mixtures (100 μ l) containing Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, 8 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP. The mixtures were pre-incubated at 30°C for 5 min and DNA relaxation reactions were initiated by addition of catalytic amounts of purified yeast topo I or topo II enzymes. Reaction fractions (25 μ l) were quenched at different time points (min). The 2D gel-blot shows the time course relaxation of YCpTRP1 minichromosomes under (-)TS and under (+)TS with topo I and topo II. The graphs (mean and s.d. of three experiments) show the time-course relaxation of populations under (-)TS ($\sigma -0.12$) and under (+)TS ($\sigma +0.04$) produced by topo I and topo II. Relaxation of minichromosomes under (-)TS was quantified by measuring the intensity of the gel band (arrow) accumulated at the left-end of the *Lk* distribution relative to the entire *Lk* distribution signal. Relaxation of populations under (+)TS was quantified by measuring the intensity of the gel band (arrow) accumulated at the right-end of the *Lk* distribution relative to the entire *Lk* distribution signal.

Likewise, when the generation rate of (+) and (-)TS markedly increases during high transcription activity, a reduction in *Lk* also occurs in $\Delta top1 TOP2$ mutants because even normal topo II activity is limiting to remove high levels of (-)TS. This *in vivo* scenario fits with the relaxation rates of yeast minichromosomes that we observed *in vitro*. Topo II relaxes chromatin under (+)TS faster than under (-)TS, while topo I removes (+) and (-)TS equally and not as quickly as topo II. Since the endogenous specific activity of topo II to relax nucleosomal DNA is higher than that of topo I (Salceda *et al.*, 2006), these results also clarify why topo I is not essential for yeast viability. Endogenous topo II alone suffices to relax the (+) and (-)TS generated during normal genome transactions, although it relaxes (+)TS more quickly than (-)TS.

The interplay of chromatin conformation under TS and DNA topoisomerase mechanisms

Topo I does not have an intrinsic preference to relax (+) and (-)TS on naked DNA. Single-molecule experiments showed that the DNA relaxation rate by topo I depends on net torque irrespective of the direction of strand rotation (Koster *et al.*, 2005; Koster *et al.*, 2007). Our results indicate that this property is preserved in chromatinized

DNA, although the relaxation rate is about 10 times slower than naked DNA (Salceda *et al.*, 2006). Therefore, topo I activity is probably delayed by the rotational drag of chromatinized DNA and this drag may be comparable under (+) and (-)TS. Like topo I, yeast topo II does not have an intrinsic preference to remove (+) and (-)TS on naked DNA (Roca & Wang, 1996; Charvin *et al.*, 2003; Salceda *et al.*, 2006). Therefore, the unbalanced relaxation of TS reported here reveals that while chromatin under (+)TS produces conformations suitable for the DNA cross-inversion mechanism of topo II, (-)TS produces conformations less appropriate for this activity. These inferences are consistent with the response of chromatin fibers to the axial rotation of DNA observed *in vitro* (Bancaud *et al.*, 2006; Lavelle *et al.*, 2010). Rotations that produce (+)TS markedly shorten the chromatin fiber and induce nucleosome-reversome transitions (Bancaud *et al.*, 2007). Both deformations imply an increase in DNA writhe (supercoiling), in which newly formed (+) DNA crossovers are substrates for topo II activity. A quick transition from a buffering (partial unwrapping of nucleosomal DNA) to a supercoiling (nucleation of positive DNA crossovers) regime was postulated to explain why topo II and not topo I is required for the production of long transcripts *in vivo* (Joshi *et al.*, 2012).

In contrast to (+)TS, the induction of (-)TS by axial rotation of chromatinized DNA does not produce a comparable shortening

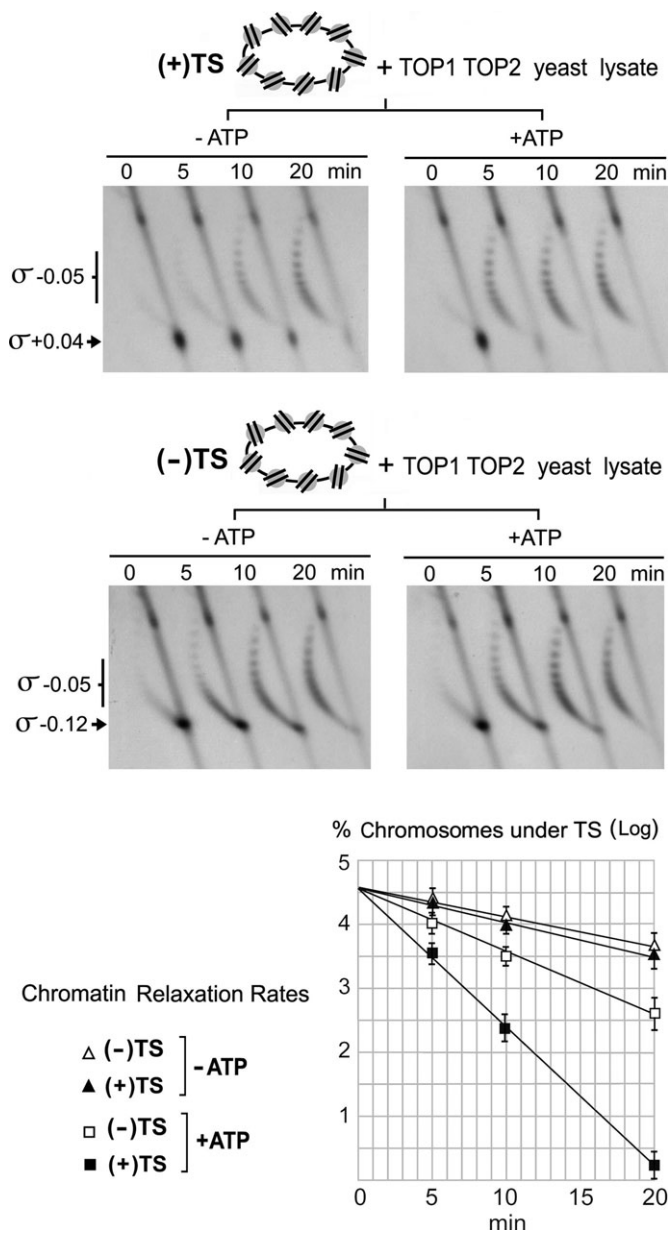


Figure 5. Relaxation rates of chromatin under (+) and (-)torsional stress (TS) by endogenous topoisomerase activity.
 YCpTRP1 minichromosomes under (-)TS (σ -0.05 to -0.12) or under (+)TS (σ > +0.04) were pre-incubated at 30°C for 5 min in reaction mixtures (100 μ l) containing Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM and 8 mM MgCl₂. Fresh lysates of TOP1 TOP2 yeast cells were then added, and one half of each reaction mixture was supplemented with 1 mM ATP. Incubations continued at 30°C and were stopped at the indicated time points (min). The 2D gel-blots show the time-course relaxation of the minichromosomes under (-)TS and under (+)TS. The plot (mean and s.d. of three experiments) shows the time course reduction of populations under (-)TS and under (+)TS produced with yeast lysates in the presence and absence of ATP. Reduction of minichromosomes under (+) and (-) TS was quantified by measuring the gel-blot signals as described in Fig 4.

effect (Bancaud *et al*, 2006; Lavelle *et al*, 2010). Consequently, chromatin is likely to accommodate (-)TS by untwisting DNA rather than by nucleating more (-) supercoils than those possibly configured by the left-handed wrapping of nucleosomal DNA. In

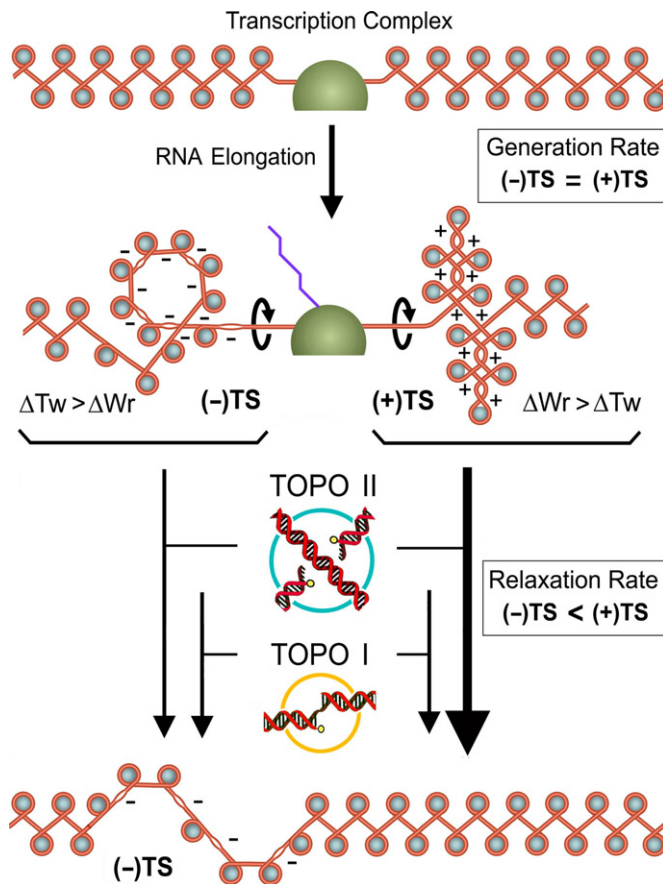


Figure 6. Role of chromatin conformation in the unbalanced relaxation (+) and (-)torsional stress (TS).
 During DNA transcription, (+) and (-)TS are generated at equal rates in front and behind the RNA elongating complex respectively. Plus (+) and minus (-) symbols reflect that the same number of positive and negative DNA extra helical turns are simultaneously produced. However, the conformational response of chromatin is distinct for (+) and (-)TS. Chromatin under (+)TS alters mainly the writhe of DNA ($\Delta Wr > \Delta Tw$) by extruding (+) supercoils and triggering nucleosome-reversome transitions. These deformations configure multiple DNA crossovers that are substrates for the DNA cross-inversion mechanism of topo II (blue). Conversely, chromatin under (-)TS alters mainly the twist of DNA ($\Delta Tw > \Delta Wr$) that leads toward double-helical unwinding. This deformation, along with a tight left-handed wrapping of DNA around histone octamers (grey), does not configure many DNA crossovers for topo II activity. Consequently, topo II relaxes (+)TS more quickly than (-)TS. In this scenario, the strand-rotation mechanism of topo I (yellow) slowly relaxes (-) and (+)TS at similar rates. As a result, the chromatin domain under (-)TS persists longer than that under (+)TS.

agreement with our results and recent *in vivo* studies (Teves & Henikoff, 2014), nucleosomes are not evicted by (-)TS. Our results indicate that the configuration of chromatin under (-)TS provides a poor substrate for topo II activity, thus implying a scarcity of newly formed (-) DNA crossovers. We therefore postulate that chromatin under (-)TS deforms mainly by tightening the left-handed wrapping of nucleosomal DNA and by unwinding the duplex at the linker regions. These deformations suffice to reach σ -values < -0.12, as reported here for yeast minichromosomes.

The model depicted in Fig 6 shows the plausible conformations of chromatin under (+) and (-)TS, and their interplay with the topo I and topo II mechanisms. These conformations, which explain why

minichromosomes under (+)TS are relaxed more quickly than under (–)TS, may occur thus at the chromatin regions downstream and upstream the transcribing complexes. Accordingly, while DNA transcription generates (+) and (–)TS at the same rate, cellular topoisomerases reduce more quickly the (+)TS. Consequently, (–)TS persists longer than (+)TS. In normal conditions, this gain of (–)TS may be transient and restricted to specific regions. However, when the generation rate of TS is increased and/or the topoisomerase activity is deficient, an accumulation of (–)TS becomes evident, as shown in the present study.

Persistence of negative DNA torsional stress in eukaryotic cells

The over-winding of DNA produced by (+)TS hinders DNA transcription and replication (Joshi *et al*, 2010; Roca, 2011). Efficient relaxation of (+)TS may have thus been optimized in eukaryotic chromatin to ensure proper progression of RNA and DNA polymerases. Conversely, the relaxation of (–)TS may be not as crucial since this constraint does not hamper RNA or DNA synthesis. Although excessive (–)TS can cause hyper-recombination (Trigueros & Roca, 2001, 2002), the maintenance of (–)TS may be necessary at specific regulatory regions in order to facilitate DNA bending or unwinding. This condition is well-known in eubacteria, where (–)TS sustained by DNA gyrase is essential for the regulation of gene expression, the initiation of DNA replication and the spatial folding of DNA (Hatfield & Benham, 2002; Travers & Muskhelishvili, 2005). Similar functions may occur in eukaryotic cells, as (–)TS favors the interaction of DNA with transcription factors (Mizutani *et al*, 1991a; Parvin & Sharp, 1993) and RNA polymerases (Tabuchi & Hirose, 1988; Mizutani *et al*, 1991b; Schultz *et al*, 1992). *In vivo* studies showed that (–)TS drives structural transitions of regulatory DNA sequences (Kouzine & Levens, 2007) and triggers functional responses of some gene loci in yeast and human cells (Kouzine *et al*, 2008; Brooks & Hurley, 2009).

Stably maintained (–)TS has been observed in specific regions of eukaryotic chromosomes (Jupe *et al*, 1993; Ljungman & Hanawalt, 1995; Kramer & Sinden, 1997; Matsumoto & Hirose, 2004). Recent genome-wide analyses of DNA topology have revealed that (–)TS persists across specific chromosomal domains and around the transcription start sites of many genes in *S. cerevisiae* (Bermudez *et al*, 2010; Kouzine *et al*, 2013; Naughton *et al*, 2013). Since eukaryotic cells do not have a gyrase-like enzyme, we propose that persistent levels of (–)TS are achieved via the unbalanced relaxation of (+) and (–)TS. Chromatin architecture and its epigenetic modifications are likely to determine how DNA torsional energy is buffered, dissipated or confined within topological domains (Gilbert & Allan, 2014). In the light of our findings, we propose that chromatin structure also determines the extent to which DNA torsional energy is kept or removed by cellular topoisomerases.

Materials and Methods

Strains, plasmids and enzymes

Saccharomyces cerevisiae strains *TOP1 TOP2* (JCW25), *TOP1 top2-4* (JCW26), *Atop1 TOP2* (JCW27) and *Atop1 top2-4* (JCW28) are

derivatives of FY251 (S288C genetic background) and have previously been described (Trigueros & Roca, 2002). Schemes of plasmids YEpTA1 (4.5 Kb), YCpTA1 (4.5 Kb), YCp50 (7.9 Kb), YEp13 (10.7 Kb), YCp50 *pGAL1:LacZ* and YCp321 are illustrated in the figures. YCp321 contains two 58-bp direct repeats recognized by the site-specific recombinase from *Z. rouxii* (Matsuzaki *et al*, 1990). pHM53 carries the *Z. rouxii* recombinase gene under the galactose-inducible GAL1 promoter of *S. cerevisiae* (Roca *et al*, 1992). All plasmids were introduced in yeast using the lithium acetate method (Ito *et al*, 1983). Topo I of vaccinia virus was purified from *E. coli* cells harboring the expression clone pET11vvtop1 (Shuman *et al*, 1988). Topo I of *S. cerevisiae* was purified from yeast cells harboring the expression clone YCpGAL-TOP1 (Bjornsti & Fertala, 1999). Topo II of *S. cerevisiae* was purified from yeast cells carrying the expression clone YEpTOP2GAL1 (Worland & Wang, 1989).

Yeast growth and DNA extraction

Yeast cells were grown at 28°C in synthetic selective media. Thermal inactivation of topo II was done during exponential growth (OD ~ 0.8) by shifting cell cultures to 37°C. Cells from a 50-ml culture were harvested and washed in Tris–HCl 10 mM (pH 8) EDTA 1 mM, at 4°C. Cell pellets were suspended in 300 µl water, 300 µl phenol and 300 µl glass-beads (425–600 µm Sigma), and disrupted in FastPrep apparatus (10 s at power 5). The aqueous fractions were extracted once more by phenol and DNA was recovered by EtOH precipitation.

Solubilization of yeast circular minichromosomes

Yeast cells from 100-ml cultures were harvested and washed in Tris–HCl 10 mM (pH 8) EDTA 1 mM at 4°C. Cell pellets were suspended at 4°C in 1 ml of buffer L (Tris–HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, ethylene glycol tetraacetic acid 1 mM, NaCl 150 mM, Dithiothreitol 1 mM, Triton X-100 0.1%, pepstatin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, PMSF 1 mM). About 1 ml of glass beads was added, and the suspension was stirred during 30 s at 4°C for six times. Supernatants were recovered after two successive centrifugations (20,000 × *g* at 4°C) and then loaded on a 500-µl Sephacryl S-300 column equilibrated with buffer L at 4°C. Yeast circular minichromosomes were eluted in the first filtration volume. Eluted minichromosomes were supplemented with an excess (1 mg/ml) of a negatively supercoiled plasmid (2 kb) that served as internal control for topoisomerase activity.

Topoisomerase reactions

Mixtures containing yeast minichromosomes and control plasmids were adjusted to 8 mM MgCl₂ and 1 mM ATP (when indicated), pre-incubated at 30°C for 5 min, and then supplemented with catalytic amounts of topoisomerases. Where indicated, mixtures were supplemented instead with serial dilutions of supernatants obtained after glass bead disruption of *TOP1 TOP2* (JCW25) yeast cells, as described above. Following incubations at 30°C, reactions were quenched at the indicated times by adding one volume of buffer K (EDTA 40 mM, SDS 1%, proteinase K, RNase A). Following 1 h of incubation at 60°C, samples were extracted by phenol, and DNA was recovered by EtOH precipitation.

DNA electrophoresis and topology analysis

Agarose concentration (0.6–1%) was adjusted according to the plasmid size. Electrophoreses were carried out at 25°C in Tris/Borate/EDTA (TBE) buffer plus 0.6 µg/ml of chloroquine at 50 V for 14 h in the first dimension (top to bottom), and TBE buffer plus 3 µg/ml of chloroquine at 60 V for 8 h in the second (left to right). DNA was blot-transferred to a nylon membrane and probed with ³²P-labeled DNA obtained by random priming. *Lk* distributions were analyzed by quantifying the amount of topoisomer populations displayed by phosphorimaging the probed gel-blot. DNA supercoiling density (σ) was calculated with $\sigma = \Delta Lk/Lk^0$ (Wang *et al*, 1982). ΔLk was determined in the 2D gel images by counting the number of *Lk* topoisomers spanning from the center of the interrogated *Lk* distribution to the center of the *Lk* distribution obtained by relaxing the naked DNA circle *in vitro* (Lk^0). Lk^0 was calculated with N/h^0 , where N is the DNA circle size (in bp) and h^0 (10.5 bp/turn) the most probable helical repeat of DNA in the relaxation conditions used (Horowitz and Wang, 1984).

