

Elisa Turriani
Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale
Università di Pisa
Scuola Normale Superiore di Pisa,
elisa.turriani@sns.it

Z-DNA, STABILITÀ ED INTERAZIONE CON IL COLORANTE CIANINICO TO

La conformazione levogira può essere indotta, nel DNA, da diversi fattori quali sequenza, presenza di ioni metallici, solventi o molecole organiche. Negli ultimi anni la scoperta della presenza in vivo di tale struttura ha rinnovato l'interesse verso di essa. In questo lavoro è presentata l'analisi dell'equilibrio tra diverse forme di DNA levogiro e della loro interazione con l'intercalante TO.

La scoperta del DNA levogiro e la risoluzione cristallografica della sua struttura nel 1972 [1] diedero inizio a numerose ricerche con lo scopo di comprendere il meccanismo attraverso il quale diversi fattori, quali ioni metallici, molecole organiche, solventi e sequenza possano influenzare l'equilibrio tra B-DNA (destrogiro) e Z-DNA (levogiro). Contemporaneamente un grande impegno fu diretto verso l'identificazione del ruolo di questa struttura *in vivo*. Dopo un periodo iniziale di grande interesse, l'apparente mancanza di un ruolo biologico per lo Z-DNA causò una diminuzione dell'attenzione per questa struttura. Recentemente però è stato dimostrato come lo Z-DNA sia coinvolto in un gran numero di eventi biologici. Ad esempio è stato ipotizzato il coinvolgimento di strutture non-B di DNA nella pato-fisiologia di malattie neurodegenerative [2] associate con alterazioni delle normali funzioni cellulari.

Si ritiene inoltre che lo Z-DNA abbia un ruolo nella regolazione dell'espressione genetica e che possa esistere transitoriamente durante la trascrizione, contribuendo alla riduzione dello stress torsionale [3]. A supporto di questa ipotesi, sequenze che potenzialmente favoriscono l'adozione di una struttura levogira sono state identificate in regioni di trascrizione attiva [4]. Infine, nel 2003 presso il laboratorio di A. Rich, è stato scoperto che esistono proteine che interagiscono selettivamente con il DNA levogiro, ne è un esempio la proteina E3L del *Vaccinia Virus* (VV) [5], necessaria per bloccare la risposta immunitaria nell'organismo infettato. Per questi motivi, è di grande interesse lo studio dei meccanismi che favoriscono la struttura levogira del DNA *in*

vivo, e della sua stabilità. Il DNA levogiro si può presentare con varie strutture, lo Z-DNA, il primo ad essere descritto, Z'-DNA e Z*-DNA. Quest'ultimo è una forma aggregata della struttura Z.

Lo studio della capacità di alcuni farmaci di interagire selettivamente con determinate conformazioni e sequenze di acidi nucleici è necessario per lo sviluppo di sostanze specifiche per "target" presenti in particolari patologie. Molecole fluorescenti intercalanti, quali i coloranti cianinici, sono state ampiamente utilizzate come antitumorali [6], agenti di contrasto per microscopia [7] e per l'identificazione di sequenze in DNA [8], grazie alla loro selettività. Il Thiazole Orange (TO), si lega fortemente sequenze di DNA ricche in ripetizioni GC, quali il poly(dG-dC)poly(dG-dC).

Il TO è praticamente non fluorescente in soluzione, ma una volta intercalato nella doppia elica del DNA vede il proprio rendimento quantico aumentare di un fattore 1.000 [9]. Questo colorante cationico, è stato scelto per lo studio per la sua capacità di "light-switching" e per la selettività per sequenze di DNA ricche in GC, queste, infatti, sono quelle per le quali è favorita la formazione di strutture levogire.

Nello studio presentato, sono state analizzate le transizioni B↔Z↔Z* e l'interazione tra il DNA levogiro e l'intercalante TO tramite tecniche quali fluorescenza, assorbanza, dicroismo circolare e calorimetria differenziale a scansione. Il meccanismo di interazione è stato esaminato tramite la tecnica cinetica T-jump. Il polinucleotide sintetico poly(dG-me⁵dC)poly(dG-me⁵dC) che adotta la struttura levogira in condizioni di bassa concentrazione di sali è stato scelto per questo studio.

Elisa Turriani è stata insignita del premio "Fernando Pulidori" 2011.

