

Relazione Scientifica sui Risultati dell'Attività di Ricerca svolta presso l'Università Rutgers.

Collaborazione con i gruppi di David A. Case e di Wilma K. Olson (BioMaPS Institute and Dept. of Chemistry & Chemical Biology)

Proponente: Caterina Ghio

Fruitore: Susanna Monti

Istituto di afferenza del Fruitore: Istituto per i Processi Chimico-Fisici (IPCF)

Titolo del programma: DNA-sensor Design: Theoretical Investigations of Capture and Hybridization Mechanisms.

Obiettivi Raggiunti: sviluppo di metodologie efficienti per l'analisi qualitativa, quantitativa e la simulazione di nanomateriali di origine biologica con potenziali proprietà sensoriali. Studio di varie sequenze oligonucleotidiche. Studio di strutture intermedie presenti in processi di ricombinazione.

Attività Svolta: il programma di ricerca svolto, concordato con i Dottori Case ed Olson, è stato suddiviso in due diverse linee: 1) studio della conformazione di varie sequenze di RNA (progetto di breve durata); 2) studio di giunzioni di Holliday a quattro vie (DNA): scopo finale di questo studio è la descrizione del fenomeno della migrazione delle giunzioni (progetto di lunga durata). Le linee di ricerca sono state sviluppate contemporaneamente in modo da sfruttare al massimo il periodo di permanenza presso il BioMaPS Laboratory.

Linea 1. RNA

Sono state ottimizzate sequenze diverse di A-RNA: polyApolyU e polyGpolyC, costituite da 24 coppie di basi, la sequenza R(AAAAAAGGGGGGAAAAAAGGGGGG)₂, polyGpolyC formata da 11 coppie di basi e la sequenza GGUCACAGCCC. Le prime tre sono state costruite utilizzando il programma web w3dna sviluppato dall'Università Rutgers, mentre le altre due strutture sono state estratte dal Nucleic Acid Database (NDB) (X-ray: AR0020) e dal Protein Data Bank (X-ray: 1KD5). Le ottimizzazioni sono state eseguite utilizzando vari modelli di solvente implicito (Generalized Born approximation - GB) disponibili in AMBER10 ed hanno avuto lo scopo di verificare l'affidabilità della descrizione. L'analisi dei risultati, eseguita utilizzando appositi programmi sviluppati all'interno del laboratorio BioMapS, ha rivelato che, indipendentemente dal modello GB usato, tutte le strutture ottimizzate presentavano un allargamento del major groove ed un conseguente restringimento del minor groove, entrambi in disaccordo con le osservazioni sperimentali. L'analisi non è però riuscita ad individuare la causa di questa discrepanza e sono stati avviati ulteriori controlli sia sul metodo GB sia sui parametri del campo di forze.

Linea 2: Giunzioni di Holliday a quattro vie.

Introduzione. La ricombinazione genica consiste nella rottura e riunione di doppie eliche omologhe di DNA ed il meccanismo può essere descritto dal modello di Holliday. Questo modello prevede un preciso allineamento di sequenze di DNA omologhe di due doppie eliche parentali, un taglio endonucleolitico con conseguente invasione dell'altra elica da parte di ciascuna elica tagliata, la formazione di una giunzione (intermedio di Holliday) e la migrazione del punto di ramificazione. La successiva risoluzione nelle doppie eliche ricombinanti avviene attraverso il taglio della struttura intermedia. La microscopia elettronica ha dato prova diretta

dell'esistenza delle giunzioni di Holliday, dimostrando l'esistenza di doppie eliche di DNA riunite da tratti di DNA a singola elica ai siti della ricombinazione genetica. La giunzione a 4 vie è accettata come l'intermedio centrale nella ricombinazione genica omologa.