Supplementary information for this article is available online: <http://emboj.embopress.org>

Acknowledgments

We thank Javier Salceda and Antonio Rodríguez-Campos for technical advice and discussion. This research was supported by the Plan Nacional de I+D+I of Spain (grants BFU2008-00366 and BFU2011-23851 to JR), and the Pla de Recerca de Catalunya (grant 2009SGR01222 to JR).

Author contributions

XF and JR conceived the research, designed experiments and analysed data. XF, OD-I and BM-G prepared materials and conducted experiments. JR wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Bancaud A, Conde e Silva N, Barbi M, Wagner G, Allemand JF, Mozziconacci J, Lavelle C, Croquette V, Victor JM, Prunell A, Viovy JL (2006) Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nat Struct Mol Biol* 13: 444–450
- Bancaud A, Wagner G, Conde ESN, Lavelle C, Wong H, Mozziconacci J, Barbi M, Sivolob A, Le Cam E, Mouawad L, Viovy JL, Victor JM, Prunell A (2007) Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Mol Cell* 27: 135–147
- Bermejo R, Doksani Y, Capra T, Katou YM, Tanaka H, Shirahige K, Foiani M (2007) Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev* 21: 1921–1936
- Bermejo R, Capra T, Gonzalez-Huici V, Fachinetti D, Cocito A, Natoli G, Katou Y, Mori H, Kurokawa K, Shirahige K, Foiani M (2009) Genome-organizing factors Top2 and Hmo1 prevent chromosome fragility at sites of S phase transcription. *Cell* 138: 870–884
- Bermudez I, Garcia-Martinez J, Perez-Ortin JE, Roca J (2010) A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen-DNA photobinding. *Nucleic Acids Res* 38: e182
- Bjornsti MA, Fertala J (1999) Overexpression and purification of DNA topoisomerase I from yeast. *Methods Mol Biol* 94: 179–186
- Brill SJ, DiNardo S, Voelkel-Meiman K, Sternglanz R (1987) Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA [published erratum appears in *Nature* 1987 Apr 23-29;326 (6115):812]. *Nature* 326: 414–416
- Brill SJ, Sternglanz R (1988) Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* 54: 403–411
- Brooks TA, Hurley LH (2009) The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nat Rev Cancer* 9: 849–861
- Charvin G, Bensimon D, Croquette V (2003) Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9820–9825
- Chen SH, Chan NL, Hsieh TS (2013) New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 82: 139–170
- Corbett KD, Berger JM (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33: 95–118
- Durand-Dubief M, Persson J, Norman U, Hartsuiker E, Ekwall K (2010) Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression *in vivo*. *EMBO J* 29: 2126–2134
- El Hage A, French SL, Beyer AL, Tollervey D (2010) Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis. *Genes Dev* 24: 1546–1558
- French SL, Sikes ML, Hontz RD, Osheim YN, Lambert TE, El Hage A, Smith MM, Tollervey D, Smith JS, Beyer AL (2011) Distinguishing the roles of Topoisomerases I and II in relief of transcription-induced torsional stress in yeast rRNA genes. *Mol Cell Biol* 31: 482–494
- García-Rubio ML, Aguilera A (2012) Topological constraints impair RNA polymerase II transcription and causes instability of plasmid-borne convergent genes. *Nucleic Acids Res* 40: 1050–1064
- Gellert M, Mizuuchi K, O’Dea MH, Nash HA (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3872–3876
- Giaever GN, Wang JC (1988) Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55: 849–856
- Gilbert N, Allan J (2014) Supercoiling in DNA and chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 25: 15–21
- Hatfield GW, Benham CJ (2002) DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 36: 175–203
- Horowitz DS, Wang JC (1984) Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling. *J Mol Biol* 173: 75–91
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163–168
- Joshi RS, Pina B, Roca J (2010) Positional dependence of transcriptional inhibition by DNA torsional stress in yeast chromosomes. *EMBO J* 29: 740–748
- Joshi RS, Pina B, Roca J (2012) Topoisomerase II is required for the production of long Pol II gene transcripts in yeast. *Nucleic Acids Res* 40: 7907–7915
- Jupe ER, Sinden RR, Cartwright IL (1993) Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at a *Drosophila* heat shock gene locus. *EMBO J* 12: 1067–1075
- Kegel A, Betts-Lindroos H, Kanno T, Jeppsson K, Strom L, Katou Y, Itoh T, Shirahige K, Sjogren C (2011) Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature* 471: 392–396

- Kim RA, Wang JC (1989) Function of DNA topoisomerases as replication swivels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 208: 257–267
- King IF, Yandava CN, Mabb AM, Hsiao JS, Huang HS, Pearson BL, Calabrese JM, Starmer J, Parker JS, Magnuson T, Chamberlain SJ, Philpot BD, Zylka MJ (2013) Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 501: 58–62
- Koster DA, Croquette V, Dekker C, Shuman S, Dekker NH (2005) Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature* 434: 671–674
- Koster DA, Palle K, Bot ES, Bjornsti MA, Dekker NH (2007) Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* 448: 213–217
- Kouzine F, Levens D (2007) Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Front Biosci* 12: 4409–4423
- Kouzine F, Sanford S, Elisha-Feil Z, Levens D (2008) The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 15: 146–154
- Kouzine F, Gupta A, Baranello L, Wojtowicz D, Ben-Aissa K, Liu J, Przytycka TM, Levens D (2013) Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol* 20: 396–403
- Kramer PR, Sinden RR (1997) Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells. *Biochemistry* 36: 3151–3158
- Krogh BO, Shuman S (2000) Catalytic mechanism of DNA topoisomerase IB [In Process Citation]. *Mol Cell* 5: 1035–1041
- Lavelle C, Victor JM, Zlatanova J (2010) Chromatin fiber dynamics under tension and torsion. *Int J Mol Sci* 11: 1557–1579
- Liu LF, Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7024–7027
- Ljungman M, Hanawalt PC (1995) Presence of negative torsional tension in the promoter region of the transcriptionally poised dihydrofolate reductase gene in vivo. *Nucleic Acids Res* 23: 1782–1789
- Lotito L, Russo A, Chillemi G, Bueno S, Cavalieri D, Capranico G (2008) Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation of telomere-proximal genes by TOP1 deletion. *J Mol Biol* 377: 311–322
- Matsumoto K, Hirose S (2004) Visualization of unconstrained negative supercoils of DNA on polytene chromosomes of *Drosophila*. *J Cell Sci* 117: 3797–3805
- Matsuzaki H, Nakajima R, Nishiyama J, Araki H, Oshima Y (1990) Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid. *J Bacteriol* 172: 610–618
- Mizutani M, Ohta T, Watanabe H, Handa H, Hirose S (1991a) Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 718–722
- Mizutani M, Ura K, Hirose S (1991b) DNA superhelicity affects the formation of transcription preinitiation complex on eukaryotic genes differently. *Nucleic Acids Res* 19: 2907–2911
- Mondal N, Parvin JD (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413: 435–438
- Mondal N, Zhang Y, Jonsson Z, Dhar SK, Kannapiran M, Parvin JD (2003) Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity. *Nucleic Acids Res* 31: 5016–5024
- Naughton C, Avlonitis N, Corless S, Prendergast JG, Mati IK, Eijk PP, Cockroft SL, Bradley M, Ylstra B, Gilbert N (2013) Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures. *Nat Struct Mol Biol* 20: 387–395
- Nelson P (1999) Transport of torsional stress in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14342–14347
- Parvin JD, Sharp PA (1993) DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* 73: 533–540
- Pedersen JM, Fredsoe J, Roedgaard M, Andreassen L, Mundbjerg K, Kruhoffer M, Brinch M, Schierup MH, Bjerregaard L, Andersen AH (2012) DNA topoisomerases maintain promoters in a state competent for transcriptional activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 8: e1003128
- Prunell A (1998) A topological approach to nucleosome structure and dynamics: the linking number paradox and other issues. *Biophys J* 74: 2531–2544
- Roca J, Gartenberg MR, Oshima Y, Wang JC (1992) A hit-and-run system for targeted genetic manipulations in yeast. *Nucleic Acids Res* 20: 4671–4672
- Roca J, Wang JC (1996) The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells* 1: 17–27
- Roca J (2011) The torsional state of DNA within the chromosome. *Chromosoma* 120: 323–334
- Salceda J, Fernandez X, Roca J (2006) Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *EMBO J* 25: 2575–2583
- Schultz MC, Brill SJ, Ju Q, Sternglanz R, Reeder RH (1992) Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes Dev* 6: 1332–1341
- Shuman S, Golder M, Moss B (1988) Characterization of vaccinia virus DNA topoisomerase I expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 16401–16407
- Sperling AS, Jeong KS, Kitada T, Grunstein M (2011) Topoisomerase II binds nucleosome-free DNA and acts redundantly with topoisomerase I to enhance recruitment of RNA Pol II in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12693–12698
- Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. [see comments]. *Science* 279: 1534–1541
- Tabuchi H, Hirose S (1988) DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter. *J Biol Chem* 263: 15282–15287
- Teves SS, Henikoff S (2014) Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* 21: 88–94
- Thakurela S, Garding A, Jung J, Schubeler D, Burger L, Tiwari VK (2013) Gene regulation and priming by topoisomerase IIalpha in embryonic stem cells. *Nat Commun* 4: 2478
- Travers A, Muskhelishvili G (2005) Bacterial chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 15: 507–514
- Trigueros S, Roca J (2001) Circular minichromosomes become highly recombinogenic in topoisomerase-deficient yeast cells. *J Biol Chem* 276: 2243–2248
- Trigueros S, Roca J (2002) Failure to relax negative supercoiling of DNA is a primary cause of mitotic hyper-recombination in topoisomerase-deficient yeast cells. *J Biol Chem* 277: 37207–37211
- Wang JC, Peck LJ, Becherer K (1982) DNA supercoiling and its effects on DNA structure and function. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 47: 85–91
- Wang JC (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys* 31: 107–144
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 430–440
- Worland ST, Wang JC (1989) Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264: 4412–4416

Resum dels resultats i discussió general

Comentari general previ

La dinàmica de la cromatina és un dels temes de la biologia cel·lular que manté a dia d'avui moltes incògnites de difícil abordatge. La seva estructura, senyalització, modificacions, remodelació durant la transcripció, la replicació i la condensació són, entre d'altres, camps d'estudi fèrtils per explorar.

En els treballs presentats en aquesta memòria s'ha intentat aprofundir en alguns aspectes del funcionament de la topoisomerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* i els seus efectes a la dinàmica de la cromatina d'aquest organisme des de la perspectiva de les seves preferències de transport, tant a l'ADN nu com a l'ADN cromatinitzat. A causa del caràcter bàsic de les qüestions estudiades, es pot assumir que els resultats obtinguts són, en gran part, extrapolables a la resta de cèl·lules eucariotes, incloent els eucariotes superiors.

Es va escollir el llevat comú per la gran bondat d'aquest model per treballar sense gaire limitacions ni complicacions instrumentals i també per la disponibilitat d'una bona col·lecció de soques mutants en les diferents topoisomerases d'aquest organisme, així com d'una extensa col·lecció de plasmidis *shuttle* llevat-bacteri, que n'expressaven les topoisomerases, per fer-les servir tant *in vitro*, després de purificar la proteïna expressada, com *in vivo*, en condicions constitutives o induïbles, segons cada necessitat experimental. Aquest material estava disponible al laboratori del Dr. Joaquim Roca, procedent en part del laboratori del Dr. James C Wang, en el qual s'han fet algunes de les aportacions més clàssiques i seminals en el camp de la topologia biològica.

El treball té dos parts, a la primera part s'ha estudiat les preferències de transport d'ADN per la topoisomerasa II sobre l'ADN nu, en relació a la simplificació de la topologia que produeixen en la distribució tèrmica. Els resultats obtinguts han estat descriptius i confirmatoris de la literatura existent, a més de permetre fer hipòtesis sobre les possibles causes i la seva interpretació biològica. En segon lloc s'ha estudiat les preferències relaxadores d'ADN de les topoisomerases sobre minicromosomes, així com els desequilibris generadors de tensió superhelicoidal positiva i negativa i les preferències dels enzims per solventar-los. També s'ha fet una interpretació funcional de les diferències observades.

Preferències de transport d'ADN per la topoisomerasa II sobre l'ADN nu

L'any 1997 Rybenkov va publicar que els productes de reacció de la topoisomerasa II (nusos, cadenats i topoisòmers) mantenien proporcions diferents que les esperades segons el seu equilibri termodinàmic, el mateix any Pulleyblank va suggerir que la topoisomerasa II operava de forma similar al dimoni plantejat per Maxwell, deixant passar solament uns determinats segments d'ADN de entre tots els possibles, allunyant així la distribució de topoisòmers de l'equilibri tèrmic i consumint energia en forma d'ATP en aquesta procés. Aquesta comparació volia dir, que per l'enzim no tots els segments a transportar eren iguals i que per tant aquest en feia una selecció, aquest plantejament però, no aclaria res sobre quin era el mecanisme de selecció, al qual podria dependre de la geometria i topologia de l'ADN interactuant o alternativament, d'algun mecanisme selector propi de la proteïna.

A la primera part de la tesi es va estudiar els possibles mecanismes que podria fer servir la topoisomerasa II per distingir entre diferents segments T, es a dir transportats, a l'ADN nu, que li permetria eludir l'equilibri termodinàmic a les distribucions de productes topològics generats. En els articles presentats s'ha confirmat les diferències entre les topoisomerases I i II i a més s'ha descrit que el centre de la nova distribució de topoisòmers, que anomenem L_k s, està més elevat quan actua la topoisomerasa II. Finalment s'ha formulat dos hipòtesis, que es poden considerar com a complementàries ja que l'una no exclou l'altra, per poder explicar el mecanisme que hi ha darrera de les diferències entre l'equilibri termodinàmic i el produït per la topoisomerasa II de llevat amb la participació de la hidròlisi d'ATP.

El primer que es va fer per estudiar rigorosament els canvis causats per la topoisomerasa II a les distribucions de topoisòmers, va ser comparar relaxacions *in vitro* de plasmidis de diferent mida i seqüència i es va quantificar aquest canvi en forma de variàncies i mitjanes. El canvi observat a la variància i a la mitjana va ser independent de la seqüència nucleotídica, per contra, la mida dels plasmidis va afectar la magnitud dels canvis causats per la topoisomerasa II.

Per sota de les 1,4 kb les desviacions causades per la topoisomerasa II van ser poc apreciables i per sobre de les 3 kb, el quocient de les variàncies varia amb el cocient de la diferència de mitjanes entre la mida del plasmidi, de forma molt discreta però proporcionalment. La reducció de la variància observada

va ser comparable a la reportada per Rybenkov. Totes les variacions de la distribució de topoisòmers ocasionades per les topoisomerasa II van ser revertides per una incubació amb topoisomerasa I, així doncs resulta molt poc probable que aquest efecte sigui causat per una característica estructural de l'ADN o per un contaminant a les reaccions.

Respecte del valor més elevat de la mitjana a les distribucions de topoisòmers produïdes per la topoisomerasa II, això sembla indicar una preferència de l'enzim per invertir creuaments negatius quan els plasmidis estan propers al seu estat de mínima tensió, l' Lk^0 .

La manera més senzilla d'explicar aquesta asimetria podria ser una deformació del segment G, produïda per la unió de la topoisomerasa II abans del pas del segment T al seu través (Vologodskii *et al*, 2001). La inversió d'un creuament negatiu quan l' Lk és proper a l' Lk^0 podria resultar afavorit si es deforma la doble hèlix en dos maneres, variant el Tw o el Wr o una combinació dels dos. En el primer cas, quan s'incrementa l'*helical repeat* (reducció del *twist*) o en el segon cas, quan es forma una corba levogira (reducció del *writhe*) al llarg del segment G, al agafar aquest una forma retorçada levogira per la unió de la topoisomerasa II, l'enzim tendiria a relaxar aquestes deformacions per acabar afavorint eliminació de creuaments negatius.

Per comprovar la hipòtesis de la deformació del segment G es va fer dos tipus d'experiments. En primer lloc es va testar l'efecte directe de la unió de la topoisomerasa II en elevada proporció molar (però sense fer el cicle catalític) en relaxacions efectuades per la topoisomerasa I i no es va observar diferències respecte de les relaxacions fetes sense topoisomerasa II unida. Amb una finalitat similar, es va fer experiments de lligació de plasmidis en presència d'elevades proporcions molars de topoisomerasa II, sense enzim i amb girasa com a control positiu de deformació. En aquest cas tampoc es va fer visible cap canvi a les distribucions, mentre que si es va alterar el control positiu, indicant que la topoisomerasa II no deforma el segment G, cosa que si va fer la girasa.

Aquestes observacions es van complementar amb experiments de tipus més indirecte consistents a estudiar la eficiència de ciclació en fragments d'ADN de mides creixents. Aquesta sèrie d'experiments van mostrar que la variació de l'eficiència de ciclació en fragments sols o units a la topoisomerasa II

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

mantenien una periodicitat similar a l'eficiència de ciclació, mentre que la unió a la girasa augmentava un ordre de magnitud aquesta eficiència i variava la periodicitat de la eficiència respecte de l'observada en fragments sols. Fins i tot, la unió a topoisomerasa II va reduir lleugerament l'eficiència de ciclació. En experiments paral·lels de *filter binding* en que es va addicionar l'inhibidor AMP-PNP per formar un torus amb la topoisomerasa II al voltant dels dímers i trímers circulars, per tal de poder-los separar per unió de la proteïna a un filtre de fibra de vidre, es va poder comprovar que la presència de la topoisomerasa II augmentava la proporció de dímers i trímers circulars per sobre dels monòmers. Aquesta observació es va interpretar com una tendència a afavorir la unió simultània de varis segments d'ADN per la topoisomerasa II, la qual cosa facilitaria la seva lligació conjunta per la ligasa d'*E. coli*.

El experiments explicats anteriorment ens van fer descartar una alteració significativa del segment G i ens va fer pensar que la capacitat de la topoisomerasa II per simplificar la topologia dels plasmidis devia de correspondre a alguna característica del segment T i no del segment G.

La no deformació de l'ADN per la topoisomerasa II contrasta amb el publicat de la topoisomerasa IV, (Laponogov *et al*, 2009) en el sentit que aquesta doblega marcadament el segment G. La topoisomerasa II i la topoisomerasa IV podrien diferir doncs, en la seva forma d'unio a l'ADN.

La característica que podria fer servir l'enzim per decidir quins segments seran transportats, podria ser conformacions locals dels potencials segments T o dels seus angles de juxtaposició en relació al segment G, un exemple d'aquesta possibilitat és la topo IV que s'uneix a l'ADN superenrotllat (+) i (-) amb similar eficiència, però relaxa el superenrotllat (+) més depressa (Crisona *et al*, 2000). Aquests paràmetres deuen de ser més rellevants a les molècules d'ADN molt superenrotllades i poc a les relaxades. L'activitat transportadora d'ADN de la topo IV podria ser sensible a la quiralitat dels creuaments, imposada per la superhèlix levogira formada per l'ADN amb superenrotllament positiu, mes que al *Twist* o al *Writhe* locals. En canvi quan els valors de Lk s'aproximen a Lk^0 , tant els creuaments com la seva geometria mitjana (+) i (-) resultarien indistingibles, no hauria característiques que permetin diferenciar si els segments T potencials estableixen creuaments (+) o (-) en relació als segments G.