Risultati e discussione

Equilibri B-DNA ↔ DNA-levogiro

La spettroscopia UV ed il dicroismo circolare (CD) permettono entrambi di distinguere tra forma destrogira e levogira di DNA, ma il CD è senz'altro il metodo più efficace per identificare il DNA levogiro. Lo spettro di CD dello Z-DNA, infatti, presenta una totale inversione delle bande rispetto al B-DNA (Fig. 1).

Grazie al buon rapporto segnale rumore, è possibile seguire le transizioni B ↔ Z con la spettroscopia UV/Vis. Per lo studio cinetico della conversione destrogira-levogira è stata misurata la variazione di assorbanza del polimero con il tempo, sono state scelte tre diverse condizioni: (a) in presenza del solo Mg²⁺, (b) solo EtOH 16%, (c) in presenza di una miscela di EtOH e Mg²⁺. Nelle condizioni (a) e (b) sono state ottenute cinetiche mono-esponenziali, nel caso della miscela EtOH/Mg²⁺ (c) è stata ottenuta una cinetica bi-esponenziale. Le costanti ottenute sono riportate in Tab. 1.

La formazione di due strutture in equilibrio termico tra loro, suggerita dalla bi-esponenzialità delle curve ottenute in presenza della miscela EtOH/Mg²⁺, è stata confermata con esperimenti di calorimetria differenziale a scansione e la registrazione di spettri CD ed assorbanza a diverse temperature (20-60 °C).

La cinetica della conversione Z → B è veloce ed è stata esplorata tramite la tecnica *stopped-flow*. Lo studio ha riguardato lo Z-DNA ottenuto in presenza del solo Mg²⁺ (a). Il trattamento con EDTA in concentrazione 10 volte superiore a quella dello ione metallico ha assicurato la sua completa rimozione ed il ritorno della doppia elica alla conformazione destrogira. Dal trattamento delle curve mono-esponenziali ottenute per un campo di temperature comprese tra 20 e 45 °C, sono stati ricavati i parametri termodinamici riportati in Tab. 2.

L'analisi dei risultati ottenuti nello studio delle transizioni B ↔ Z suggerisce che, nel caso del cambiamento conformazionale ottenuto in presenza del solo Mg²⁺ o EtOH, si arrivi ad una stessa struttura finale, corrispondente con lo Z-DNA descritto in letteratura per il poly(dG-dC)poly(dG-dC) in presenza del solo Mg²⁺ come induttore. Il meccanismo del riarrangiamento strutturale è basato sulla disidratazione della catena polinucleotidica e sulla conseguente riorganizzazione dei legami a idrogeno tra le coppie di basi. In presenza del solo Mg²⁺ la differenza tra i parametri di attivazione mostra che il processo di conversione B → Z è endotermico e porta ad un notevole aumento di entropia. La variazione dell'entropia del sistema può essere attribuita a due fattori: la riorganizzazione della struttura del polinucleotide (irrigidimento) [11] e la sua disidratazione [12], con prevalenza di quest'ultimo processo nel bilancio entropico finale. La conversione è dovuta all'interazione dello ione [Mg(H₂O)₆]²⁺ con i grup-

Tab. 1 - Parametri cinetici per la transizione B → Z in diverse condizioni sperimentali. C_P = 3.9 × 10⁻⁵ M, MgCl₂ = 3,5 mM, EtOH = 16% (v/v), l = 0,10, pH = 7,0, T = 25 °C

	10 ⁴ 1/τ ₁ /s ⁻¹	10 ⁴ 1/τ ₂ /s ⁻¹
Mg ²⁺	-	1,86±0,03
EtOH	-	1,69±0,01
Mg ²⁺ +EtOH	53,4±0,9	2,82±0,24

Tab. 2 - Valori dei parametri di attivazione ΔH[‡] e ΔS[‡] per le reazioni B → Z [10] e Z → B