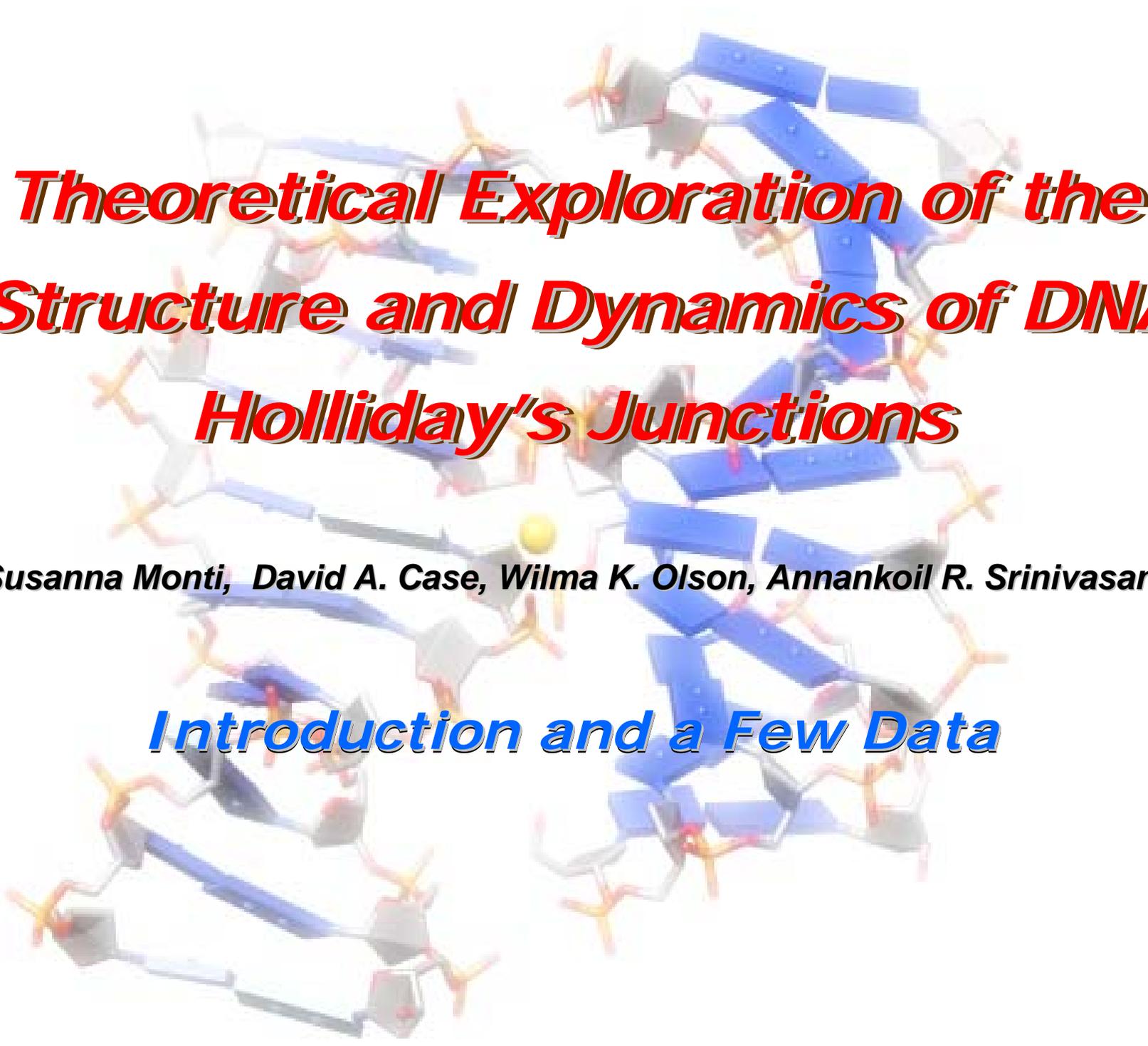
Una significativa distinzione tra le diverse giunzioni a 4 vie sta nella loro potenziale abilità ad effettuare "migrazione di branca", che consiste nello srotolamento e nel riavvolgimento delle doppie eliche di DNA, una volta che la giunzione di Holliday si è formata, causando lo spostamento del punto di incrocio avanti e indietro lungo il DNA cromosomico. Questo fenomeno può rapidamente far aumentare la lunghezza di DNA a singola elica che viene scambiato tra due molecole di DNA. Dopo che è avvenuta la migrazione di branca, la giunzione di Holliday viene tagliata e i filamenti di DNA interrotti sono riuniti assieme a formare due molecole separate di DNA. Ci sono due modi in cui può essere tagliata e riunita una giunzione di Holliday. Se viene tagliata in uno dei due piani, le due molecole di DNA prodotte esibiranno crossing over, cioè il DNA cromosomico al di là del punto dove è avvenuta la ricombinazione sarà stato completamente scambiato tra i due cromosomi. Mentre se la giunzione di Holliday viene tagliata nell'altro piano, il crossing over non avviene, ma le molecole di DNA mostrano una regione non complementare vicino al sito dove si era formata la giunzione di Holliday.

Messa a punto del metodo. Studio della dinamica e della flessibilità conformazionale di varie tipologie di giunzioni a 4 vie.