Com s'ha comentat anteriorment, a mida que relaxem plasmidis de mida més petita, obtenim distribucions de topoisòmers de menor variància, així doncs, si la l'ADN efectiu s'escurés per la unió a la topoisomerasa II, la variància podria ser menor que la corresponent a l'equilibri termodinàmic. La longitud efectiva de l'ADN podria ser reduïda si diversos segments d'ADN quedessin units simultàniament per una sola molècula de topoisomerasa II. Aquest raonament s'afegeix al resultat vist en els experiments de *filter binding* que indicaven una major proporció de dímers i trimers circulars quan la topoisomerasa II era adicionada a reaccions de lligació, fent intuir la interacció d'un tercer segment com a base de la simplificació de les distribucions de topoisòmers per la topoisomerasa II en plasmidis propers al seu estat relaxat. Per altra banda, l'alta eficiència de la topoisomerasa II eliminant cadenats d'ADN circular en estat superenrollat (Roca, 2001), suggereix també que la topoisomerasa II, a més de interaccionar amb el segment G i el segment T, podria interaccionar amb un tercer segment d'ADN inter o intramolecular, la base estructural per una triple interacció podria ser l'existència de dos llocs d'interacció per als potencials segments T a la molècula de topoisomerasa II.

Per trobar indicis d'aquesta triple interacció es va fer un assaig de competència a partir d'un plasmidi superenrollat que podia ser convertit en un encadenament de dos plasmidis superenrotllats menors, per acció d'una resolvasa. A una barreja equimolar de les dues formes se li va afegir topoisomerasa II i el resultat va ser que l'enzim va tenir més afinitat per els encadenaments que per els cercles parentals. Aquest resultat d'una major afinitat de la topoisomerasa II per les formes encadenades es podria explicar per l'augment de la probabilitat de juxtaposició d'un tercer segment que tindrien els encadenaments. Un node triple d'ADN es formaria fàcilment en el producte de la resolvasa, per qualsevol creuament d'un dels plectonemes i qualsevol segment de l'altre anell que tingues encadenat. Per contra, portar tres segments intramoleculars junts en el plasmidi parental relaxat requereix un *writhe* extra a l'ADN que fa més improbable la triple interacció. Com que en una interacció dels dos membres de l'encadenament, la probabilitat d'una triple interacció de segments d'ADN està maximitzada, s'explicaria perquè la topo II és més eficient decatenant anells amb ADN superenrollat.

A més de la reducció de la longitud efectiva de l'ADN, hi ha un altre característica de la reacció de la topoisomerasa II que explicaria la reducció de la variància i l'augment de l' Lk_s per sobre de l' Lk^0 . Les dues

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

coses passarien si la topoisomerasa II tingués una certa preferència per eliminar creuaments (-) sobre els (+). L'eliminació asimètrica de creuaments (-) podria ser el possible mecanisme clau de la topoisomerasa II per incrementar el número d'enllaç del centre de la distribució respecte de Lk^0 , alhora que reduiria la variància de les distribucions allunyant-les de l'equilibri tèrmic.

La propietat que la topoisomerasa II faria servir per distingir entre els segments T d'ADN que desfan un creuament positiu o un de negatiu quan el plasmidi està propera Lk^0 podria ser la probabilitat de juxtaposició de tres segments d'ADN, la qual estaria condicionada a la quiralitat formada per la triple interacció. Quan la topoisomerasa inicia la inversió d'un creuament negatiu, qualsevol tercer segment interactuant quedaria dins de la llaçada formada pel creuament negatiu i això resulta molt poc probable quan el perímetre de la llaçada és petit. Aquesta probabilitat podria augmentar si la llaçada fos prou gran, però en qualsevol cas la probabilitat d'impediment serà relativament més baixa, es a dir, que els creuaments negatius seran invertits sense gaire problema d'interferència d'un tercer segment intramolecular. En el cas dels creuaments positius, un tercer segment tindrà via lliure per interferir, ja que sempre quedarà fora de la llaçada que forma el creuament positiu. Així doncs, els creuaments negatius casi sempre serien transportats, mentre que els creuaments positius quedarien ocasionalment sense transportar per la interferència d'un tercer segment.

Cal observar que si en un plasmidi relaxat, el primer potencial segment T en interaccionar amb el complex format per el segment G i la topoisomerasa II, fos transportat immediatament, la probabilitat mitjana d'eliminar un creuament (-) o un (+) seria similar i poc canvi podríem esperar a la variància de la distribució, excepte en el cas molt improbable de col·lisions simultànies. Aquest hipotètic transport, no immediat, explicaria doncs la possibilitat de interacció de tres segments simultàniament, aplicable a la simplificació per un impediment quiral i a la simplificació per reducció de la longitud efectiva de la molècula circular. Com que un primer potencial segment T no serà immediatament transportat, el complex resultant, dividirà la molècula d'ADN en dos dominis menors i llavors, serà més difícil que un segon potencial segment T intramolecular interactui amb la topoisomerasa interferint la seva funció, reduint així, el valor de la variància ja que el domini proporcionador del segon potencial segment T serà més curt que

el plasmidi sencer. La facilitat d'interacció amb diversos segments d'ADN està limitada per la longitud total de l'ADN i per tant, en plasmidis més petits la reducció de la variància va disminuint.

En el cas de plasmidis prou grans, una topoisomerasa II unida al segment G fàcilment podrà interaccionar amb dos potencials segments T intramoleculars si aquests estan a una distància mínima al llarg de l'ADN, que és aproximadament de 1 kb en el cas de l'ADN lineal, això és probablement similar en plasmidis relaxats. En canvi, en els plasmidis petits, els dominis establerts després de la interacció amb el primer potencial segment T intramolecular, poden arribar a ser més curts que aquesta 1Kb mínima per poder doblegar-se fàcilment i formar un segon potencial segment T. El plasmidi esdevé funcionalment massa curt i la probabilitat d'interacció amb un segon potencial segment T intramolecular disminueix. Això explicaria la dependència de la capacitat simplificadora de la topoisomerasa II amb la longitud de l'ADN reportada aquí.

El mecanisme de simplificació de la topologia basat en la selecció de segments T plantejat fins aquí, depèn de la flexibilitat de la doble hèlix i de la quiralitat dels creuaments formats amb l'enzim, és un plantejament teòric recolzat en experiments indirectes que suggereixen que aquest funcionament podria ser cert. Posteriorment vam especular amb la possibilitat que l'estructura i el funcionament de l'enzim, el qual podiem manipular experimentalment, també pogués tenir alguna relació amb la seva capacitat per simplificar les distribucions de topoisòmers per sota del seu valor d'equilibri. En aquesta aproximació, l'energia del segment T també tindria un paper en la probabilitat de transport i els experiments plantejats en aquest sentit van resultar ser molt demostratius. Aquest nou plantejament no és oposat ni exclouent amb el plantejament anterior, per contra podria interpretar-se com a complementari. Experiments posteriors hauran de determinar si tot el que hem proposat passa *in vivo*, i en el supòsit que sigui així, quina de les propostes és la determinant o si totes dues contribueixen en certa mesura a la desviació de l'equilibri de les distribucions produïdes per la topoisomerasa II.

Per desenvolupar aquesta segona hipòtesis es va plantejar que la sortida C-terminal podria presentar una certa dificultat alhora de ser franquejada per els segments T i solament els que tenen prou energia torsional aconseguirien travessar-la, mentre que els menys energètics retornarien després de ser atrapat

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

per la porta N-terminal de l'enzim, sortint pel mateix lloc per on havien entrat. Aquest podria ser un criteri de selecció per decidir quins segments T tenen possibilitats de ser transportats.

Es pot assumir que la probabilitat de captura d'un segment T està determinada bàsicament per la dinàmica de les col·lisions entre l'ADN i la topoisomerasa II, la qual és una ATPasa i en presència d'ATP funciona atrapant el que queda dins dels seus dominis en pinça. Per aconseguir un resultat diferent al que dicta la termodinàmica cal que la probabilitat de captura sigui diferent de la probabilitat de transport, així doncs, el mecanisme que simplifica la topologia d'equilibri de l'ADN hauria d'estar després de l'etapa de captura dels potencials segments T quan aquests han arribat a la cambra central i encara tenen la possibilitat de desfer el camí fet a través de la escissió oberta al segment G de l'ADN, revertint el seu transport. Aquesta possibilitat explicaria que la captura del segment T no sigui l'únic determinant del transport d'ADN. La capacitat de *backtracking* del segment T ja va estar observada a la girasa amb anterioritat (Kampranis *et al*, 1999).

Per avaluar aquesta hipotesi es va estudiar el transit del segment T a través de les diferents comportes que troba l'ADN al creuar la topoisomerasa II. L'enzim té una primera comporta, la formada per les pinces N-terminal, seguida per el canal central de pas, la comporta de l'ADN i finalment la comporta de sortida formada pel domini C-terminal.

Per poder estudiar amb rigor les diferències entre topoisomerases es va plantejar estudiar en termes de probabilitat, distribucions relaxades, catalitzades per les topoisomerases I i II. Es va poder mesurar les àrees corresponents als topoisòmers amb un $\Delta Lk = 0$ i $\Delta Lk = -2$ en un densitograma fet a partir de la imatge electroforètica obtinguda per fotografia digital. Es va escollir dos topoisòmers separats entre ells per dos unitats d' Lk , perquè en un cicle de reacció de la topoisomerasa II, l' Lk canvia dos unitats. Així, si considerem el quocient entre les àrees corresponents als topoisòmers $\Delta Lk = -2$ i $\Delta Lk = 0$, com equivalent al quocient de les probabilitats de cada topoisòmer, obtenim 0,35 per la distribució corresponent a la topoisomerasa I i 0,17 per la topoisomerasa II. La relació corresponent a la topoisomerasa I, de 0,35, és la que produiria l'equilibri termodinàmic i en el cas de la topoisomerasa II hauria de ser la mateixa si el transport depengués únicament de la captura, però el resultat, de 0'17, és clarament inferior.

Per estudiar la probabilitat de captura de la topoisomerasa II es va fer servir un inhibidor que permet un sol cicle de transport, l'AMP-PNP, de forma que el segment T capturat no pot tornar enrere perquè els dominis en pinça N-terminalns queden tancats i l'enzim agafa una conformació en forma d'anell entorn del plasmidi que ha patit el transport. El complex plasmidi-topoisomerasa II pot ser separat amb un filtre de fibra de vidre, pel seu posterior anàlisi electroforètic.

Fent servir l'inhibidor AMP-PNP amb la topoisomerasa II sobre de topoisòmers purificats prèviament, amb $\Delta Lk = -2$ i $\Delta Lk = 0$ i posterior electroforesis i densitometria, es va poder calcular la probabilitat de la conversió $\Delta Lk = -2$ a $\Delta Lk = 0$, que va resultar ser de 0,5, mentre que la inversa, per passar de $\Delta Lk = 0$ a $\Delta Lk = -2$ va ser de 0,17. Amb aquestes dues probabilitats es va calcular la relació $0,5 / 0,17 = 0,34$ la qual va resultar molt propera a la relació trobada abans, de 0,35 i dictada per la termodinàmica, de la topoisomerasa I. Cal recordar que l'inhibidor impedeix el retorn del segment T. Així doncs, podem concloure que la probabilitat de captura és diferent de la probabilitat de transport i per tant la causa de la simplificació hauria d'estar després del moment de la captura del segment T.

Per aconseguir aquesta diferència entre la probabilitat de captura i la probabilitat de transport, es pot assumir que una part dels segments T capturats són descartats i això solament pot passar si alguns dels capturats són retornats i acaben sortint per la porta N-terminal.

Per comprovar si el retorn per la porta N-terminal era possible es va purificar un topoisòmer de una distribució produïda per la topoisomerasa II, aquest topoisòmer es va escollir per la particularitat de tenir un Lk inferior a l' Lk_s a 15°C, però que a 40°C esdevenia major a l' Lk_s . Per fer aquest experiment es va utilitzar una topoisomerasa mutada en el seu domini C-terminal, incorporant dos residus de cisteïna, un a cada dímer, de forma que podien fer un pont disulfur de cistina, estable en absència de reactius amb radicals sulfidril, de forma que no es permetia la sortida de l'ADN transportat. Es va deixar que el topoisòmer amb Lk_i patís l'acció de la topoisomerasa II amb la porta C-terminal tancada, en presència d'ATP, tot a 15°C i d'aquesta barreja de reacció se'n va retirar la meitat i l'altre meitat es va deixar cursar 5 minuts més a 40°C i es van analitzar les dues alíquotes en gel d'agarosa es va veure que a 15°C casi la meitat dels plasmidis havia passat de tenir Lk_i a tenir Lk_{i+2} mentre que en el cas dels plasmidis que van

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

finalitzar la reacció a 40°C, la major part dels topoisòmers amb Lk_{i+2} va passar a tenir Lk_{i-2} . Això solament pot ocórrer si les cadenes transportades però no alliberades poden refer el camí i tornar a sortir per la porta d'entrada N-terminal. Per acabar de confirmar aquest punt, en una reacció en paral·lel es va afegir l'inhibidor AMP-PNP en lloc del co-substracte natural, l'ATP i en aquest cas, en que l'inhibidor impedeix l'obertura del domini d'entrada N-terminal, no es va produir el retorn al canviar a 40°C. Amb aquest experiment es demostra que per a un segment T acabat de transportar, la porta N-terminal no és un obstacle per retrocedir el transport i quan impedim el *backtracking* amb inhibidors com l'AMP-PNP, les distribucions produïdes són similars a les tèrmiques.

En un sentit similar es va obtenir distribucions de topoisòmers relaxades per una topoisomerasa II *wt*, es a dir, simplificades, i es van tornar a incubar amb topoisomerasa II obtinguda a partir de una soca de llevat $\Delta Top1$, per tant, sense presència possible de potencial topoisomerasa I contaminant, es va afegir ATP i seguidament a una alíquota se li va afegir una concentració en excés de l'inhibidor AMP-PNP. L'enzim estava també en concentracions estequiomètriques ja que a cada cicle es consumia una proteïna. Analitzant el resultat en gel d'agarosa es va veure que en presència de l'inhibidor, que impedia el *backtracking*, les distribucions simplificades de la topoisomerasa II van resultar eixamplades, en major grau quan major era la proporció de la topoisomerasa II utilitzada, ja que en aquest cas l'enzim no es podia reciclar a causa de la presència de l'inhibidor.

A més de la capacitat de fer *backtracking*, el segon element requerit per aconseguir una reducció de la variància a la distribució de topoisòmers generada per la topoisomerasa II, és una dificultat per alliberar els segments T transportats, que forci el canvi de direcció del segment. Aquesta dificultat la pot oferir la sortida C-terminal.

Per provar aquesta hipòtesi es va preparar una topoisomerasa II per enginyeria genètica que tenia eliminats 83 residus de la porta C-terminal, de forma que qualsevol segment capturat hauria de ser transportat al no tenir cambra central on quedar retingut. El gen corresponent a la topoisomerasa II sense porta C-terminal es va clonar dins un plasmidi d'expressió que es va fer servir per transformar una soca de llevat $\Delta Top1$ i posteriorment es va purificar per assajar-la en relaxacions *in vitro*. El resultat de les

relaxacions va ser unes distribucions similars a la topoisomerasa I, però dependents d'ATP. L'activitat però, va ser molt baixa, cosa atribuïble a l'alteració de l'estabilitat estructural de l'enzim a causa de la deleció introduïda, de forma que si bé la porta C terminal no és imprescindible per relaxar l'ADN si que ho és per simplificar la topologia de les distribucions i també deu tenir algun paper en el manteniment de l'estabilitat de l'estructura quaternària de l'enzim.

En síntesi, si s'impedeix el *backtracking* del segment T o eliminem la porta de sortida C-terminal, la topoisomerasa II perd la seva capacitat per simplificar les distribucions de topoisòmers respecte de les distribucions tèrmiques. Els resultats obtinguts suggereixen que la captura del segment T està determinada per la termodinàmica de l'ADN i que el mecanisme simplificador està després de la captura. La porta de sortida C-terminal de la topoisomerasa II dificultaria o representaria un cert impediment per l'alliberament del segment T que acaba de ser capturat per proximitat i aquesta restricció al pas tindria l'efecte d'un mecanisme de correcció en base a la topologia després de capturar el segment T, per completar o cancel·lar el transport de l'ADN.

Els factors que controlen l'apertura de la porta C-terminal de les topoisomerases de tipus IIA són desconeguts, podrien dependre de la porta d'ADN, de forma que el tancament d'una permet l'apertura de l'altre, però imatges obtingudes a partir de cristalls de topoisomerases de tipus IIA amb les dues portes tancades indiquen que el tancament de la porta d'ADN no comporta obligatoriament l'apertura de la porta C-terminal (Schmidt *et al*, 2010; Wendorff *et al*, 2012). Així doncs l'obertura de la porta C-terminal podria ser desencadenada per l'impediment estèric causat per la presència del segment T recent transportat quan es tanca la porta d'ADN.

La sortida del segment T a través de la porta C-terminal és pot veure com un procés de dissociació, la taxa del qual ha d'estar afectada per l'entorn molecular, com per exemple, les interaccions electrostàtiques proteïna-ADN i la topologia global de l'ADN, especialment l'energia del creuament del segment G amb el segment T. En conseqüència, la dissociació del segment T serà probablement més ràpida quan el transport de l'ADN sigui energèticament més favorable i serà més lenta quan el transport estigui més proper de la topologia en equilibri. En aquest cas, si la porta N-terminal es torna a obrir abans

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

que el segment T hagi escapat per la porta C-terminal, els nostres resultats indiquen que hauria un retrocés del segment T i quedaria avortat l'esdeveniment de transport.

Suposem doncs que les distribucions d'equilibri de l'ADN, resulten estretades perquè els segments T que no aconseguen passar són els que desvien la topologia de l'ADN de l'equilibri i són aquells segments T que tenen major probabilitat de retornar o fer *backtrack*. D'acord amb la hipòtesi exposada, retirant la porta C-terminal s'hauria de incrementar la taxa de dissociació d'aquests segments T i això acabaria amb l'activitat simplificadora. Els resultats obtinguts al retirar aquest domini recolzen aquesta possibilitat.