	B → Z	Z → B
ΔH [‡] /kJ mol ⁻¹	134	92±3
ΔS [‡] /J mol ⁻¹ K ⁻¹	212	44±10

pi fosfato e le guanine del DNA, in particolare la formazione di legami a sfera esterna tra le molecole d'acqua della sfera di coordinazione dello ione Mg²⁺ e l'azoto N7 della guanina. Nel caso della conversione ottenuta in presenza della miscela EtOH/Mg²⁺, il cambiamento di conformazione procede attraverso un meccanismo diverso, che porta all'ottenimento di una forma aggregata Z* simile a quella ottenuta per poly(dG-dC)poly(dG-dC) [13]. In questo caso, l'etanolo, oltre a perturbare l'idratazione della catena di DNA, si sostituisce all'acqua di coordinazione dello ione [Mg(H₂O)₆]²⁺, inducendo una destabilizzazione delle rimanenti molecole d'acqua, accelerando l'interazione tra Mg²⁺ e polinucleotide. Ad un effetto dovuto all'azione sinergica di EtOH ed Mg²⁺ nella conversione destrogira-levogira, succede uno stadio più lento dovuto alla formazione dell'aggregato Z*-DNA.

Interazioni TO/DNA-levogiro

I coloranti cianinici come il TO tendono, a causa delle loro caratteristiche strutturali, a formare aggregati, come dimeri o trimeri [14]. Per questo motivo lo studio delle interazioni tra il TO e polinucleotidi deve essere preceduto da un'analisi delle condizioni in cui il colorante forma tali aggregati. Le condizioni che portano all'aggregazione del TO in soluzione acquosa sono note dalla letteratura [9], tuttavia questo fenomeno è fortemente dipendente dalle caratteristiche del solvente. Per il lavoro qui riportato, dunque, gli autori hanno analizzato l'aggregazione del TO in presenza di EtOH 16% [15]. I risultati ottenuti hanno permesso di selezionare condizioni sperimentali in cui le concentrazioni del dimerico TO-TO fossero trascurabili (<5% del "colorante" totale).

L'interazione del TO con il DNA-levogiro è stata studiata mediante fluorescenza, assorbanza e dicroismo circolare. Nel caso dello Z-DNA ottenuto in presenza dei soli Mg²⁺ o EtOH, l'interazione con il colorante causa un rapido cambiamento

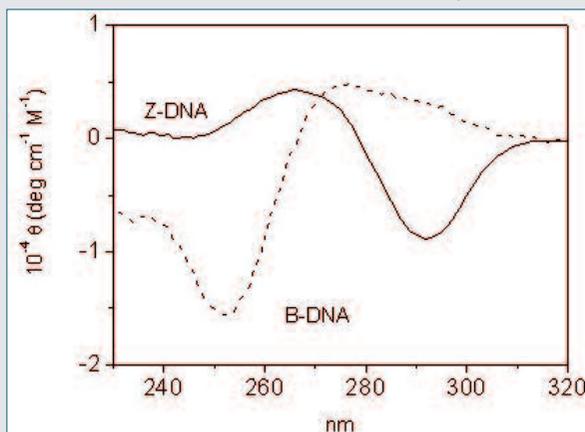


Fig. 1 - Spettri di dicroismo circolare di B-DNA (tratteggiato) e Z-DNA (linea continua). Conversione ottenuta con Mg²⁺ 3,5 mM, pH=7,0, l=0,10, T=25 °C

conformazionale con ritorno alla forma destrogira B fin dalle prime aggiunte di fluoroforo. In titolazioni di dicroismo circolare, effettuate aggiungendo quantità crescenti di TO ad un campione contenente Z-DNA, si è osservata una conversione completa per valori del rapporto $C_D/C_P \approx 0,1$, dove C_D è la concentrazione del "dye" TO e C_P è la concentrazione del polimero in paia di basi. Il cambiamento conformazionale è chiaramente individuabile nello spettro CD del campione (Fig. 2) grazie alla completa inversione delle bande. Nel caso del DNA-levogiro ottenuto in presenza di una miscela dei due cofattori EtOH ed Mg^{2+} (EtOH 16%, $[Mg^{2+}]$ 3,5 mM), la titolazione con TO non ha causato tale inversione nelle bande di CD del polinucleotide per valori di $C_D/C_P \leq 0,1$. Per il DNA-levogiro ottenuto in queste condizioni dunque, l'aggiunta di TO non provoca un ritorno alla forma B. Questo risultato, unito alle osservazioni ottenute dallo studio della transizione B-DNA \rightleftharpoons DNA-levogiro, ha portato alla formulazione dell'ipotesi che la conformazione ottenuta con la miscela EtOH/ Mg^{2+} sia la forma Z^* , per la quale, già nel caso del poly(dG-dC)poly(dG-dC), era stata osservata una maggiore stabilità nei confronti di molecole intercalanti [13]. Tale ipotesi è