Sono stati ottimizzati (ottimizzazioni con solvente implicito – GB) e sottoposti a dinamica molecolare (MD) modelli di giunzioni immobili (gli undici modelli riportati nel lavoro pubblicato sul *Biophysical Journal*, sotto citato), generati dal programma sviluppato da Srinivasan ed Olson [Annankoil R. Srinivasan & Wilma K. Olson *Biochemistry* **1994**, 33, 9389-9404], concordanti con le osservazioni sperimentali [Mikhail A. Karymov, Mathivanan Chinnaraj, Aleksey Bogdanov, Annankoil R. Srinivasan, Guohui Zheng, Wilma K. Olson & Yuri L. Lyubchenko *Biophysical Journal* **2008**, 95, 4372-4383]. Le strutture sono state classificate in base all'arrangiamento delle due doppie eliche ed in base ai valori di energia relativa ottenuti dopo ottimizzazione. Sono stati valutati gli effetti dovuti alla variazione della concentrazione dei sali in soluzione (0.1 M, 1.0 M e 10 M) e l'effetto della presenza di ioni espliciti nei pressi della giunzione. Alcuni risultati sono mostrati nella presentazione allegata. La collaborazione è aperta ed il progetto è in corso.

Firma del Proponente
Caterina Ghio

Firma del Fruitore
Susanna Monti



***Theoretical Exploration of the
Structure and Dynamics of DNA
Holliday's Junctions***

Susanna Monti, David A. Case, Wilma K. Olson, Annankoil R. Srinivasan

Introduction and a Few Data

Computer Models of DNA Four-Way Junctions[†]

A. R. Srinivasan and Wilma K. Olson*

Department of Chemistry, Wright-Riesman Laboratories, Rutgers, the State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey 08903

*Received October 26, 1993; Revised Manuscript Received May 10, 1994**

ABSTRACT: A modeling scheme that combines a constrained backbone generating algorithm with simple hard-sphere packing calculations is offered to build the four-stranded structures of DNA found in Holliday junctions. Two standard B-DNA duplexes are oriented side by side with helix axes at different relative inclinations and then systematically rotated and translated to identify closely spaced contact-free states.

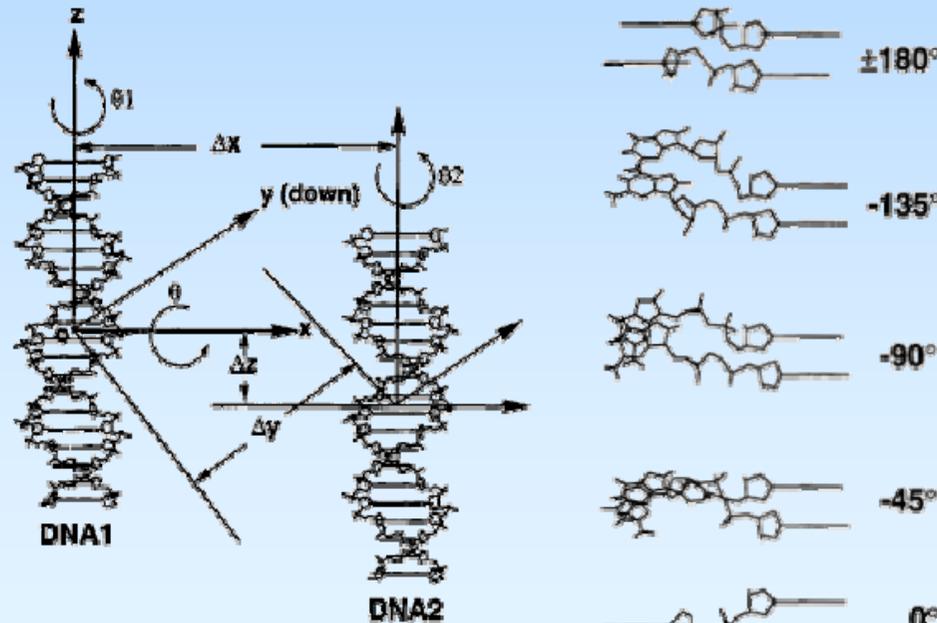


FIGURE 2: Translational (Δx , Δy , Δz) and rotational (θ , θ_1 , θ_2) parameters used to describe the relative displacement and orientation of closely associated DNA duplexes (DNA1 and DNA2).