La simplificació de la topologia de l'ADN per sota dels valors d'equilibri és una reacció desfavorable, com el superenrotllament de l'ADN per la girasa i no pot passar sense consum d'ATP. En canvi, en contrast al superenrotllament de l'ADN per la girasa, la quantitat d'energia lliure requerida per la topoisomerasa II per simplificar la distribució és insignificant, menys de l'1% de l'energia lliure total disponible a la hidròlisi de l'ATP. Actualment, totes les topoisomerases de tipus IIA consumeixen ATP, independentment de les condicions energètiques de les interconversions topològiques que catalitzin. Aquest fet fa pensar que el rol principal i ancestral de l'ATP podria de ser el manteniment de la coordinació de les comportes de l'enzim per prevenir lesions a la doble cadena d'ADN. La present aportació dóna un sentit addicional al paper de l'ATP, el de la correcció enzimàtica, la qual requereix algunes passes irreversibles per millorar la selectivitat de la reacció. L'activitat de correcció actua fent una selecció sobre els segments capturats, permetent el transport dels que estan més llunyans de l'equilibri termodinàmic. La hidròlisi irreversible d'ATP separa el primer pas de la selecció (captura) del segon pas (alliberament). Mentre que la probabilitat de captura del segment T depèn principalment de la topologia de l'ADN, la taxa d'alliberament del segment T depèn de la topologia de l'ADN i de la restricció que representa la porta C-terminal.

La rellevància biològica de la capacitat de les topoisomerases de tipus IIA per simplificar la topologia d'equilibri de l'ADN en solució ha estat vista com un enigma de les relaxacions *in vitro* sense utilitat coneguda en els sistemes *in vivo*. Pensem que aquest mecanisme de correcció post captura de l'ADN (*passage proofreading* o *PPR*), descrit en un dels articles que conformen aquesta memòria, explicaria aquesta qüestió. La dissociació mitjançant una porta C-terminal, és doncs probablement, per afavorir que

la topoisomerasa inverteixi els creuaments generats per estrés topològic com per exemple els cadenats produïts en els dúplex acabats de replicar i en el superenrotllament que s'assoleix a la replicació o la transcripció de l'ADN. D'aquesta manera la dissociació podria ser poc afavorida quan la topoisomerasa inverteix juxtaposicions ocasionals de l'ADN intracel·lular causades simplement per proximitat molecular, en aquests casos, el mecanisme de correcció proposat cancel·laria el transport d'ADN i previndria els encadenaments i entortolliments causats per l'atzar que podrien produir les topoisomerases de tipus IIA per les relativament elevades concentracions d'ADN dins del nucli. El mecanisme *PPR* podria jugar un rol fonamental preservant l'elevada compartimentalització dels territoris cromosòmics durant la l'interfase, deixant les cromàtides topològicament lliures i no lligades tot i la proximitat, fins al moment de l'anafase.

Les topoisomerases de tipus IIA que simplifiquen l'equilibri de la topologia de l'ADN presenten una elevada conservació estructural i per tant el mecanisme *PPR* podria ser una característica comuna de tots aquests enzims. Les més distants topoisomerases de la família IIB no tenen porta C-terminal que dificulti l'alliberament dels segments T capturats i significativament aquests enzims no simplifiquen la topologia de l'ADN per sota dels valors d'equilibri (Corbett *et al*, 2007), aquesta característica recolza la responsabilitat de la porta C-terminal en la simplificació de les distribucions.

Queda pendent l'estudi *in vivo* de la biologia dels mutants desproveïts de porta C-terminal a la topoisomerasa II, és a dir sense mecanisme *PPR*, això representa un interessant àrea per a futures investigacions.

Preferències relaxadores d'ADN de les topoisomerases sobre l'ADN cromatinitzat

A la segona part del treball s'ha estudiat les preferències de transport de les topoisomerases I i II en el seu substrat natural, la cromatina, i els resultats obtinguts s'han fet servir per explicar el model *Twin Supercoiled Domain* formulat per Wang en bacteris, a la cromatina dels eucariotes. Aquests resultats també s'han fet servir per explicar les alteracions topològiques observades en els llevats mutans per les

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

topoisomerasas. En aquest treball s'ha presentat el primer anàlisi comparatiu de les preferències de les topoisomerasas I i II per la cromatina amb superenrotllament positiu, negatiu i l'ADN nu.

A partir dels estudis clàssics dels anys 80 es va configurar una visió de la dinàmica de la cromatina basada en el *twin supercoiled domain* (Liu i Wang, 1987) i es va assignar un rol general de relaxasa a la topoisomerasa I i de decatenasa a la topoisomerasa II (Holm *et al*, 1985; Uemura *et al*, 1987; Adachi *et al*, 1991). Els estudis realitzats *in vivo* en el nostre laboratori es van iniciar a partir de l'observació paradoxal, que les cèl·lules de llevat mutants per topoisomerasas, tot i privades de l'activitat relaxadora de les topoisomerasas I i II, modificaven l'*Lk* de minicromosomes introduïts per transformació, de forma que aquest *Lk* es reduïa fins arribar a nivells molt inferiors als fisiològics. El fenomen invers ocorria en cèl·lules portadores del gen exogen TopA, de *E.coli* i en aquest cas s'acumulava superenrotllament positiu.

Per caracteritzar aquests fenòmens de forma més exhaustiva es va estudiar diferents plasmidis amb i sense centròmer i també el plasmidi natural del llevat, el 2 micres. En tots aquests casos, quan es va inactivar la topoisomerasa II en cèl·lules de la soca JCW28 ($\Delta_{top1-top2-ts}$) termosensible a 35°C, va aparèixer un dèficit d'*Lk*. En els plasmidis portadors de centròmer, de còpia única, aquest efecte va ser molt més acusat. Podem descartar un efecte directe de la temperatura ja que ni a les soques wt ni a la JCW26 (TOP1-top2-ts) hi va haver canvis comparables, en canvi si que es va poder observar un cert cúmul de minicromosomes amb un dèficit d'*Lk* en els mutants JCW27 ($\Delta_{top1-TOP2}$). Com s'ha comentat anteriorment, quan els llevats assajats tenien el gen TopA d'*E.coli* i podien produir la topoisomerasa I bacteriana, del tipus IA, que pot relaxar exclusivament el superenrotllament negatiu, i eren inactivades les topoisomerasas endògenes del llevat, s'acumulava superenrotllament positiu (Giaever i Wang, 1988).

L'estudi del fenomen es va començar amb una quantificació de les alteracions topològiques observades. Quan es va generar un increment d'*Lk*, és a dir, de superenrotllament positiu, es va mostrar que la densitat superhelicoidal de l'ADN podia superar a la cromatina eucariòtica, una σ de + 0,04 com a mínim. En els experiments per generar una disminució de l'*Lk*, és a dir superenrotllament negatiu es va arribar a una σ de - 0'12, de més del doble de la normal.

Les alteracions topològiques es van produir amb cèl·lules mutants de llevat $\Delta top1 top2$ -ts, que estan mancades de topoisomerasa I i tenen una topoisomerasa II termosensible, inactivable a 35°C. Quan es va voler produir superenrotllament positiu, els llevats també van ser portadors d'un plasmidi que expressava la topoisomerasa I de *E. coli* enzim, encarregat de generar un elevat superenrotllament positiu a la cromatina. Els canvis a la topologia es van analitzar fent servir minicromosomes de 4,4 kb basats en el fragment TRIP-ARS com a *reporters* topològics. Per estudiar les distribucions es va obtenir cultius amb la topoisomerasa II inactivada a 35°C i funcional a 26°C com control de l'estat fisiològic normal. També es va fer servir els mateixos plasmidis precedents de *maxiprep* relaxats *in vitro*, per la topoisomerasa de *Vaccinia*, com a controls de la distribució relaxada. Aquestes mostres es van analitzar amb electroforesi bidimensional, transferència a membrana de niló i marcatge amb sonda radioactiva.

Les distribucions obtingudes es van fer servir per calcular els canvis a la topologia a partir de la comparació de les distribucions de topoisòmers en les diferents condicions. Amb el control relaxat es va poder determinar l' Lk^0 , això va permetre valorar els canvis a les autoradiografies contant topoisòmers respecte d'aquest Lk^0 , d'aquesta manera es va poder fer una estimació del nivell mitjà de tensió superhelicoidal positiva o negativa que podien assolir les distribucions dels minicromosomes.

El nucleosoma canònic té un core d'ADN de 145 pb, amb un T_w positiu ($\Delta T_{wc} \approx + 0'8$), i un W_r negatiu, ($\Delta W_{rc} \approx - 1'8$), mentre que els segments linker (30-90 pb) no han de suportar un ΔT_w o ΔW_r importants, per tant a partir de la relació $\Delta Lk = \Delta T_w + \Delta W_r$, un nucleosoma típic estabilitzaria una tensió helicoidal equivalent aproximadament $\Delta Lk = - 1$. A partir del quocient entre la mida del minicromosoma *reporter* i l'*Helical repeat* obtenim el seu Lk^0 (4414 pb / 10,5 pb / creuament ≈ 420 creuaments), es a dir, l' $Lk^0 \approx 420$. A les autoradiografies no es va poder resoldre el nou centre de la distribució però si es va poder contar fins a 18 topoisòmers positius respecte de l' Lk^0 , la qual cosa implicaria que $\sigma = 18 / 420 = 0,0428$, per tant s'assoleix una $\sigma > + 0,04$, assumint una unitat negativa per nucleosoma. Com que la topoisomerasa I de *E. coli* requereix regions obertes de doble hèlix per poder actuar, cal pensar que alguns valors locals de σ han de ser molt superiors a + 0,042, però aquest valor estableix el límit inferior de tensió helicoidal mitjana contra la qual els complexos que circulen acoblats a l'ADN encara poden moure's al llarg de la cromatina.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

Per quantificar el superenrotllament negatiu es va fer servir en aquest cas, distribucions de topoisòmers obtingudes a partir de les soques *wt* i $\Delta\text{top1 top2-ts}$, aquesta vegada sense presència de la topoisomerasa I d'*E. coli*, i el mateix plasmidi relaxat *in vitro* per la topoisomerasa del virus *Vaccinia* per poder definir l' Lk^0 . El centre de les distribucions de topoisòmers de les soques mutant i *wt* es va calcular contant els topoisòmers entre el nou Lkm i l' Lk^0 , del plasmidi *reporter*. En aquests experiments es va determinar una σ de $-0,05$ a les mostres *wt*. i en el cas del doble mutant $\Delta\text{top1 top2-ts}$ es va poder contar fins a -52 topoisòmers respecte de l' Lk^0 . Això representa una σ de $-0,12$, que és més del doble de la normal.

Després de determinar que els minicromosomes podien assolir *in vivo*, valors de σ superiors a $+0,04$ i de $-0,12$ es va voler determinar si mantenien la seva estructura de cromatina en aquestes condicions.

Per determinar la persistència dels nucleosomes a la cromatina després d'assolir valors de σ iguals o superiors a $+0,04$ i de $-0,12$, es va fer experiments de relaxació *in vitro*, de minicromosomes obtinguts a partir d'extractes frescos de llevat, sense desnaturalitzar ni fixar. La relaxació es va fer amb els diferents tipus de topoisomerases disponibles al laboratori. Els resultats van indicar que les preparacions de minicromosomes amb una σ fisiològica, propera a $-0,05$ no van alterar aquest paràmetre per l'acció de les topoisomerases, mentre que les preparacions de minicromosomes amb σ iguals o superiors a $+0,04$ i propers a $-0,12$, si que van resultar relaxats fins a una σ normal de $-0,05$ aproximadament. Els plasmidis control procedents de cultius bacterians pel mètode de la lisi alcalina, formats per ADN nu es van relaxar completament ($\sigma = 0$). Aquest resultat va indicar per una banda que els minicromosomes en condicions d'elevat estrès torsional positiu o negatiu mantenien la seva estructura nucleosomal bàsica intacta. Per altra banda també es va veure que en aquestes condicions, l'elevat estrès torsional generat no estava estabilitzat, és a dir que era relaxable, almenys en les condicions assajades de l'extracció dels minicromosomes. En resum, l'elevada densitat superhelicoidal positiva i negativa no alterava l'estructura nucleosomal, o almenys, les alteracions produïdes revertien al relaxar els minicromosomes, sense pèrdua de nucleosomes, però la manera en que l'ADN pot conservar la seva organització nucleosomal sotmesa a tensió helicoidal positiva o negativa és una qüestió que falta clarificar. La presència d'histones a minicromosomes de llevat amb superenrotllament positiu està descrita des de fa anys (Lee i

Garrard,1991) però sense detallar com poden estar organitzats l'ADN i les histones en aquestes condicions.

Adicionalment, el manteniment de l'estructura nucleosomal es va comprovar també assejant la sensibilitat dels minicromosomes a la nucleasa micrococal en tres estats diferents; normal, amb superenrotllament positiu i després de ser relaxats amb topoisomerasa I. El resultat va ser la recuperació complerta del patró de tall, mentre que en estat d'elevat estres torsional positiu, fins i tot van aparèixer alguns llocs de tall addicionals, que van tornar a desaparèixer al relaxar els minicromosomes.

Un resultat adicional obtingut al investigar la persistència dels nucleosome, relaxant minicromosomes amb superenrotllament positiu, amb diferents tipus de topoisomerases, va ser la comprovació que la topoisomerasa II eucariòtica resultava molt més eficient que les topoisomerases tipus IB en la relaxació de l'ADN nucleosomal. Experiments més detallats, centrats en aquesta diferència d'eficiències relaxadores, indiquen que la topoisomerasa II i no la topoisomerasa I, seria la principal relaxasa de la cromatina i per tant que calia revisar el paper establert de les funcions i les interaccions entre l'ADN, la cromatina i les topoisomerases I i II.

Com que les relaxacions per testar la presència dels nucleosomes van evidenciar que la topoisomerasa II de llevat era mes eficient relaxant el superenrotllament positiu dels minicromosomes que la topoisomerasa I de llevat o la topoisomerasa del virus *Vaccinia*, les dues de tipus IB, es va fer cinètiques de les reaccions per tal de quantificar la diferència d'eficiències observada.

A les cinètiques de relaxació es va fer servir un control intern plasmídic, d'ADN nu, per verificar l'existència d'activitat enzimàtica de les topoisomerases utilitzades. A més del plasmidi control d'ADN nu, amb superenrotllament negatiu, també es va assajar la relaxació en plasmidis amb superenrotllament positiu, per això es va fer servir els mateixos minicromosomes amb superenrotllament positiu desproteïnitats, i els resultats van ser similars als obtinguts amb plasmidis amb superenrotllament negatiu. Aquesta comparació ens va permetre descartar algun efecte causat per la diferent quiralitat entre els minicromosomes, amb superenrotllament positiu i els plasmidis, amb superenrotllament negatiu.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

La topoisomerasa I va resultar ser unes 15 vegades més lenta que la topoisomerasa II relaxant els minicromosomes amb superenrotllament positiu, mentre que la topoisomerasa II va ser aproximadament 1,5 vegades més lenta que la topoisomerasa I relaxant ADN plasmídic nu.

Per posar a prova la rellevància biològica de la superior eficiència relaxadora de la topoisomerasa II *in vivo*, es va purificar minicromosomes amb tensió superhelicoidal positiva, i es van relaxar, amb extractes de llevat de les soques $\Delta\text{top1 TOP2}$ i TOP1 TOP2 amb i sense ATP. Això es va fer també en presència d'un plasmidi control. Sense ATP els extractes de llevat $\Delta\text{top1 TOP2}$ no van relaxar cap mostra mentre que els extractes procedents de la soca TOP1 TOP2 va relaxar ràpidament els plasmidis control i lentament els minicromosomes. Al adicionar ATP la velocitat de relaxació va ser similar a ambdues soques $\Delta\text{top1 TOP2}$ i TOP1 TOP2, indicant que és la topoisomerasa II la principal determinant de la capacitat per mantenir la topologia a la cèl·lula ja que al ser extractes de llevat es van mantenir les proporcions fisiològiques entre enzims. Es va observar també que la topoisomerasa I va relaxar el plasmidi control amb el doble de velocitat que la topoisomerasa II i aquesta va relaxar els minicromosomes cinc vegades més ràpidament que la topoisomerasa I, validant l'observació feta amb topoisomerases purificades i recolzant el paper de la topoisomerasa II com a principal moduladora de la topologia de la cromatina eucariòtica.

En el cas dels minicromosomes amb superenrotllament negatiu també es van analitzar per veure si la reducció de σ generada estava estabilitzada o era relaxable. Per això es va preparar minicromosomes a partir de lisats de les soques control, TOP1 TOP2, i problema, $\Delta\text{top1 top2-ts}$, amb dèficit de *Lk* inactivant la topoisomerasa II a 37°C 1h. Aquests minicromosomes es van incubar amb topoisomerasa I i en presència d'un plasmidi, que feia la funció de control de relaxació. La topologia dels minicromosomes procedents de cèl·lules TOP1 TOP2 no va canviar després de la incubació amb topoisomerasa I, en canvi el plasmidi control si que es va relaxar, la qual cosa va confirmar que la σ fisiològica de - 0'05 estava estabilitzada pels nucleosomes. Per contra la incubació amb topoisomerasa I dels minicromosomes procedents del doble mutant, sense activitat relaxadora, i per tant amb un important cúmul de superenrotllament negatiu, va produir una distribució molt similar a la obtinguda de la soca normal, aquest resultat ens indica que la tensió superhelicoidal produïda en el doble mutant no estava estabilitzada i que,

com en el cas del superenrotllament positiu, aquesta pertorbació no modificava de forma substancial la organització nucleosomal de l'ADN, ja que els minicromosomes van recuperar la seva topologia fisiològica després de ser relaxats per la topoisomerasa I.

També es va fer experiments per examinar la relació entre transcripció i l'acumulació de tensió helicoidal negativa. Aquests van ser de dos tipus. En primer lloc es va transformar la soca doble mutant amb un plasmidi centromèric portador del marcador URA3 i de dues repeticions de 58 pb que eren reconegudes per la recombinasa de *Zygosaccharomyces rouxi*. Els llevats transformants es van transformar per segona vegada amb el plasmidi que expressava la recombinasa induïble per galactosa i es va produir el corresponent parell de plasmidis idèntics. El portador del marcador URA3 podia transcriure i aquests plasmidis van acumular superenrotllament negatiu, mentre que els altres no tenien res que transcriure i van quedar inalterats.