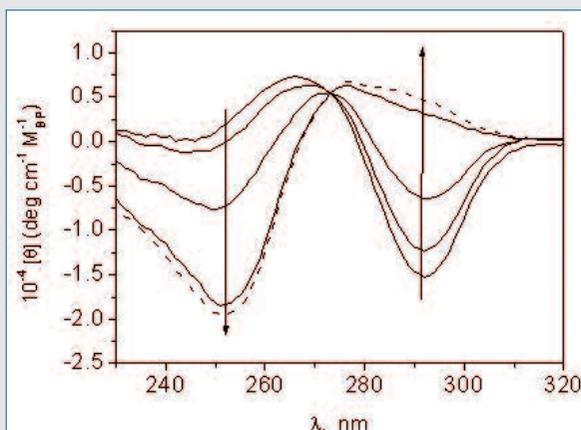


Fig. 2 - Spettri di dicroismo circolare registrati durante una titolazione con TO di Z-DNA, $C_P = 5,8 \times 10^{-5}$ M, $C_D=0$ (linea continua), $C_D=5,5 \times 10^{-6}$ M (linea tratteggiata), Z-DNA ottenuto in presenza di Mg^{2+} 3,5 mM, $I=0,10$ (NaCl), pH=7,0, T=25 °C

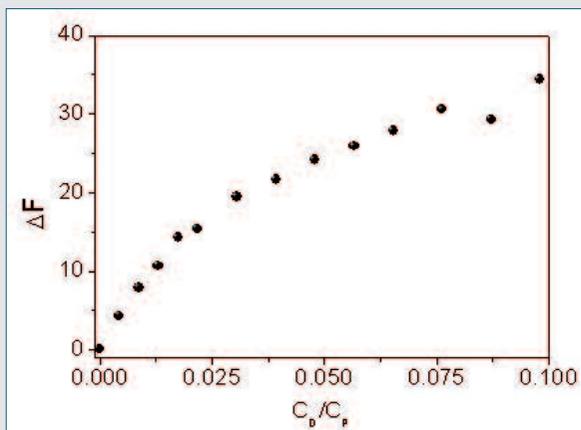


Fig. 3 - Variazione della fluorescenza del TO durante una titolazione di Z^* -DNA. $C_P=2,9 \times 10^{-5}$ M, $C_D=0 \div 2,9 \times 10^{-6}$ M, EtOH=16%, $Mg^{2+}=3,5$ mM, pH=7,0, T=25 °C, $\lambda_{exc}=500$ nm, $\lambda_{em}=528$ nm

stata confermata da titolazioni di fluorescenza che hanno dimostrato che il TO forma un intercalato stabile con lo Z^* -DNA. Nel corso di tali titolazioni, a soluzioni di Z^* -DNA sono state aggiunte quantità crescenti di colorante (nel campo di concentrazioni in cui $C_D/C_P \leq 0,1$). La fluorescenza del TO, all'aumentare della concentrazione di polinucleotide, ha mostrato un aumento tendente ad un plateau, elemento indicativo di un'interazione tra il "dye" ed il polinucleotide (Fig. 3).

La reazione è stata trattata come un sistema semplice $P + D \rightleftharpoons PD_{tot}$ caratterizzato da una costante di equilibrio K_{eq} . L'applicazione dell'equazione di Hildebrand e Benesi [16] ha permesso di ottenere le costanti caratterizzanti l'equilibrio, riportate in Tab. 3.

Al fine di verificare l'influenza della forza ionica della soluzione sulla costante di equilibrio dell'interazione tra Z^* -DNA e TO, sono state esplorate due diverse concentrazioni saline (Tab. 3). È stato osservato che un aumento di 5 volte della forza ionica della soluzione di lavoro da 0,02 M a 0,1 M causa una diminuzione di 2 volte nella costante di equilibrio ($d \log K_{Z^*-DNA} / d \log [Na^+] = -0,5$).

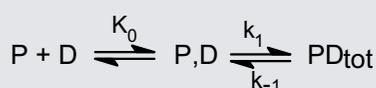
Confrontando questi dati con quelli ottenuti nello studio dell'interazione tra TO e B-DNA ($d \log K_{B-DNA} / d \log [Na^+] = -1,65$ [9]), si osserva che,

nel caso del DNA levogiro, la dipendenza della costante di equilibrio dalla concentrazione di sale è minore.