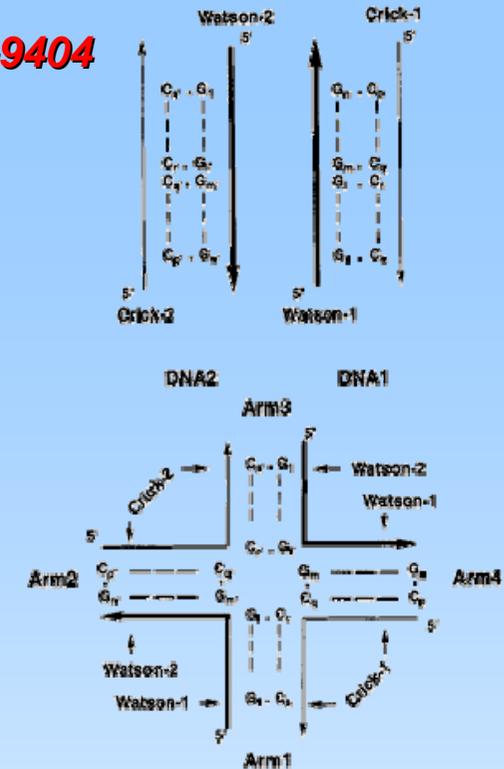
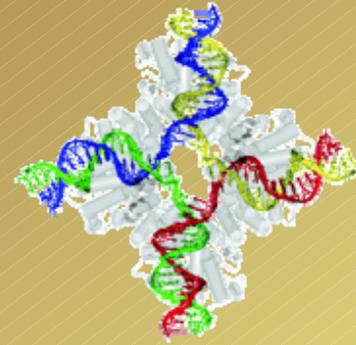
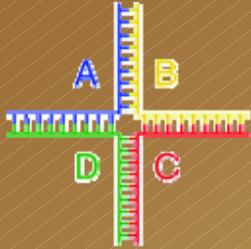


FIGURE 1: Schematic representation of homologous DNA duplexes (a, top) prior to formation of the four-way Holliday junction and (b, bottom) following exchange of strands between G₁ on DNA1 and G₂ on DNA2 and between G₂ on DNA2 and G₁ on DNA1.

A Holliday Junction is a mobile junction between 4 strands of DNA. The 4-stranded DNA complex is an important intermediate structure involved in many cellular processes. The geometry of Holliday Junctions is highly variable.

A Holliday Junction arises when two homologous DNA duplexes become nicked and exchange single strands upon rejoining.

The four-way DNA junction is generally accepted to be the central intermediate in homologous genetic recombination (important in the repair of double-strand breaks in DNA and in providing genetic diversity)



approximate square planar geometry

Every base is paired with its Watson-Crick complement

Basepaired

Open-X

low-salt conditions or when bound to certain proteins

Junctions

Significant effects on the folding of the structures

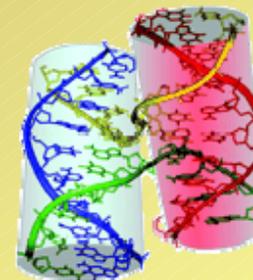
Unpaired bases (or mismatches)