Un altra manera de relacionar la transcripció amb la reducció de l'*Lk* dels minicromosomes va ser contruir un plasmidi amb el gen LacZ induïble per galactosa, que es va fer servir per transformar la soca doble mutant. Quan es va inactivar la topoisomerasa II, l'*Lk* dins les cèl·lules es va reduir però quan aquesta inactivació es va combinar amb la inducció de la transcripció del gen LacZ, la reducció de l'*Lk* va ser molt més ràpida i intensa. La simple inducció de la transcripció a temperatura permissiva va produir una notable reducció de l'*Lk* a les cèl·lules deficitàries en activitat relaxadora, $\Delta top1 top2 ts$, ja que no podien fabricar la topoisomerasa I i solament tenien la topoisomerasa II en condicions de una probable manca d'integritat. Com a control, també es van transformar les soques TOP1 TOP2, TOP1 top2 ts, i $\Delta top1 TOP2$. Les dues primeres no es van afectar per la exposició a 35°C ni per la inducció de LacZ, però la soca $\Delta top1 TOP2$ va tenir una reducció de l'*Lk* similar a la del doble mutant en absència d'inducció del gen LacZ. Amb això hem corroborat la observació que en els mutants $\Delta top1 TOP2$, quan els minicromosomes tenen activitat transcripcional pateixen una reducció de l'*Lk* (Brill i Sternglanz, 1988). Es conclou que en absència d'activitat topoisomerasa hi ha acumulació de superenrotllament negatiu, que és mes intensa i ràpida quan major és la taxa de transcripció.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

Alhora de valorar amb un assaig cinètic l'eficiència de les topoisomerases de tipus IB i IIA sobre la cromatina amb superenrotllament negatiu, de forma similar a com s'havia fet amb el positiu, es va aprofitar per comparar l'activitat de la topoisomerasa II sobre els minicromosomes amb tensió superhelicoidal positiva i negativa. Per això es va obtenir els minicromosomes en els dos estats topològics, en quantitats equivalents, i es van incubar amb topoisomerasa I i amb topoisomerasa II. Les dues topoisomerases van relaxar els minicromosomes i van produir distribucions a punt final de σ similars aproximadament -0'05, mostrant de nou que, en cap dels dos estats positiu o negatiu, els nucleosomes eren expulsats de la cromatina. Amb la cinètica es va valorar les diferents velocitats de les reaccions de relaxació i va resultar que la velocitat va ser aproximadament tres vegades superior en el cas de la topoisomerasa II sobre minicromosomes amb tensió superhelicoidal positiva que negativa, mentre que amb la topoisomerasa I va ser molt similar en els dos casos.

Finalment com s'havia fet al estudiar el superenrotllament positiu, es va examinar la capacitat de les topoisomerases endògenes del llevat per relaxar els minicromosomes amb superenrotllament positiu i negatiu. Novament es va preparar minicromosomes en els dos estats topològics oposats i es van incubar amb extractes de la soca amb dotació normal de topoisomerases, TOP1 TOP2, això es va fer en presència i absència d'ATP. L'activitat topoisomerasa I endògena (sense ATP) va relaxar tant els minicromosomes amb tensió helicoidal positiva com negativa amb similar eficiència, en els dos casos quan es va afegir ATP la relaxació va anar més de pressa a causa de l'activitat topoisomerasa II endògena però, mentre que la velocitat es va doblar en el cas dels minicromosomes amb superenrotllament negatiu, es va multiplicar per sis en el cas dels minicromosomes amb superenrotllament positiu. Aquests resultats son consistents amb les eficiències de relaxació observades en els experiments amb enzims purificats i ens indiquen novament que la topoisomerasa II és una activitat més específica per relaxar la cromatina de llevat que la dispensable topoisomerasa I i a més, que la capacitat global de les topoisomerases endògenes per relaxar el superenrotllament positiu, supera àmpliament la capacitat per relaxar el negatiu.

A partir de les autoradiografies obtingudes de les mostres amb superenrotllament positiu es pot analitzar l'adaptació dels nucleosomes, en promig, a la elevada densitat superhelicoidal assolida. Si en els

minicromosomes analitzats es va assolir un ΔLk de 18 unitats com a mínim i com que tenim 4414 pb / 200 pb x nucleosoma ≈ 22 nucleosomes, cada nucleosoma haurà d'acomodar de mitjana deformacions de l'ADN equivalents aproximadament un ΔLk de +0,8, (18 / 22). Un ΔLk d'aquesta magnitud difícilment es pot confinar en les regions *linker* que per mantenir -1 en el *core* hauria de ser proper a +1,8 així que probablement l'energia de torsió deu alterar també la conformació del core d'ADN, canviant la fase de les interaccions histones-ADN superhelicoidal (ΔTwc), o el nombre de voltes de l'ADN entorn l'octàmer d'histones (ΔWrc).

Per suportar els elevats valors de σ descrits, la cromatina podria assolir diferents conformacions plausibles sense perdre les interaccions natives histona-ADN i que serien reversibles per relaxació. Una manera d'acomodar aquest excés d' Lk podria consistir en transicions cap a creuaments positius enlloc dels normals, negatius, entre els segments d'entrada i sortida de cada nucleosoma. Aquesta possibilitat difícilment podria absorbir valors de σ més grans de +0'05 (Sivolob i Prunell, 2004). Un altra possible conformació per que la cromatina pugui suportar elevades densitats helicoidals podria ser el desenrotllament parcial d'una volta aproximadament de l'ADN de sobre de les histones, aquest ADN desenrotllat de les histones formaria branques plectonèmiques levogires (Koster *et al*, 2005). Un altra possibilitat a tenir en compte seria un desenrotllament parcial de la doble hèlix associat a un desplegament de l'octàmer d'histones i un canvi del creuament dels segments d'ADN d'entrada i sortida en el nucleosoma amb inversió de la quiralitat del tetràmer (H3-H4)₂ (Hamiche *et al* 1996). El major desenrotllament d'aquesta conformació de la cromatina amb $\sigma \approx + 0'04$ es veu recolzada per la observació d'un major nombre de llocs de tall quan està exposada a la nucleasa micrococcal. També podria haver situacions mixtes i els nucleosomes individuals podrien estar equilibrats de forma diferent dependent de la seqüència d'ADN i de les modificacions de les histones.

Una altra qüestió plantejada al fer els assajos de relaxació per confirmar el manteniment de les histones, va ser el per què la topoisomerasa II relaxa la cromatina de forma més eficient que la topoisomerasa I. Els dos enzims interaccionen amb segments d'ADN de mida comparable (Stewart *et al*, 1998; Fass *et al*, 1999), això probablement indica que la diferència no estaria relacionada amb la dificultat d'unió a l'ADN, en tot cas si l'estructura de la cromatina dificultés l'accés dels enzims a la doble hèlix, es podria esperar

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

que la topoisomerasa II, que és més gran i interacciona amb dos segments d'ADN, hauria de tenir més restriccions que la topoisomerasa I, per tant és més probable que la diferència d'eficiències sigui causades per la diferència de cada enzim al interactuar amb l'ADN.

És molt possible que l'estructura de la cromatina afecti la seva disponibilitat com a substrat. La capacitat de la cromatina per girar per torsió possiblement deu ser molt menor que la que presenta la fibra d'ADN nu, aquest fet deu dificultar l'activitat de la topoisomerasa I, que funciona alliberant tensió helicoidal per aquest mecanisme, en canvi la cromatina podria ser un substrat més idoni per resoldre per la topoisomerasa II al afavorir l'activitat de l'enzim, transportador de segments d'ADN, quan aquests formen creuaments (Sun *et al*, 2005). Si la cromatina amb σ positiva desvies la seva proporció de *twist* i *writhe* de la normal es podrien generar molts creuaments positius, un substrat excel·lent per la topoisomerasa II (Boles *et al*, 1990). Per contra la topoisomerasa I, al tallar una sola cadena d'ADN permetent al dúplex completar una o més rotacions sobre l'enllaç fosfodiester intacte de la cadena oposada, d'aquesta forma per l'ADN nu en solució la rotació axial és ràpida, permeten el gir lliure del dúplex, en canvi la curvatura de l'ADN pròpia de la cromatina és un element que incrementa el volum efectiu del dúplex i per tant l'efecte d'arrossegament, dificultant la rotació axial (Nelson, 1999) i en el cas de l'ADN nucleosomal, la rotació dels nucleosomes sencers implica dificultats estèriques considerables, la rotació axial del dúplex hauria de superar a més, l'efecte *barrier* causat per la interacció amb histones i altres proteïnes, que no deixen girar lliurement el dúplex d'ADN, causant un retard a la difusió del *twist*.

En resum, quan l'ADN està plegat en la cromatina, la topoisomerasa I ha de trobar-se amb importants limitacions cinètiques a la completa rotació axial del dúplex tallat, mentre que el mecanisme de la topoisomerasa II d'inversió de creuaments, solament involucra una curta i unidireccional translocació del segment T a través del segment G (Roca, 2004), aquest procés depenent d'ATP deu de ser poc afectat per el *writhe* i les interaccions amb les proteïnes fora del que seria el complex ADN – topoisomerasa II.

Probablement la organització espacial i la dinàmica de les fibres de cromatina deuen condicionar les eficiències de les topoisomerases de tipus I i II en sentits oposats. També es pot inferir a partir de l'equilibri tall-relligació de l'ADN a les topoisomerases eucariòtiques que els complexos transitoris de tall

de l'ADN es poden convertir en lesions (Liu, 1989) i que per tant les funcions cel·lulars assignades a les topoisomerases I i II han de minimitzar el risc de dany al genoma. Els canvis conformacionals guiats per ATP a la topoisomerasa II, comporten un pas molt transitori de tall de l'ADN (Roca, 2014) en canvi a la topoisomerasa I, l'equilibri de tall – religació és governat per l'esforç de torsió i per la fricció (Koster *et al*, 2005) i la religació de l'ADN pot quedar dificultada a causa dels barriers a la difusió del twist que imposa la cromatina, augmentant el risc de lesió. Tot i aquesta possibilitat, en els nostres experiments en canvi, no vam detectar un increment d'intermediaris d'ADN tallats quan la topoisomerasa I va interaccionar amb la cromatina superenrotllada, es dir un augment de la proporció de minicromosomes amb *nick*. Això ens fa preveure que la interacció entre la topoisomerasa I i l'ADN deu de crear un escenari energètic preventiu de l'alliberament de bris tallats quan el dúplex té baixa probabilitat de completar una volta sencera.

Amb aquest raonament s'hauria d'assignar a la topoisomerasa II un paper preponderant en la modulació de la topologia de la cromatina. Aquesta importància que sembla tenir la topoisomerasa II segons els resultats presentats, planteja la pregunta de quin és llavors el rol de la topoisomerasa I, donat que l'ADN nucleosomal resulta un substrat òptim per ser relaxat per la topoisomerasa II.

La topoisomerasa I quan actua sobre l'ADN nu, no té una preferència intrínseca per relaxar tensió superhelicoidal positiva o negativa, experiments de *Single Molecule* mostren que la taxa de relaxació de l'ADN per la topoisomerasa I depèn bàsicament de la torsió que té acumulada independentment de la direcció de rotació de les seves cadenes (Koster *et al* 2005; 2007). Els nostres resultats indiquen que aquesta característica es manté a l'ADN quan forma part de la cromatina, tot i que, la taxa de relaxació és aproximadament 10 vegades més lenta que en l'ADN nu, però el grau d'impediment rotacional deu ser comparable entre la cromatina amb tensió superhelicoidal negativa i positiva.

La topoisomerasa I podria contribuir a la relaxació de l'ADN en algunes regions puntuals de la cromatina a les quals, de forma temporal, per la seva funció o potser la seva ubicació, no predominessin els creuaments. Com que l'activitat topoisomerasa II sembla dependre de la probabilitat de juxtaposició dels segments d'ADN (Roca i Wang, 1996), aquesta relaxarà la tensió helicoidal sempre que hagi una deformació substancial de l'ADN en forma de *writhe*, en canvi, en regions on la taxa de transcripció és

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

elevada, l'agrupació molecular i les forces d'estirament de l'ADN, poden impedir la formació local de superenrotllaments, la tensió helicoïdal pot deformar llavors l'ADN de forma preferent per la via del *twist*, permeten a la topoisomerasa I se més eficient que la topoisomerasa II. Aquest esquema és consistent amb la localització preferencial de la topoisomerasa I en regions transcrites intensament (Fleischmann *et al*, 1984; Mao *et al*, 2002) i principalment en el nuclèol (Muller *et al*, 1985; Zhang *et al*, 1988) on la topoisomerasa I interaccionaria directament amb l'holoenzim de la RNA polimerasa I (Christensen *et al*, 2004). Un altre escenari en el qual la topoisomerasa I podria ser eficient, és en l'acoblament de les histones sobre l'ADN per formar la cromatina. Tant la topoisomerasa I com la topoisomerasa II poden proporcionar l'activitat relaxadora requerida per l'acoblament dels nucleosomes independentment de la replicació en el llevat (Garinther i Shultz, 1997). A més l'acoblament en extractes d'ou de *Xenopus* suggereix que en aquest sistema, la relaxació de l'ADN és majoritàriament realitzada per la topoisomerasa I (Almouzi i Mechali, 1988). Durant l'acoblament dels nucleosomes, les histones es disposen sobre l'ADN nu i la tensió helicoïdal positiva s'eleva localment per compensar el *writhe* negatiu de l'ADN en els nucleosomes, sense que, la densitat superhelicoïdal global, sigui mai positiva. La conformació inicial d'aquest substrat no és equivalent a la de la cromatina superenrotllada positivament reportada en aquest treball ($\sigma > + 0'04$), per tant, l'activitat relaxadora proporcionada per la topoisomerasa I pot ser eficient en aquest cas, especialment en el estats inicials de l'acoblament de les histones, quan la rotació del dúplex pot ser ràpid.

Tot i millorar l'eficiència dels processos topològics de l'ADN, la topoisomerasa I no és indispensable per a la viabilitat cel·lular, en el *S. cerevisiae* i en *S. pombe*. (Uemura i Yanagida, 1984; Saavedra i Huberman, 1986; Brill i Sternglanz, 1988; Giaever i Wang, 1988).

El mecanisme d'acció dels dos tipus de topoisomerases ha fet que la topoisomerasa I fos considerada, per sobre de la topoisomerasa II, com la relaxasa principal de l'ADN de les cèl·lules eucariòtiques. Els resultats presentats clarifiquen perquè la topoisomerasa II és suficient per modular el superenrotllament a l'ADN en absència de la topoisomerasa I. La quantitat molar de topoisomerasa I i topoisomerasa II a *S. cerevisiae* s'ha estimat en aproximadament 3000 i 5000 còpies per cèl·lula respectivament (Ghaemmaghani *et al* 2003), aquestes quantitats son consistents amb els nostres resultats que ens

indiquen que l'activitat topoisomerasa II relaxant l'ADN nucleosomal en extractes de llevat supera en un factor de 5 la de la topoisomerasa I. Així doncs, la topoisomerasa II no és solament més eficient que la topoisomerasa I relaxant la cromatina, sinó que probablement ocupa la major part d'aquesta activitat cel·lular.

Quan es parla d'eficiència de la topoisomerasa II relaxant cromatina, no és tracta del mateix substrat quan aquesta presenta densitat superhelicoidal positiva o negativa. S'ha vist que la topoisomerasa II relaxa la cromatina amb superenrotllament positiu més de pressa que sota superenrotllament negatiu, mentre que la topoisomerasa I resol les dues a una velocitat similar i més lentament que la topoisomerasa II. Els experiments comparant els dos estats ens han donat l'oportunitat de fer hipòtesis de com interacciona la cromatina amb superenrotllament negatiu i positiu amb les topoisomerases.

Com que les cèl·lules eucariòtiques no tenen una activitat comparable a la girasa, l'acumulació de minicromosomes amb superenrotllament negatiu a la soca mutant de llevat Δtop1 observada per Brill i Sternglanz l'any 1988 i també en el nostre laboratori, és possiblement el resultat de un desequilibri entre la relaxació de la tensió superhelicoidal positiva i la negativa, que és generat durant la transcripció de l'ADN. En base al *twin supercoiling model*, per explicar aquest desequilibri podem tenir en compte dues possibilitats, una és que la topoisomerasa I, i no pas la II, sigui la que funciona com a principal relaxasa de la tensió superhelicoidal negativa, la reducció de l'*Lk* passa llavors en absència de la topoisomerasa I, perquè la topoisomerasa II o en el cas de mutants top2-ts, algun altra activitat, desconeguda fins ara, resol selectivament la tensió superhelicoidal positiva. Aquest escenari, en canvi no és consistent amb l'acumulació de superenrotllament positiu observat en el doble mutant $\Delta\text{top1-top2-ts}$ quan expressa la topoisomerasa I de *E.coli* (Giaver i Wang, 1988). Sembla que amb la inactivació de la topoisomerasa II en el doble mutant $\Delta\text{top1-top2-ts}$, cap altre activitat cel·lular és capaç de relaxar el superenrotllament positiu. A més, és poc probable que la topoisomerasa I intracel·lular relaxi la tensió superhelicoidal negativa però no la positiva, en tal cas, la tensió superhelicoidal positiva s'acumularia als mutants TOP1 top2-ts i no vam observar aquesta alteració ni en el minicromosomes altament transcrits. La segona possibilitat per entendre la reducció de l'*Lk* és que la topoisomerasa II intracel·lular resolgui la tensió superhelicoidal positiva més de pressa que la negativa, mentre que la topoisomerasa I relaxa les dues indistintament. Així

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

hauria una reducció de l'*Lk* en els mutants $\Delta\text{top1 top2-ts}$ perquè al ser inactivat l'enzim a 37°C la decreixent activitat topoisomerasa II esdevindria limitant abans per resoldre la tensió superhelicoidal negativa que per la positiva. Un efecte similar passaria quan la taxa de generació de tensió superhelicoidal negativa i positiva es veuen incrementades per la elevada activitat transcripcional. També s'explicaria la reducció de l'*Lk* en els mutants $\Delta\text{top1 TOP2}$, perquè tot i la normal activitat topoisomerasa II, aquesta resultaria limitant per resoldre nivells elevats de tensió superhelicoidal negativa. Aquest escenari *in vivo* encaixa amb les taxes de relaxació dels minicromosomes de llevat que hem observat *in vitro*.

La topoisomerasa II, de forma similar a la topoisomerasa I, no té una preferència intrínseca per resoldre la tensió superhelicoidal negativa o positiva a l'ADN nu (Roca i Wang 1996; Charving *et al*, 2003). En conseqüència, el desequilibri produït al relaxar la tensió superhelicoidal, reportat en aquest treball, fa pensar que mentre la cromatina amb superenrotllament positiu produeix conformacions que possibiliten la disposició adequada per el mecanisme de inversió de creuaments de la topoisomerasa II, el superenrotllament negatiu produeix conformacions menys apropiades per aquesta activitat. Aquestes inferències son consistents amb la resposta de les fibres de cromatina a la rotació axial de l'ADN observada *in vitro* (Bancaud *et al*, 2006; Lavelle *et al*, 2010).

Les rotacions que produeix la tensió superhelicoidal positiva acurten de forma marcada la fibra de cromatina i es creu que podrien induir transicions nucleosoma reversoma (Bancaud *et al*, 2007). Aquestes deformacions impliquen un increment del *writhe* a l'ADN, és a dir, més superenrotllament i més encreuaments, sent els positius formats *de novo* millor substrat de l'activitat topoisomerasa II. S'ha postulat una ràpida transició d'una forma *buffer* (ADN nucleosomal parcialment desplegat) a una forma superenrotllada (nucleació dels creuaments positius de l'ADN), per explicar perquè la topoisomerasa II i no la topoisomerasa I és la requerida per la producció de llargs transcrits "in vivo" (Joshi *et al*, 2012).