Questa più modesta dipendenza dalla concentrazione salina indica che, a causa dell'interazione tra Z^* -DNA e TO, viene "allontanato" dal polinucleotide un numero di ioni sodio minore rispetto a quel che avviene nel caso dell'interazione B-DNA/TO. È stato osservato che le interazioni elettrostatiche nel "minor groove" tra ioni sodio e gruppi fosfato, sono più forti nel caso del DNA levogiro [17]. Ciò spiegherebbe perché la rimozione degli ioni Na^+ sia più difficile nel caso dello Z^* -DNA.

Per quanto riguarda la cinetica dell'interazione tra Z^* -DNA e TO, questa è stata studiata tramite *T-jump*, una tecnica che permette lo studio di reazioni veloci (con tempi che variano da 1 μs a 1 s). Lo scopo dello studio cinetico di un sistema quale quello TO/ Z^* -DNA è di far luce sul meccanismo di reazione e permettere un confronto con sistemi simili (in questo caso ad esempio con quanto osservato per l'interazione TO/B-DNA). Le misure al T-jump sono state effettuate nelle condizioni $C_D/C_P < 0,1$ allo scopo di far sì che il polinucleotide fosse interamente in forma levogira. Le curve registrate

hanno dimostrato la presenza di un solo effetto cinetico apprezzabile nella scala dei tempi dell'ordine dei millisecondi. Per l'interazione tra Z^* -DNA e TO è stato proposto un meccanismo caratterizzato da due passaggi:



in cui P è il polimero, D è il colorante, P,D è un complesso precursore e PD è il complesso intercalato.

I valori di $1/\tau$ ottenuti sono stati riportati in grafico in funzione dalla

Tab. 3 - Confronto tra i parametri ottenuti dall'analisi cinetica dei sistemi TO/ Z^* -DNA (Poly[dG-me³dC] Poly[dG-me³dC]) e TO/B-DNA (Calf Thymus), pH=7,0, T=25 °C

	[NaCl]/M	$10^{-3} K_{eq}/M^{-1}$
Z*-DNA/TO	0,02	10,7±1,8
	0,10	5,2±1,9
B-DNA/TO	0,10	170±30

concentrazione di colorante e polinucleotide liberi ovvero $[P]+[D]$ (Fig. 4). La presenza di due stadi nel meccanismo di reazione può essere suggerita da una curvatura in tale grafico. Non è raro tuttavia che, in presenza di un primo effetto caratterizzato da un'interazione puramente elettrostatica, e dunque da un valore di K_0 molto piccolo, la dipendenza di $1/\tau$ da $[P]+[D]$ possa essere descritta da una relazione lineare. In questo caso, la pendenza della retta rappresenta il prodotto K_0k_1 , mentre l'intercetta è k_{-1} .

Poiché le costanti di equilibrio dei due passaggi sono collegate alla costante di equilibrio della reazione globale dalla

relazione $K = K_0 + K_0k_1/k_{-1}$, è stato possibile ricavare i valori di K_0 (Tab. 4) I dati riportati in Tab. 4 mostrano chiaramente che, nel caso dell'interazione Z*-DNA/TO, il primo stadio nel meccanismo di reazione è dovuto ad una semplice interazione elettrostatica (il valore di K_0 è compatibile con questo tipo di interazione).

Il complesso precursore P,D dunque, formato nel primo passaggio dell'interazione di complessazione del DNA levogiro con il TO, è di natura elettrostatica, mentre il complesso intercalato PD si forma nel secondo passaggio della reazione.

Diversamente, nel caso dell'interazione del colorante con il DNA destrogiro, l'elevato valore di K_0 indica che, accanto ad un binding elettrostatico, il primo passaggio della reazione è caratterizzato anche da interazioni tra le superfici del colorante e del polinucleotide. Il minore valore di k_{-1} ottenuto per il sistema Z*-DNA/TO rispetto al sistema B-DNA/TO (Tab. 4)