stacked-X

physiological concentrations of mono- and multivalent cations



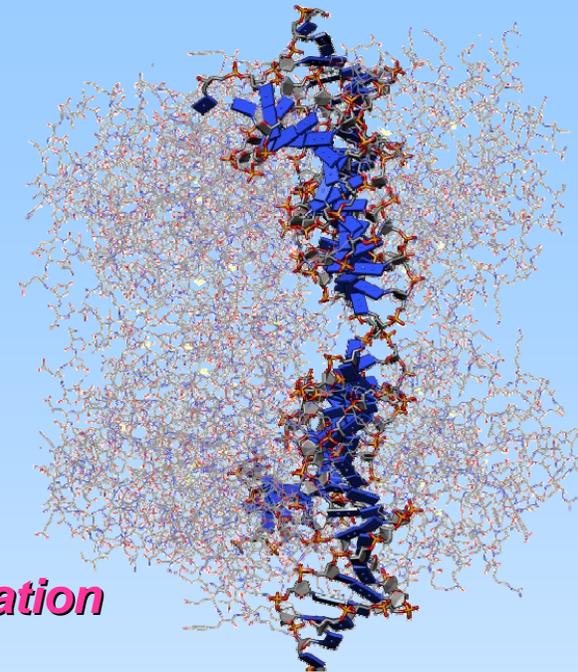
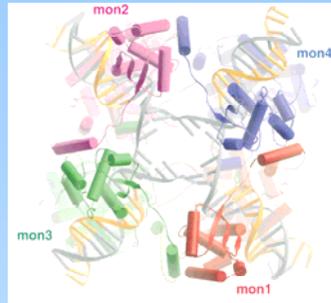
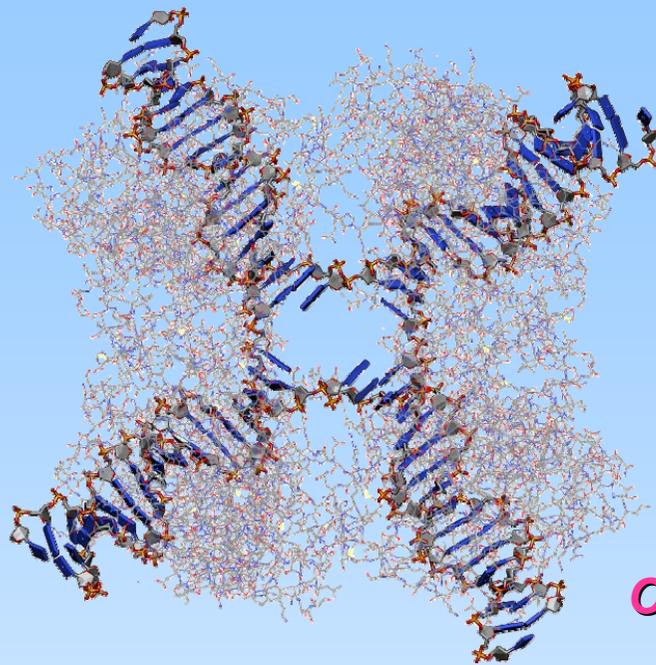
three base bulge



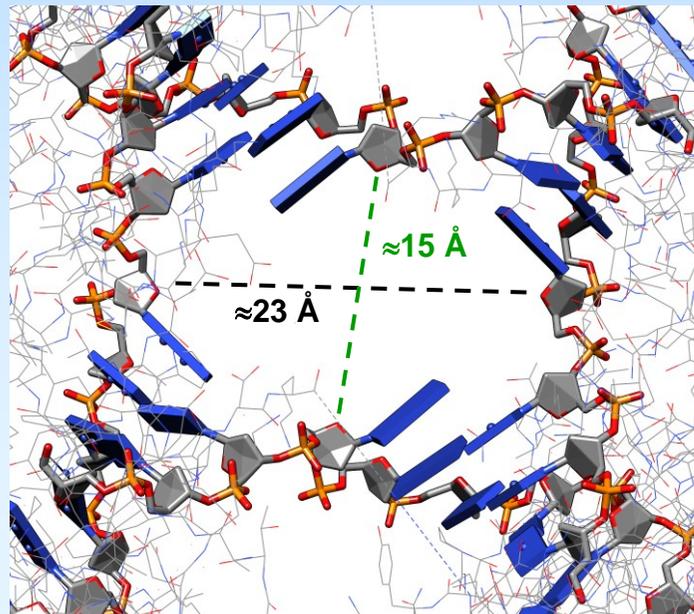
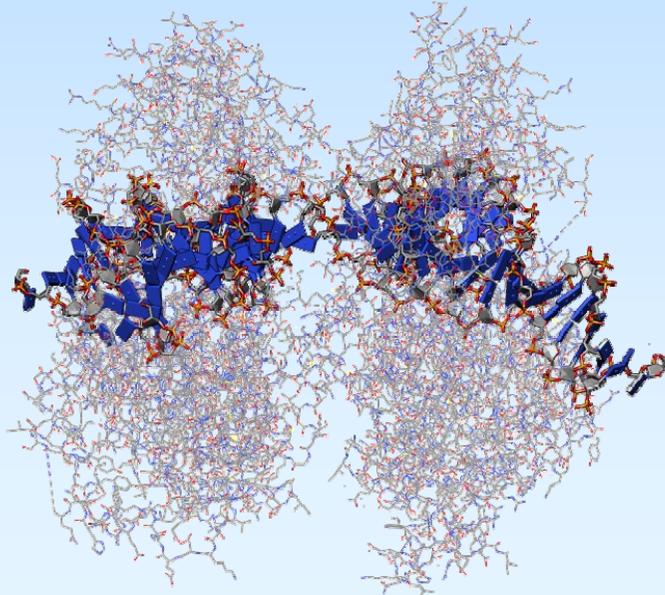
Helical junctions may be defined as branchpoints where double-helical segments intersect with axial discontinuities, such that strands are exchanged between the different helical sections. The integrity of junctions is maintained by the covalent continuity of the component strands.