En contrast amb el que passa quan tenim tensió superhelicoidal positiva a la cromatina, la inducció de tensió superhelicoidal negativa per rotació axial de l'ADN a la cromatina, no produeix un efecte d'acurtament comparable amb el produït amb la tensió superhelicoidal positiva (Bancaud *et al*, 2006;

Lavelle *et al*, 2010), en concordança amb els nostres resultats i amb recents estudis *in vivo* (Teves i Henikoff 2013), els nucleosomes no són eliminats per la tensió superhelicoidal negativa, però en canvi, sembla que la configuració de la cromatina amb superenrotllament negatiu resulta un pobre substrat per a l'activitat de la topoisomerasa II, això implicaria escassetat de creuaments negatius d'ADN formats de nou a partir d'un increment de la tensió helicoidal negativa. Molt probablement, la cromatina s'adapta a la tensió helicoidal negativa principalment per increment de l'enrotllament de l'ADN en el nucleosoma levogir i desparellament de bases del dúplex a les regions *linker*. Els valors de $\sigma < -0.12$ assolits en minicromosomes de llevat dels nostres experiments, podrien quedar estabilitzats d'aquesta manera.

Per interpretar en conjunt la interacció de les activitats topoisomerasa I i II amb les possibles conformacions de la cromatina sota tensió superhelicoidal positiva i negativa podem considerar que mentre la transcripció de l'ADN genera tensió superhelicoidal positiva i negativa a la mateixa velocitat, les topoisomerases cel·lulars resolen més ràpidament la tensió superhelicoidal positiva i en conseqüència la negativa persisteix més temps que la positiva. En condicions normals aquesta acumulació de tensió superhelicoidal negativa deu de ser transitòria i restringida a regions específiques, però quan l'activitat topoisomerasa està disminuïda o alterada i/o la taxa de generació de tensió superhelicoidal està incrementada, l'acumulació de superenrotllament negatiu arriba a fer-se evident, com es mostra en el present estudi.

Creiem que aquest cert grau de persistència de l'estrès torsional negatiu durant la transcripció de l'ADN en cèl·lules eucariòtiques podria ser fisiològic i una manera de facilitar-ne les funcions, ja que el superenrotllament produït per la tensió superhelicoidal positiva dificulta la transcripció i replicació de l'ADN (Joshi *et al*, 2010; Roca, 2011). L'eficient relaxació del superenrotllament positiu podria ser així aprofitada a la cromatina eucariòtica per facilitar la correcta progressió de les ARN i ADN polimerases. Per contra, la relaxació de la tensió superhelicoidal negativa pot no ser tant imprescindible ja que l'alteració ocasionada no molesta la síntesi d'ARN o ADN. En tot cas, un excessiu grau d'obertura de la doble hèlix pot causar alteracions potencialment perjudicials, com la hiperecombinació (Trigueros i Roca, 2001; 2002), o la formació d'R-loops (Massé i Drolet, 1999). El manteniment de la tensió superhelicoidal negativa pot ser necessària a regions regulatòries específiques per facilitar conformacions determinades o senzillament,

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

l'obertura de l'ADN. Aquesta condició és ben coneguda a les eubactèries, a les quals la girasa està encarregada d'aquesta funció i és essencial per la regulació de l'expressió gènica, la iniciació de la replicació de l'ADN o el seu plegament a l'espai citoplasmàtic (Hatfield i Benham, 2002; Travers i Muskhelishvili, 2005). La persistència d'un cert grau de superenrollament negatiu a la cromatina del llevat podria tenir doncs, una funció similar a la de la girasa bacteriana.

A les cèl·lules eucariòtiques, la tensió superhelicoidal negativa afavoreix la interacció de l'ADN amb factors de transcripció (Mizutani *et al*, 1991; Parvin i Sharp, 1993) i amb les ARN polimerases, (Tabuchi i Hirose, 1988; Mizumitani *et al*, 1991; Schultz *et al*, 1992) i estudis *in vivo* descriuen que la tensió superhelicoidal negativa ajuda a les transicions estructurals de seqüències reguladores de l'ADN (Kouzine i Levens, 2007) i desencadena respostes funcionals en alguns *loci* a llevat i en humans (Kouzine *et al*, 2008; Brooks i Hurley, 2009). En regions específiques dels cromosomes eucariòtics s'ha vist que hi ha manteniment estable de tensió superhelicoidal (Jupe *et al*, 1993; Ljungmanand i Hanawalt, 1995; Kramer i Sinden, 1997; matsumoto i Hirose, 2004) i recents anàlisis genòmics de la topologia de l'ADN han revelat que la tensió superhelicoidal negativa persisteix mitjançant dominis cromosòmics específics i al voltant de els llocs d'iniciació de la transcripció de molts gens a *S. cerevisiae* (Bermudez *et al*, 2010; Kouzine *et al*, 2013; Naughton *et al*, 2013) i a *D. melanogaster* (Teves i Henikoff, 2014). L'arquitectura de la cromatina i les seves modificacions epigenètiques probablement determinen com l'energia torsional de l'ADN és tamponada, dissipada o confinada en els dominis topològics (Gilbert i Allan, 2014), a la llum dels nostres resultats, proposem que la seva estructura també determina el grau en el qual l'energia torsional és aprofitada o dissipada per les topoisomerasas cel·lulars.

Nombroses observacions han posat de manifest que la topoisomerasa II deu de tenir altres rols cel·lulars apart de deslligar les cadenes d'ADN acabades de replicar. S'ha proposat que podria alleujar la repressió de la transcripció a la cromatina (Mondal i Parvin, 2001) i també afectar el posicionament dels nucleosomes (Germe i Hyrien, 2005). També s'ha dit que al davant de la forquilla de replicació la topoisomerasa II predomina sobre la topoisomerasa I per facilitar la còpia de l'ADN (Holm *et al*, 1989; D'Arpa *et al*, 1990) i també que la topoisomerasa II, és la predominant a les cèl·lules espermatogèniques post-replicatives que estan sotmeses a la transició nucli-histona nucli protamina (Roca i Mezquita, 1989).

La topoisomerasa II β dels eucariotes superiors no és requerida per la proliferació cel·lular, però sí que participa a la regulació del destí cel·lular (Lyu i Wang, 2003).

Les interconversions topològiques de l'ADN subjacents en aquests processos moleculars són molt desconegudes, els nostres resultats suggereixen, que la topoisomerasa II impediria creuaments energèticament poc favorables afavorint el manteniment de la separació entre cromosomes dins de la cromatina interfàsica evitant anusaments innecessaris alhora que seria la principal relaxasa dels superenrotllaments d'ADN a la cromatina i que la seva diferent eficiència per resoldre el superenrotllament positiu i negatiu, la convertirien en moduladora de la tensió superhelicoidal, funcionant a la topologia de la cromatina eucariòtica, de forma similar, a la topoisomerasa IV i la girasa, modulant la topologia de l'ADN a les cèl·lules bacterianes (Champoux, 2001; Wang, 2002).

Conclusions

CONCLUSIONS SOBRE LES PREFERÈNCIES DE TRANSPORT DE LA TOPOISOMERASA II**RESPECTE DE L'ADN NU**

1. La topoisomerasa II simplifica eficientment la distribució d'equilibri termodinàmic de número de enllaç de l'ADN i ho fa de forma asimètrica. Aquesta asimetria no és causada per deformacions induïdes en els segments G i T.
2. La topoisomerasa II sembla poder interaccionar amb un tercer segment d'ADN. Aquesta interacció comporta una reducció de longitud efectiva d'ADN i afecta la quiralitat del creuament entre segments T i G. Aquest fet podria contribuir a la simplificació de la topologia de equilibri de l'ADN i generar la asimetria observada experimentalment.
3. La probabilitat de captura d'un segment T per la porta N-terminal de la topoisomerasa II no es equivalent a la probabilitat del seu transport. Es possible que el segment T capturat retrocedeixi i torni a sortir per la porta N-terminal.
4. El bloqueig de l'obertura de la porta N-terminal de l'enzim un cop s'ha efectuat la captura d'un segment T comporta la pèrdua de la capacitat simplificadora de la topologia de l'ADN.
5. L'eliminació de la porta C-terminal facilita la sortida del segment T un cop ha estat capturat i transportat, i també comporta la pèrdua de la capacitat simplificadora de la topologia de l'ADN.
6. Les portes N-terminal i C-terminal actuen com sensors del estrès topològic entre els segments T i G. Aquesta capacitat explicaria com la topoisomerasa II pot reduir la distribució termodinàmica de número de enllaç, i també explicaria per que aquest enzim pot resoldre l'estrès topològic de l'ADN *in vivo* però evita enredar l'ADN de regions pròximes de cromatina.

CONCLUSIONS RESPECTE DE LA TOPOLOGIA DE L'ADN I LES PREFERÈNCIES RELAXADORES DE LES TOPOISOMERASES EN LES FIBRES DE CROMATINA

7. La densitat superhelicoidal (+) de l'ADN que es pot generar *in vivo* en minicromosomes de llevat es superior a +0,04. Aquest elevat grau d'estres torsional (+) no fa perdre l'organització nucleosomal de la cromatina.

8. La topoisomerasa II relaxa *in vitro* els minicromosomes amb densitat superhelicoidal (+) més eficientment que la topoisomerasa I, en comparació a molècules nues d'ADN.

9. En els extractes cel·lulars que contenen proporcions fisiològiques de les topoisomerases I i II, l'activitat relaxadora de la topoisomerasa II sobre minicromosomes amb densitat superhelicoidal (+) es cinc cops més ràpida que la de la topoisomerasa I.

10. La densitat superhelicoidal (-) de l'ADN que es pot generar *in vivo* en minicromosomes de llevat pot arribar fins -0,12. Aquest elevat grau d'estres torsional (-) no fa perdre l'organització nucleosomal de la cromatina.

11. La topoisomerasa II relaxa la densitat superhelicoidal (+) unes tres vegades més ràpid que la (-), mentre que la topoisomerasa I relaxa l'estrès (+) i (-) amb eficiència similar i més lentament que la topoisomerasa II.

12. En els extractes cel·lulars que contenen proporcions fisiològiques de topoisomerasa I i II, la activitat topoisomerasa II per relaxar l'estrès torsional (-) de minicromosomes, duplica la de la topoisomerasa I, la activitat topoisomerasa II per relaxar l'estrès torsional (+) multiplica per sis la de la topoisomerasa I.

13. La diferent eficiència de la topoisomerasa II per resoldre l'estrès torsional (-) i (+) a la cromatina suggereix diferents deformacions del DNA nucleosomal. L'estrès torsional (-) afectaria preferentment el valor T_w (*twist*), mentre que el l'estrès torsional (+) afectaria preferentment el valor W_r (*writhe*).

14. El desequilibri generat per la topoisomerasa II en la relaxació de l'estrès torsional (+) i (-) explicaria per que durant la transcripció de l'ADN es manté més temps l'estrès torsional (-). Aquest mecanisme d'acumulació explicaria per que, a diferència de les bactèries, els eucariotes no necessiten una girasa de l'ADN per generar estrès torsional (-).

Bibliografia

- Adachi, Y., Luke, M., & Laemmli, U. K. (1991). Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell*, 64(1), 137-148.
- Albert, I., Mavrich, T. N., Tomsho, L. P., Qi, J., Zanton, S. J., Schuster, S. C., & Pugh, B. F. (2007). Translational and rotational settings of H2A. Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 446(7135), 572-576.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th Edition. Garland Science. New York
- Alexandrov, A. I., Cozzarelli, N. R., Holmes, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Postow, L., ... & Vologodskii, A. V. (1999). Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. In *Structural Biology and Functional Genomics* (pp. 217-233). Springer Netherlands.
- Almouzni, G., & Mechali, M., (1988). Assembly of spaced chromatin involvement of ATP and DNA topoisomerase activity. *EMBO J* 7: 4355–4365.
- Anderson, P., & Bauer, W. (1978). Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration. *Biochemistry*, 17(4), 594-601.
- Andoh, T., & Ishida, R. (1998). Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1), 155-171.
- Bakshi, R. P., Galande, S., & Muniyappa, K. (2001). Functional and regulatory characteristics of eukaryotic type II DNA topoisomerase. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*, 36(1), 1-37.
- Bancaud, A., e Silva, N. C., Barbi, M., Wagner, G., Allemand, J. F., Mozziconacci, J., ... & Viovy, J. L. (2006). Structural plasticity of single chromatin fibers revealed by torsional manipulation. *Nature structural & molecular biology*, 13(5), 444-450.
- Bancaud, A., Wagner, G., e Silva, N. C., Lavelle, C., Wong, H., Mozziconacci, J., ... & Prunell, A. (2007). Nucleosome chiral transition under positive torsional stress in single chromatin fibers. *Molecular cell*, 27(1), 135-147.
- Barbi, M., Mozziconacci, J., Victor, J. M., Wong, H., & Lavelle, C. (2012). On the topology of chromatin fibres. *Interface focus*, rsfs20110101.

BIBLIOGRAFIA

Bates, A. D., & Maxwell, A. (1989). DNA gyrase can supercoil DNA circles as small as 174 base pairs. *The EMBO journal*, 8(6), 1861.

Bates, A. D., & Maxwell, A. (2005). *DNA topology*. Oxford university press.

Baxevanis, A. D., Godfrey, J. E., & Moudrianakis, E. N. (1991). Associative behavior of the histone (H3-H4) 2 tetramer: dependence on ionic environment. *Biochemistry*, 30(36), 8817-8823.

Baxter, J., & Diffley, J. F. (2008). Topoisomerase II inactivation prevents the completion of DNA replication in budding yeast. *Molecular cell*, 30(6), 790-802.

Baxter, J., & Aragón, L. (2011, January). Physical linkages between sister chromatids and their removal during yeast chromosome segregation. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (pp. sqb-2010). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Belova, G. I., Prasad, R., Kozyavkin, S. A., Lake, J. A., Wilson, S. H., & Slesarev, A. I. (2001a). A type IB topoisomerase with DNA repair activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6015-6020.

Belova, G. I., Prasad, R., Nazimov, I. V., Wilson, S. H., & Slesarev, A. I. (2002b). The domain organization and properties of individual domains of DNA topoisomerase V, a type 1B topoisomerase with DNA repair activities. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4959-4965.

Benarroch, D., Claverie, J. M., Raoult, D., & Shuman, S. (2006). Characterization of mimivirus DNA topoisomerase IB suggests horizontal gene transfer between eukaryal viruses and bacteria. *Journal of virology*, 80(1), 314-321.

Berger, J. M. (1998). Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1400(1), 3-18.

Bergerat, A., Gadelle, D., & Forterre, P. (1994). Purification of a DNA topoisomerase II from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*. A thermostable enzyme with both bacterial and eucaryal features. *Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27663-27669.

Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A., & Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination.

Bermejo, R., Capra, T., Gonzalez-Huici, V., Fachinetti, D., Cocito, A., Natoli, G. & Foiani, M. (2009). Genome-organizing factors Top2 and Hmo1 prevent chromosome fragility at sites of S phase transcription. *Cell*, 138(5), 870-884.

Bermejo, R., Doksani, Y., Capra, T., Katou, Y. M., Tanaka, H., Shirahige, K., & Foiani, M. (2007). Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes & development*, 21(15), 1921-1936.

Bermudez, I., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E., & Roca, J., (2010). A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen-DNA photobinding. *Nucleic Acids Res* 38: e182.

Berrios, M., Osheroff, N. & Fisher, P. A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12), 4142-4146.

Bojanowski, K., Maniotis, A. J., Plisov, S., Larsen, A. K., & Ingber, D. E. (1998). DNA topoisomerase II can drive changes in higher order chromosome architecture without enzymatically modifying DNA. *Journal of cellular biochemistry*, 69(2), 127-142.

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

Brill, S. J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., & Sternglanz, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA.

Brill, S.J., & Sternglanz, R., (1988). Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* 54: 403 – 411.

Brogaard, K., Xi, L., Wang, J. P., & Widom, J. (2012). A map of nucleosome positions in yeast at base-pair resolution. *Nature*, 486(7404), 496-501.

Brooks, T.A., Hurley, L.H., (2009). The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nat Rev Cancer* 9: 849 – 861.

Brown, P. O., & Cozzarelli, N. R. (1981). Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(2), 843-847.

BIBLIOGRAFIA

Burton, D. R., Butler, M. J., Hyde, J. E., Phillips, D., Skidmore, C. J., & Walker, I. O. (1978). The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. *Nucleic acids research*, 5(10), 3643-3664.

Cantor, C.R. & Schimmel, P.R.(1980). *Biophysical Chemistry: Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*. W.H. Oxford, Freeman editor.

Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L., & Zunino, F. (1992). Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1132(1), 43-48.

Cavalli, G., Bachmann, D., & Thoma, F. (1996). Inactivation of topoisomerases affects transcription-dependent chromatin transitions in rDNA but not in a gene transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 15(3), 590.

Cavalli, G., & Misteli, T. (2013). Functional implications of genome topology. *Nature structural & molecular biology*, 20(3), 290-299.

Champoux, J. J., & Dulbecco, R. (1972). An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA—a possible swivel for DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(1), 143-146.

Champoux, J. J., (1990). 6 Mechanistic Aspects of Type-I Topoisomerases. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 20, 217-242.

Champoux, J. J., (2001). DNA Topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*70: 369–413.

Champoux, J. J., (2002). Type IA DNA topoisomerases: Strictly one step at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 11998–12000.

Chang, C. J., Goulding, S., Earnshaw, W. C., & Carmena, M. (2003). RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *Journal of Cell Science*, 116(23), 4715-4726.

Charvin, G., Bensimon, D., & Croquette, V., (2003). Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9820 – 9825

Chen, A. Y., & Liu, L. F. (1994). Mechanisms of resistance to topoisomerase inhibitors. In *Anticancer Drug Resistance* (pp. 263-281). Springer US.

Chen, S. H., Chan, N. L., & Hsieh, T. S. (2013). New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 82, 139-170.

Choder, M. (1991). A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary phase in yeast. *Genes & development*, 5(12a), 2315-2326.

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

Christensen, M. O., Barthelmes, H. U., Boege, F., & Mielke, C. (2003). Residues 190–210 of human topoisomerase I are required for enzyme activity in vivo but not in vitro. *Nucleic acids research*, 31(24), 7255-7263.

Christman, M. F., Dietrich, F. S., & Fink, G. R. (1988). Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell*, 55(3), 413-425.

Christman, M. F., Dietrich, F. S., Levin, N. A., Sadoff, B. U., & Fink, G. R. (1993). The rRNA-encoding DNA array has an altered structure in topoisomerase I mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7637-7641.

Cobb, J., Reddy, R. K., Park, C., & Handel, M. A. (1997). Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. *Molecular reproduction and development*, 46(4), 489-498

Collins, I., Weber, A., & Levens, D. (2001). Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Molecular and cellular biology*, 21(24), 8437-8451.