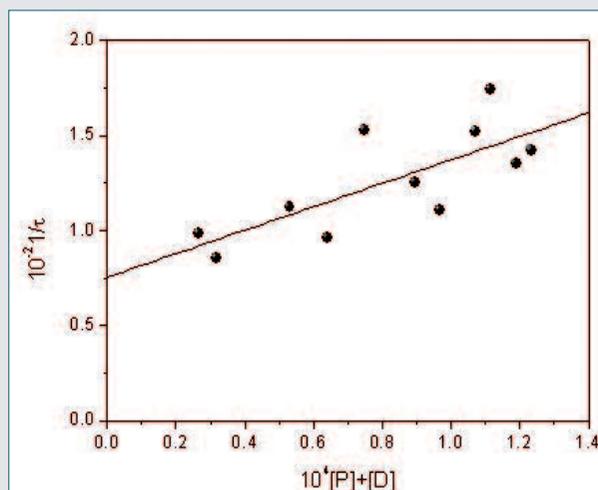


Fig. 4 - Reciproco del tempo di rilassamento, $1/\tau$, in funzione delle concentrazioni dei reagenti per il sistema TO/Z*-DNA. $l=0,11$ M (NaCl 0,09 M, NaCac 0,01 M e Mg^{++} 3,5 mM), EtOH=16%, $T=25$ °C

indica che il colorante penetra meno profondamente tra le basi del polinucleotide nel caso del DNA destrogiro.

La formazione di Z-DNA può essere indotta dalla presenza di Mg^{2+} o EtOH. La presenza di una miscela dei due induttori porta alla formazione di Z*-DNA. Le strutture Z e Z* sono in equilibrio tra loro e la distribuzione all'equilibrio dipende dalla temperatura. Lo "Z*" è una conformazione altamente stabile di DNA levogiro, che presenta le caratteristiche di un aggregato [13]. L'interazione tra il TO e questa forma di DNA levogiro può essere definita specifica, in quanto la particolare stabilità dello Z*-DNA è necessaria per permettere l'intercalazione del colorante ed impedire il ritorno alla struttura destrogira del B-DNA. La specificità dell'interazione tra il TO e lo Z*-DNA fa sì che questa cianina sia un'ottima sonda per la determinazione di questa particolare struttura di DNA. La stabilità del DNA levogiro ottenuto in diverse condizioni e le interazioni del TO con acidi nucleici, sono tuttora oggetto di studio presso il gruppo di ricerca del Prof. F. Secco e della Dott.ssa T. Biver presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Pisa [18, 19].

Tab. 4

Sistema	$10^{-5}K_0k_1$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^{-3}k_1$ (s^{-1})	$10^{-1}k_{-1}$ (s^{-1})	$10^{-3}K_0$ (M^{-1})
TO/Z*-DNA	6,2±2	3,1	7,5±1,5	0,2
TO/B-DNA	240±2	1,6	45±5	15

Bibliografia

- [1] F.M. Pohl, T.M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 375.
- [2] A. Bacolla *et al.*, *DNA Repair*, 2006, **5**, 1161.
- [3] A. Rich, S. Zhang, *Nature Reviews Genetics*, 2003, **4**, 566.
- [4] P.C. Champ *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 2004, **32**, 6501.
- [5] Y.G. Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 1514.
- [6] F.S. Garcia *et al.*, *Trends Photochem. Photobiol.* 2003, **10**, 77.
- [7] H.S. Rye *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 1992, **20**, 2803.
- [8] M. Leijon *et al.*, *Mol. Aspects Med.*, 2006, **27**, 160.
- [9] T. Biver *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, **465**, 90.
- [10] M.A. Fuertes *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, **4**, 759.
- [11] K.K. Irikura *et al.*, *Science*, 1985, **229**, 571.
- [12] T. Umehara *et al.*, *Biopolymers*, 1990, **30**, 649.
- [13] J.H. van de Sande, T. M. Jovin, *EMBO J.*, 1982, **1**, 115.
- [14] K.C. Hannah, B. A. Armitage, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**, 845.
- [15] T. Biver *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 13309.
- [16] H. Benesi, J. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 2703.
- [17] C.C. Sines *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 11048.
- [18] T. Biver *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 13309.
- [19] A. Biancardi *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 12595.

ABSTRACT

Z-DNA, Stability and Interaction with the Cyanine Dye TO

In DNA, left-handed conformation may be induced by several factors such nucleotide sequence, metal ions, solvents or organic molecules. In recent years the discovery of this structure in vivo has renewed the scientific interest towards it. In this work we present the analysis of the equilibrium between different left-handed DNA structures and of their interaction with the intercalating dye TO.