Confalonieri, F., Elie, C., Nadal, M., de La Tour, C., Forterre, P., & Duguet, M. (1993). Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4753-4757.

BIBLIOGRAFIA

Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K., & Berger, J. M. (2004). The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending β -pinwheel fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(19), 7293-7298.

Corbett, K. D., Benedetti, P., & Berger, J. M. (2007). Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nature structural & molecular biology*, 14(7), 611-619.

Covey, J. M., Jaxel, C., Kohn, K. W., & Pommier, Y. (1989). Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer Research*, 49(18), 5016-5022.

Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V., & Cozzarelli, N. R. (2000). Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. coli topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes & Development*, 14(22), 2881-2892.

Cvetković, R. S., & Scott, L. J. (2005). Dexrazoxane. *Drugs*, 65(7), 1005-1024.

D'Arpa, P., Beardmore, C., & Liu, L.F., (1990), Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* 50: 6919–6924.

Da Fonseca, F., & Moss, B. (2003). Poxvirus DNA topoisomerase knockout mutant exhibits decreased infectivity associated with reduced early transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11291-11296.

Darby, M. K., Schmitt, B., Jongstra-Bilen, J., & Vosberg, H. P. (1985). Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly (ADP-ribosylation). *The EMBO journal*, 4(8), 2129.

Davie, J. R., Saunders, C. A., Walsh, J. M., & Weber, S. C. (1981). Histone modifications in the yeast *S. cerevisiae*. *Nucleic acids research*, 9(13), 3205-3216.

Depew, D. E., & Wang, J. C. (1975). Conformational fluctuations of DNA helix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(11), 4275–4279.

DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., & Wright, A. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, 31(1), 43-51.

DiNardo, S., Voelkel, K., & Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(9), 2616-2620.

Downes, C. S., Mullinger, A. M., & Johnson, R. T. (1991). Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(20), 8895-8899.

Downes, C. S., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Giménez-Abián, J. F., Creighton, A. M., & Johnson, R. T. (1994). A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature*, 467-470.

Drake, F. H., Zimmerman, J. P., McCabe, F. L., Bartus, H. F., Per, S. R., Sullivan, D. M. & Crooke, S. T. (1987). Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 262(34), 16739-16747.

Drake, F. H., Hofmann, G. A., Bartus, H. F., Mattern, M. R., Crooke, S. T., & Mirabelli, C. K. (1989). Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry*, 28(20), 8154-8160.

Drolet, M., Bi, X., & Liu, L. F. (1994). Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 2068-2074.

Drolet, M. (2006). Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Molecular microbiology*, 59(3), 723-730.

Duan, Z., Andronescu, M., Schutz, K., McIlwain, S., Kim, Y. J., Lee, C., ... & Noble, W. S. (2010). A three-dimensional model of the yeast genome. *Nature*, 465(7296), 363-367.

Durand-Dubief, M., Persson, J., Norman, U., Hartsuiker, E., & Ekwall, K. (2010). Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression in vivo. *The EMBO journal*, 29(13), 2126-2134.

Earnshaw, W. C., & Laemmli, U. K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *The Journal of Cell Biology*, 96(1), 84-93.

Earnshaw, W. C., & Heck, M. M. (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *The Journal of cell biology*, 100(5), 1716-1725.

BIBLIOGRAFIA

Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M., & Liu, L. F. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *The Journal of cell biology*, 100(5), 1706-1715.

Eberharter, A., Ferrari, S., Längst, G., Straub, T., Imhof, A., Varga-Weisz, P., & Becker, P. B. (2001). Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling. *The EMBO journal*, 20(14), 3781-3788.

Ehmann, D. E., & Lahiri, S. D. (2014). Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase. *Current opinion in pharmacology*, 18, 76-83.

Eng, W. K., Pandit, S. D., & Sternglanz, R. (1989). Mapping of the active site tyrosine of eukaryotic DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13373-13376.

Fass, D., Bogden, C. E., & Berger, J. M. (1999). Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6(4), 322-326.

Finch, J. T., & Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(6), 1897-1901.

Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M., & Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269(5623), 29-36.

Fletcher, T. M., & Hansen, J. C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 6(2-3).

Fleischmann, G., Pflugfelder, G., Steiner, EK., Javaherian, K., Howard, G.C., Wang, J.C., & Elgin, S.C, (1984) Drosophila DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6958–6962

Forterre, P., & Godelle, D. (2009). Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms. *Nucleic acids research*, 37(3), 679-692.

Franke, W. W., Scheer, U., Trendelenburg, M., Zentgraf, H., & Spring, H. (1978, January). Morphology of transcriptionally active chromatin. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 42, pp. 755-772). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Gadelle, D., Krupovic, M., Raymann, K., Mayer, C., & Forterre, P. (2014). DNA topoisomerase VIII: a novel subfamily of type IIB topoisomerases encoded by free or integrated plasmids in Archaea and Bacteria. *Nucleic acids research*, 42(13), 8578-8591.

Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R., & Fabre, F. (1999). The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *The EMBO Journal*, 18(6), 1701-1711.

Garinther, W. I., & Schultz, M. C. (1997). Topoisomerase function during replication-independent chromatin assembly in yeast. *Molecular and cellular biology*, 17(7), 3520-3526.

Gartenberg, M. R., & Wang, J. C. (1992). Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(23), 11461-11465.

Gasser, S. M., Laroche, T., Falquet, J., de La Tour, E. B., & Laemmli, U. K. (1986). Metaphase chromosome structure: involvement of topoisomerase II. *Journal of molecular biology*, 188(4), 613-629.

Geggier, S., Kotlyar, A., Vologodskii, A., (2010). Temperature dependence of DNA persistence length. *Nucleic Acids Res.* 39(4): 1419–1426.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872-3876.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Itoh, T., & Tomizawa, J. I. (1977). Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 4772-4776.

Gellert, M., Fisher, L. M., Ohmori, H., O'Dea, M. H., & Mizuuchi, K. (1981, January). DNA gyrase: site-specific interactions and transient double-strand breakage of DNA. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 45, pp. 391-398). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Germe, T., Hyrien, O., (2005). Topoisomerase II–DNA complexes trapped by ICRF-193 perturb chromatin structure. *EMBO Rep* 6: 729–735.

Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N. & Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737-741.

BIBLIOGRAFIA

Giaever, G.N., & Wang, J.C., (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55:849 – 856.

Gilbert, N., & Allan, J., (2014). Supercoiling in DNA and chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 25: 15 – 21

Goodwin, A., Wang, S. W., Toda, T., Norbury, C., & Hickson, I. D. (1999). Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research*, 27(20), 4050–4058.

Goto, T., & Wang, J. C. (1985). Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7178-7182.

Graille, M., Cladière, L., Durand, D., Lecointe, F., Gabelle, D., Quevillon-Cheruel, S. & Van Tilbeurgh, H. (2008). Crystal structure of an intact type II DNA topoisomerase: insights into DNA transfer mechanisms. *Structure*, 16(3), 360-370.

Hagerman, P.J., (1988). Flexibility of DNA. *Annual review of biophysics and biophysical*. Vol. 17: 265-286.

Hamiche, A., Carot, V., Alilat, M., De Lucia, F., O'Donohue, M. F., Revet, B., & Prunell, A. (1996). Interaction of the histone (H3-H4) 2 tetramer of the nucleosome with positively supercoiled DNA minicircles: Potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 7588-7593.

Han, M., & Grunstein, M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell*, 55(6), 1137-1145.

Hanai, R., & Roca, J. (1999). Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of DNA topoisomers. In *DNA Topoisomerase Protocols* (pp. 19-27). Humana Press.

Hanke, T., Ramiro, M. J., Trigueros, S., Roca, J., & Larraga, V. (2003). Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic acids research*, 31(16), 4917-4928.

Hatfield, G.W., & Benham, C.J., (2002). DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 36: 175 – 203

Heck, M. M., & Earnshaw, W. C. (1986). Topoisomerase II: A specific marker for cell proliferation. *The Journal of cell biology*, 103(6), 2569-2581.

Heck, M. M., Hittelman, W. N., & Earnshaw, W. C. (1988). Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(4), 1086-1090.

Herbert, A., & Rich, A., (1996). The biology of left-handed Z-DNA. *J Biol Chem*. May 17;271(20):11595-8.

Higgins, N. P., Peebles, C. L., Sugino, A., & Cozzarelli, N. R. (1978). Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(4), 1773-1777.

Hirano, T., & Mitchison, T. J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in Xenopus egg extracts. *The Journal of cell biology*, 120(3), 601-612.

Holm, C., Goto, T., Wang, J. C., & Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, 41(2), 553-563.

Holm, C., Covey, J.M., Kerrigan, D., & Pommier, Y., (1989). Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res*49: 6365–6368

Horowitz, D. S., & Wang, J. C. (1984). Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling. *Journal of molecular biology*, 173(1), 75-91.

Hsiang, Y. H., Lihou, M. G., & Liu, L. F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer research*, 49(18), 5077-5082.

Hsieh, T. S. (1990). 7 Mechanistic Aspects of Type-II DNA Topoisomerases. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 20, 243-263.

Huertas, P., & Aguilera, A. (2003). Cotranscriptionally formed DNA: RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Molecular cell*, 12(3), 711-721.

BIBLIOGRAFIA

Joshi, R.S., Pina, B., & Roca, J., (2010). Positional dependence of transcriptional inhibition by DNA torsional stress in yeast chromosomes. *EMBO J*29: 740 – 748.

Joshi, R. S., Piña, B., & Roca, J. (2012). Topoisomerase II is required for the production of long Pol II gene transcripts in yeast. *Nucleic acids research*, gks626.

Ju, B. G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2006). A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*, 312(5781), 1798-1802.

Jupe, E.R., Sinden, R.R., & Cartwright, I.L., (1993). Stably maintained microdomain of localized unrestrained supercoiling at a *Drosophila* heat shock gene locus. *EMBO J* 12: 1067 – 1075.

Kampranis, S. C., Bates, A. D., & Maxwell, A. (1999). A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8414-8419.

Kathiravan, M. K., Khilare, M. M., Nikoomanesh, K., Chothe, A. S., & Jain, K. S. (2013). Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(3), 419-435.

Kato, J. I., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., & Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, 63(2), 393-404.

Kegel, A., Betts-Lindroos, H., Kanno, T., Jeppsson, K., Strom, L., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., & Sjogren, C., (2011). Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature* 471: 392 – 396.

Keller, W. & Wendel, I. (1974, January). Stepwise relaxation of supercoiled SV40 DNA. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 39, pp. 199-208). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kim, R. A., & Wang, J. C. (1989). A subthreshold level of DNA topoisomerases leads to the excision of yeast rDNA as extrachromosomal rings. *Cell*, 57(6), 975-985.

Kim, R. A., Caron, P. R., & Wang, J. C. (1995). Effects of yeast DNA topoisomerase III on telomere structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (7), 2667–2671.

- Kimura, K., Nozaki, N., Saijo, M., Kikuchi, A., Ui, M., & Enomoto, T. (1994). Identification of the nature of modification that causes the shift of DNA topoisomerase II beta to apparent higher molecular weight forms in the M phase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(40), 24523-24526.
- King, I. F., Yandava, C. N., Mabb, A. M., Hsiao, J. S., Huang, H. S., Pearson, B. L., ... & Zylka, M. J. (2013). Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature*, 501(7465), 58-62.
- Kirkegaard, K., & Wang, J. C. (1981). Mapping the topography of DNA wrapped around gyrase by nucleolytic and chemical probing of complexes of unique DNA sequences. *Cell*, 23(3), 721-729.
- Kirkegaard, K., & Wang, J. C. (1985). Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *Journal of molecular biology*, 185(3), 625-637.
- Kiryakov, G. I., Manamshjan, T. A., Polyakov, V. Y., Fais, D., & Chentsov, J. S. (1976). Levels of granular organization of chromatin fibres. *FEBS letters*, 67(3), 323-327.
- Klevan, L., & Wang, J. C. (1980). Deoxyribonucleic acidgyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an. alpha. 2. beta. 2 protein core. *Biochemistry*, 19(23), 5229-5234.
- Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Chromatin-modifying and-remodeling complexes. *Current opinion in genetics & development*, 9(2), 148-151.
- Koster, D. A., Croquette, V., Dekker, C., Shuman, S., & Dekker, N. H. (2005). Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature*, 434(7033), 671-674.
- Koster, D.A., Palle, K., Bot, E.S., Bjornsti, M.A.,& Dekker, N.H., (2007). Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature*448: 213 – 217.
- Kouzine, F., &Levens, D., (2007). Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Front Biosci*12: 4409 – 4423.
- Kouzine, F., Sanford, S., Elisha-Feil, Z.,& Levens, D., (2008). The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 15: 146 – 154.

BIBLIOGRAFIA

Kouzine, F., Gupta, A., Baranello, L., Wojtowitz, D., Ben-Aissa, K., Liu, J., Przytycka, T.M., & Levens, D., (2013). Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol* 20: 396 – 403.

Kramer, P.R., & Sinden, R.R., (1997) Measurement of unrestrained negative supercoiling and topological domain size in living human cells. *Biochemistry* 36: 3151 – 3158

Kratky, & Porod. 1949. Röntgenuntersuchung geloster Fadenmoleküle. *Rec. Trav. Chim.* 68, 1106-1122.

Krogh, B. O., & Shuman, S. (2002). A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 1853-1858.

Kurdistani, S. K., Tavazoie, S., & Grunstein, M. (2004). Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*, 117(6), 721-733.

Kwan, K. Y., & Wang, J. C. (2001). Mice lacking DNA topoisomerase III β develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5717-5721.

Kwan, K. Y., Moens, P. B., & Wang, J. C. (2003). Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2526-2531.

Lafer, E.M., Sousa, R., & Rich, A., (1985). Anti-Z-DNA antibody binding can stabilize Z-DNA in relaxed and linear plasmids under physiological conditions. *EMBO J.* Dec 30;4(13B):3655-60.

Landsman, D., (1996). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*: a double mystery solved?. *Trends Biochem Sci.* Aug;21(8):287-8

Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X. S., Sawhney, R., Thompson, A. W., & Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nature structural & molecular biology*, 16(6), 667-669.

Lavelle, C., Victor, J.M., & Zlatanova, J., (2010). Chromatin fiber dynamics under tension and torsion. *Int J Mol Sci* 11: 1557 – 1579

Lee, M., & Garrard, W., (1991). Positive DNA supercoiling generates a chromatin conformation characteristic of highly active genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9675–9679

- Lee, C. H., Mizusawa, H., & Kakefuda, T. (1981). Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5), 2838-2842.
- Lee, M. P., Brown, S. D., Chen, A., & Hsieh, T. S. (1993). DNA topoisomerase I is essential in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6656-6660.
- Lewis, R. J., Singh, O. M., Smith, C. V., Skarzynski, T., Maxwell, A., Wonacott, A. J., & Wigley, D. B. (1996). The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *The EMBO journal*, 15(6), 1412.
- Li, C., Mueller, J. E., Elfine, M., & Bryk, M. (2008). Linker histone H1 represses recombination at the ribosomal DNA locus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 67(4), 906-919.
- Li, W., & Wang, J. C. (1998). Mammalian DNA topoisomerase III α is essential in early embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3), 1010-1013.
- Lima, C. D., Wang, J. C., & Mondragón, A. (1994). Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I.
- Lipanov, A.A., Beglov, D.B., & Chuprina, V.P. (1989). DNA B to D transition can be explained in terms of hydration economy of the minor groove atoms. *J Mol Biol.* Nov 20;210(2):399-409.
- Liu, L.F., & Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*84: 7024–7027
- Liu, L.F. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 351-375.
- Liu, Z., Mann, J. K., Zechiedrich, E. L., & Chan, H. S. (2006). Topological information embodied in local juxtaposition geometry provides a statistical mechanical basis for unknotting by type-2 DNA topoisomerases. *Journal of molecular biology*, 361(2), 268-285.
- Ljungman, M., & Hanawalt, P.C. (1995). Presence of negative torsional tension in the promoter region of the transcriptionally poised dihydrofolate reductase gene in vivo. *Nucleic Acids Res*23: 1782 – 1789.

BIBLIOGRAFIA

Lotito, L., Russo, A., Chillemi, G., Bueno, S., Cavalieri, D., & Capranico, G., (2008). Global transcription regulation by DNA topoisomerase I in exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation of telomere-proximal genes by TOP1 deletion. *J Mol Biol* 377: 311 – 322

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260.

Lutter, L. C., Judis, L., & Paretti, R. F. (1992). Effects of histone acetylation on chromatin topology in vivo. *Molecular and cellular biology*, 12(11), 5004-5014.

Lynch, A. S., & Wang, J. C. (1993). Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *Journal of bacteriology*, 175(6), 1645-1655.

Lynn, R. M., Bjornsti, M. A., Caron, P. R., & Wang, J. C. (1989). Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), 3559–3563.

Lyu, Y. L., & Wang, J.C., (2003) Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7123–7128

Lyu, Y. L., Lin, C. P., Azarova, A. M., Cai, L., Wang, J. C., & Liu, L. F. (2006). Role of topoisomerase IIβ in the expression of developmentally regulated genes. *Molecular and cellular biology*, 26(21), 7929-7941.

Maeshima, K., & Laemmli, U. K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Developmental cell*, 4(4), 467-480.

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

Massé, E., & Drolet, M. (1999). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16659-16664.

Matsumoto, K., & Hirose, S., (2004) Visualization of unconstrained negative supercoils of DNA on polytene chromosomes of *Drosophila*. *J Cell Sci* 117: 3797 – 3805

McCoubrey, W. K., & Champoux, J. J. (1986). The role of single-strand breaks in the catenation reaction catalyzed by the rat type I topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(11), 5130-5137.

Menzel, R., & Gellert, M. (1983). Regulation of the genes for E. coli DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell*, 34(1), 105-113

Merino, A., Madden, K. R., Lane, W. S., Champoux, J. J., & Reinberg, D. (1993). DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature*. 1993 Sep 16;365(6443):227-32.

Mizutani M., Ohta, T., Watanabe, H., Handa, H., & Hirose, S., (1991) Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 718 – 722

Mizutani, M., Ura, K., & Hirose, S., (1991) DNA superhelicity affects the formation of transcription preinitiation complex on eukaryotic genes differently. *Nucleic Acids Res* 19: 2907 – 2911

Monastyrsky (ed). (2007). Topology in molecular biology. berlin : springer .

Mondal, N., & Parvin, J.D., (2001) DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 413: 435–438

Mönnich, M., Hess, I., Wiest, W., Bachrati, C., Hickson, I. D., Schorpp, M., & Boehm, T. (2010). Developing T lymphocytes are uniquely sensitive to a lack of topoisomerase III alpha. *European journal of immunology*, 40(9), 2379-2384.

Morham, S. G., Kluckman, K. D., Voulomanos, N., & Smithies, O. (1996). Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Molecular and cellular biology*, 16(12), 6804-6809.

Muller, M. T., Pfund, W. P., Mehta, V. B., & Trask, D. K. (1985). Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *The EMBO journal*, 4(5), 1237.

Nagano, S., Lin, T. Y., Reddy, J., & Heddle, J. G. (2014). Unique features of apicoplast DNA gyrases from *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *BMC bioinformatics*, 15(1), 416.

BIBLIOGRAFIA

Naughton, C., Avlonitis, N., Corless, S., Prendergast, J.G., Mati, I.K., Eijk, P.P., Cockroft, S.L., Bradley, M., Ylstra, B., & Gilbert, N., (2013) Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures. *NatStruct Mol Biol* 20: 387 – 395.

Nelson, D. A. (1982). Histone acetylation in baker's yeast. Maintenance of the hyperacetylated configuration in log phase protoplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 257(4), 1565-1568.

Nelson, E. M., Tewey, K. M., & Liu, L. F. (1984). Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), 1361-1365.

Nelson, P. (1999). Transport of torsional stress in DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14342-14347.

Newport, J. (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell*, 48(2), 205-217.

Oh, D.B., Kim, Y.G., & Rich, A., (2002). Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 24;99(26):16666-71.

Olins, D. E., & Olins, A. L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(10), 809-814.

Oliveira-Costa, J. P., Zanetti, J., Oliveira, L. R., Soares, F. A., Ramalho, L. Z., Ramalho, F. S., & Ribeiro-Silva, A. (2010). Significance of topoisomerase III β expression in breast ductal carcinomas: strong associations with disease-specific survival and metastasis. *Human pathology*, 41(11), 1624-1630.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., & Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4(4), 281-300.

Parvin, J.D., & Sharp, P.A., (1993). DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* 73: 533 – 540

Patterson, H. G., Landel, C. C., Landsman, D., Peterson, C. L., & Simpson, R. T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7268-7276.

- Paulson, J. R., & Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12(3), 817-828.
- Pedersen, J. M., Fredsoe, J., Roedgaard, M., Andreasen, L., Mundbjerg, K., Kruhøffer, M., ... & Andersen, A. H. (2012). DNA topoisomerases maintain promoters in a state competent for transcriptional activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*. e1003128.
- Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M. K., Christiansen, D. H., & Nerlov, C. (2002). Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood*, 99(6), 1909-1912.
- Pérez-Ortín, J. E., Estruch, F., Matallana, E., & Franco, L. (1987). Fine analysis of the chromatin structure of the yeast SUC2 gene and of its changes upon derepression. Comparison between the chromosomal and plasmid-inserted genes. *Nucleic acids research*, 15(17), 6937-6956.
- Pérez-Ortín, J. E., Matallana, E., & Franco, L. (1989). Chromatin structure of yeast genes. *Yeast*, 5(4), 219-238.
- Plank, J. L., Chu, S. H., Pohlhaus, J. R., Wilson-Sali, T., & Hsieh, T. S. (2005). *Drosophila melanogaster* topoisomerase III α preferentially relaxes a positively or negatively supercoiled bubble substrate and is essential during development. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3564-3573.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., ... & Young, R. A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122(4), 517-527.
- Potter, E., Jha, M., Bhullar, K. S., Rupasinghe, H. V., Balzarini, J., & Jha, A. (2015). Investigation of fatty acid conjugates of 3, 5-bisarylmethylene-4-piperidone derivatives as antitumor agents and human topoisomerase-II α inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(3), 411-421.
- Prada, C. F., Álvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R., Prieto, C., Calvo-Álvarez, E., Escudero-Martínez, J. M., ... & Reguera, R. M. (2013). Gimitecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. *Biochemical pharmacology*, 85(10), 1433-1440.
- Prunell, A. (1998). A topological approach to nucleosome structure and dynamics: the linking number paradox and other issues. *Biophysical journal*, 74(5), 2531-2544.
- Pruss, G. J., Manes, S. H., & Drlica, K. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, 31(1), 35-42

BIBLIOGRAFIA

Raisner, R. M., Hartley, P. D., Meneghini, M. D., Bao, M. Z., Liu, C. L., Schreiber, S. L., ... & Madhani, H. D. (2005). Histone variant H2A. Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123(2), 233-248.

Rando, O. J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Current opinion in genetics & development*, 22(2), 148-155.

Rattner, J. B., Hendzel, M. J., Furbee, C. S., Muller, M. T., & Bazett-Jones, D. P. (1996). Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle-and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *The Journal of cell biology*, 134(5), 1097-1107.

Redinbo, M. R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J. J., & Hol, W. G. (1998). Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*, 279(5356), 1504-1513.

Reece, R. J., Maxwell, A., & Wang, J. C. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3-4), 335-375.

Reeves, R. (1984). Transcriptionally active chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 782(4), 343-393.

Remus, D., Beall, E.L., & Botchan, M.R., (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for Drosophila ORC-DNA binding. *EMBO J* Feb 25;23(4):897-907.

Richmond, T., & Finch, J. (1984). The structure of the nucleosome core particle. *Nature (London)*, 311, 532-537.

Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases*, 6(10), 629-640.

Roca, J., Berger, J.M., Harrison, S.H., & Wang, J.C., (1996). DNA transport by type II DNA topoisomerases: direct evidence of a two gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4057-4062.

Roca, J., Ishida, R., Berger, J.M., Andoh, T., & Wang, J.C., (1994). Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 1781-1785

Roca, J.(1995). The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends in biochemical sciences*, 20 (4), 156-160.

Roca, J. (2001). Varying levels of positive and negative supercoiling differently affect the efficiency with which topoisomerase II catenates and decatenates DNA. *Journal of molecular biology*, 305(3), 441-450.

Roca, J. (2004). The path of the DNA along the dimer interface of topoisomerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25783-25788.

Roca, J. (2009). Topoisomerase II: a fitted mechanism for the chromatin landscape. *Nucleic acids research*, 37(3), 721-730.

Roca, J., & Mezquita, C., (1989). DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *EMBO J* 8: 1855–1860.

Roca, J., & Wang, J.C., (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 71: 833–840.

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

Roca, J., & Wang, J.C., (1996). The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells* 1: 17 – 27.

Rodley, G.A., Scobie, R.S., Bates, R.H., & Lewitt, R.M., (1976). A possible conformation for double-stranded polynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73(9):2959-63.

Rodríguez-Campos, A., & Azorín, F. (2007). RNA is an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS One*, 2(11), e1182.

Rowe, T. C., Tewey, K. M., & Liu, L. F. (1984). Identification of the breakage-reunion subunit of T4 DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 259(14), 9177-9181.

Rybenkov, V.V., Ullsperger, C., Vologodskii, A.V., & Cozzarelli, N.R. (1997a) Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science*, 277, 690–693.

Rybenkov, V. V., Vologodskii, A. V., & Cozzarelli, N. R. (1997b). The effect of ionic conditions on DNA helical repeat, effective diameter and free energy of supercoiling. *Nucleic Acids Research*, 25(7), 1412–1418.

BIBLIOGRAFIA

Saavedra, R. A., & Huberman, J. A. (1986). Both DNA topoisomerases I and II relax 2 μ m plasmid DNA in living yeast cells. *Cell*, 45(1), 65-70.

Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R., & Earnshaw, W. C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *The Journal of Cell Biology*, 127(2), 303-318.

Saitoh, Y., & Laemmli, U. K. (1993, January). From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 58, pp. 755-765). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schäfer, G., McEvoy, C. R., & Patterson, H. G. (2008). The *Saccharomyces cerevisiae* linker histone Hho1p is essential for chromatin compaction in stationary phase and is displaced by transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 14838-14843.

Schmidt, B. H., Burgin, A. B., Dewese, J. E., Osheroff, N., & Berger, J. M. (2010). A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature*, 465(7298), 641-644.

Schofield, M. A., Agbunag, R., & Miller, J. H. (1992). DNA inversions between short inverted repeats in *Escherichia coli*. *Genetics*, 132(2), 295-302.

Schultz, M. C., Brill, S. J., Ju, Q. I. D. A., Sternglanz, R., & Reeder, R. H. (1992). Topoisomerases and yeast rRNA transcription: negative supercoiling stimulates initiation and topoisomerase activity is required for elongation. *Genes & Development*, 6(7), 1332-1341.

Sekinger, E. A., Moqtaderi, Z., & Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Molecular cell*, 18(6), 735-748.

Shuman, S., & Moss, B. (1987). Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7478-7482.

Shure, M., & Vinograd, J. (1976). The number of superhelical turns in native virion SV40 DNA and minicol DNA determined by the band counting method. *Cell*, 8(2), 215-226.

Shykind, B. M., Kim, J., Stewart, L., Champoux, J. J., & Sharp, P. A. (1997). Topoisomerase I enhances TFIIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes & development*, 11(3), 397-407.

Sinden, R. R., & Pettijohn, D. E. (1981). Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(1), 224-228.

Sinden, R. R., & Ussery, D. W. (1992). Analysis of DNA structure in vivo using psoralen photobinding: measurement of supercoiling, topological domains, and DNA-protein interactions. *Methods in enzymology*, 212, 319-335.

Sinden, R. R., Carlson, J. O., & Pettijohn, D. E. (1980). Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells: analogous measurements in insect and human cells. *Cell*, 21(3), 773-783.

Sivolob, A., Lavelle, C., & Prunell, A. (2003). Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain. *Journal of molecular biology*, 326(1), 49-63.

Sivolob, A., & Prunell, A. (2004). Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 362(1820), 1519-1547.

Slyter, H.S., Shih, T.Y., Adler, A.J., & Fasman, G.D., (1972). Electron microscopy and circular dichroism studies on chromatin. *Biochemistry*. Aug 1;11(16):3044-54.

Slesarev, A. I., Stetter, K. O., Lake, J. A., Gellert, M., Krah, R., & Kozyavkin, S. A. (1993). DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature*, 364(6439), 735-737.

Smith, S. B., Cui, Y., & Bustamante, C. (1996). Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules. *science*, 271, 795.

Sperling, A. S., Jeong, K. S., Kitada, T., & Grunstein, M. (2011). Topoisomerase II binds nucleosome-free DNA and acts redundantly with topoisomerase I to enhance recruitment of RNA Pol II in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12693-12698.

Srivenugopal, K. S., Lockshon, D., & Morris, D. R. (1984). *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry*, 23(9), 1899-1906.

BIBLIOGRAFIA

Stewart, A. F., Herrera, R. E., & Nordheimt, A. (1990). Rapid induction of c-fos transcription reveals quantitative linkage of RNA polymerase II and DNA topoisomerase I enzyme activities. *Cell*, 60(1), 141-149.

Stewart, L., Redinbo, M. R., Qiu, X., Hol, W. G., & Champoux, J. J. (1998). A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, 279(5356), 1534-1541.

Stigter, D. (1998). An electrostatic model for the dielectric effects, the adsorption of multivalent ions, and the bending of B-DNA. *Biopolymers*, 46(7), 503-516.

Strick, R., Strissel, P. L., Gavrilov, K., & Levi-Setti, R. (2001). Cation–chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *The Journal of cell biology*, 155(6), 899-910.

Stuchinskaya, T., Mitchenall, L. A., Schoeffler, A. J., Corbett, K. D., Berger, J. M., Bates, A. D., & Maxwell, A. (2009). How do type II topoisomerases use ATP hydrolysis to simplify DNA topology beyond equilibrium? Investigating the relaxation reaction of nonsupercoiling type II topoisomerases. *Journal of molecular biology*, 385(5), 1397-1408.

Stupina, V. A., & Wang, J. C. (2005). Viability of Escherichia coli topA mutants lacking DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 355-360.

Sugino, A., Peebles, C. L., Kreuzer, K. N., & Cozzarelli, N. R. (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 4767-4771.

Sumner, A. T. (1996). The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Research*, 4(1), 5-14.

Sun, J., Zhang, Q., & Schlick, T., (2005). Electrostatic mechanism of nucleosomal array folding revealed by computer simulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 8180–8185.

Suski, C., & Marians, K. J. (2008). Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Molecular cell*, 30(6), 779-789.

Tabuchi, H., Hirose, S., (1988). DNA supercoiling facilitates formation of the transcription initiation complex on the fibroin gene promoter. *J Biol Chem* 263: 15282 – 15287.

Taneja, B., Schnurr, B., Slesarev, A., Marko, J. F., & Mondragón, A. (2007). Topoisomerase V relaxes supercoiled DNA by a constrained swiveling mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(37), 14670-14675.

Takahashi, Y., Yong-Gonzalez, V., Kikuchi, Y., & Strunnikov, A. (2006). SIZ1/SIZ2 control of chromosome transmission fidelity is mediated by the sumoylation of topoisomerase II. *Genetics*, *172*(2), 783-794.

Takei, M., Fukuda, H., Kishii, R., & Hosaka, M. (2001). Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(12), 3544-3547.

Teves, S.S., & Henikoff, S. (2014). Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* *21*: 88 – 94.

Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, *226*(4673), 466-468.

Thakurela, S., Garding, A., Jung, J., Schübeler, D., Burger, L., & Tiwari, V. K. (2013). Gene regulation and priming by topoisomerase II α in embryonic stem cells. *Nature communications*, *4*.

Thoma, F., Koller, T., & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of cell biology*, *83*(2), 403-427.

Thoma, F., & Koller, T. (1981). Unravelled nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone components and histone H1. *Journal of molecular biology*, *149*(4), 709-733.

Thrash, C., Bankier, A. T., Barrell, B. G., & Sternglanz, R. (1985). Cloning, characterization, and sequence of the yeast DNA topoisomerase I gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(13), 4374-4378.

Tiwari, V. K., Burger, L., Nikolettou, V., Deogracias, R., Thakurela, S., Wirbelauer, C., ... & Schübeler, D. (2012). Target genes of Topoisomerase II β regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(16), E934-E943.

Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2005). DNA supercoiling—a global transcriptional regulator for enterobacterial growth?. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(2), 157-169.

BIBLIOGRAFIA

Trigueros, S., & Roca, J. (2001). Circular minichromosomes become highly recombinogenic in topoisomerase-deficient yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2243-2248.

Trigueros, S., & Roca, J., (2002), Failure to relax negative supercoiling of DNA is a primary cause of mitotic hyper-recombination in topoisomerase-deficient yeast cells. *J Biol Chem* 277: 37207 – 37211

Tsao, Y. P., Russo, A., Nyamuswa, G., Silber, R., & Liu, L. F. (1993). Interaction between replication forks and topoisomerase I-DNA cleavable complexes: studies in a cell-free SV40 DNA replication system. *Cancer research*, 53(24), 5908-5914.

Tsao, Y. P., Wu, H. Y., & Liu, L. F. (1989). Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell*, 56(1), 111-118.

Tse, Y. C., & Wang, J. C. (1980). E. coli and M. luteus DNA topoisomerase I can catalyze catenation or decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell*, 22(1), 269-276.

Tse-Dinh, Y. C. (2007). Exploring DNA topoisomerases as targets of novel therapeutic agents in the treatment of infectious diseases. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 7(1), 3-9.

Tse-Dinh, Y. C., & Beran, R. K. (1988). Multiple promoters for transcription of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. *Journal of molecular biology*, 202(4), 735-742.

Tsutsui, K., Okada, S., Watanabe, M., Shohmori, T., Seki, S., & Inoue, Y. (1993). Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 19076-19083.

Turley, H., Comley, M., Houlbrook, S., Nozaki, N., Kikuchi, A., Hickson, I. D. & Harris, A. L. (1997). The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *British journal of cancer*, 75(9), 1340.

Uemura, T., & Yanagida, M. (1984). Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast: single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization. *The EMBO Journal*, 3(8), 1737.

Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., & Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell*, 50(6), 917-925.

Ushinsky, S. C., Bussey, H., Ahmed, A. A., Wang, Y., Friesen, J., Williams, B. A., & Storms, R. K. (1997). Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(2), 151-161.

Van Holde, K. Chromatin (1989) Springer-Verlag, New York

Van Holde, K., & Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10548-10555.

Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., & Becker, P. B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388(6642), 598-602.

Vologodskii, A. (1998). Exploiting circular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4092-4093.

Vologodskii, A. V., Zhang, W., Rybenkov, V. V., Podtelezhnikov, A. A., Subramanian, D., Griffith, J. D., & Cozzarelli, N. R. (2001). Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3045-3049.

Vologodsky, A., (1992). *Topology and Physics of Circular DNA*. Boca Raton, Florida. CRC Press.

Walker, P. M. B. (1971). "Repetitive" DNA in higher organisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 23, 145-190.

Wallis, J. W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., & Rothstein, R. (1989). A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 58 (2), 409-419.

Wang, J.C., (1971). Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol.* 55(3):523-33.

Wang, J. C. (1979). Helical repeat of DNA in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 200-203.

Wang, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(6), 430-440.

BIBLIOGRAFIA

Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A., & Berger, J. M. (2012). The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *Journal of molecular biology*, 424(3), 109-124.

Widom, J. (1998). Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27(1), 285-327.

Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I., & Bloomfield, V. A. (2001). Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophysical Journal*, 80(4), 1932-1939.

Williams, L.D. & Maher, L.J. (2000). Electrostatic Mechanisms of DNA Deformation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29, 497-521

Woodcock, C. L., Frado, L. L., & Rattner, J. B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *The Journal of cell biology*, 99(1), 42-52.

Wu, H. Y., Shyy, S., Wang, J. C., & Liu, L. F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, 53(3), 433-440.

Wu, L., Davies, S. L., North, P. S., Goulaouic, H., Riou, J. F., Turley, H., ... & Hickson, I. D. (2000). The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9636-9644.

Wu, J., Phatnani, H. P., Hsieh, T. S., & Greenleaf, A. L. (2010). The phosphoCTD-interacting domain of Topoisomerase I. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(1), 117-119.

Wyrick, J. J., Holstege, F. C., Jennings, E. G., Causton, H. C., Shore, D., Grunstein, M., ... & Young, R. A. (1999). Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature*, 402(6760), 418-421.

Yan, J., Magnasco, M. O., & Marko, J. F. (1999). A kinetic proofreading mechanism for disentanglement of DNA by topoisomerases. *Nature*, 401(6756), 932-935.

Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J., & Wang, J. C. (2000). DNA topoisomerase II β and neural development. *Science*, 287(5450), 131-134.

- Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., ... & Schellenberg, G. D. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science*, 272(5259), 258-262.
- Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J., & Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*, 309(5734), 626-630.
- Zhang, H. J. C. W., Wang, J. C., & Liu, L. F. (1988). Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(4), 1060-1064.
- Zhang, H., D'arpa, P., & Liu, L. F. (1990). A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. *Cancer cells (Cold Spring Harbor, NY: 1989)*, 2(1), 23-27.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18(11), 1639-1642.
- Zhu, Q., Pongpech, P., & DiGate, R. J. (2001). Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9766-9771.
- Zimmerman, S.B., (1982). The three-dimensional structure of DNA. *Annu Rev Biochem* 51:395-427

BIBLIOGRAFIA