The arms form stacked pairs - nearly continuous B-DNA duplexes, interrupted only at the junction crossovers

Flp Recombinase Tetramer Bound to a Holliday Junction



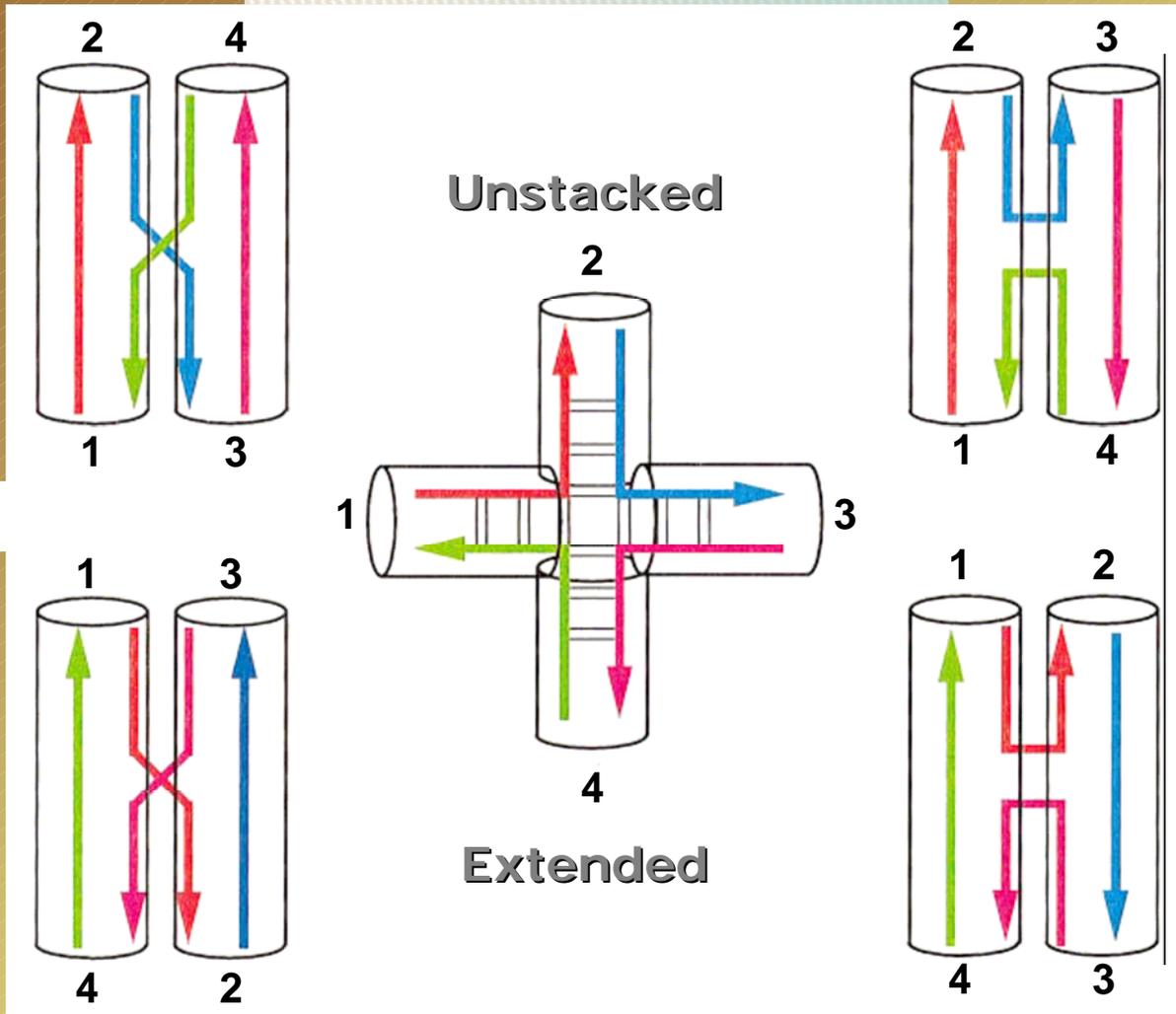
Open-X conformation



The DNA Holliday Junction is held in a roughly square planar conformation by a tetramer of Flp protein

Stacked Forms

2 on 1 and 3 on 4 stacking



parallel

antiparallel

1 on 4 and 2 on 3 stacking

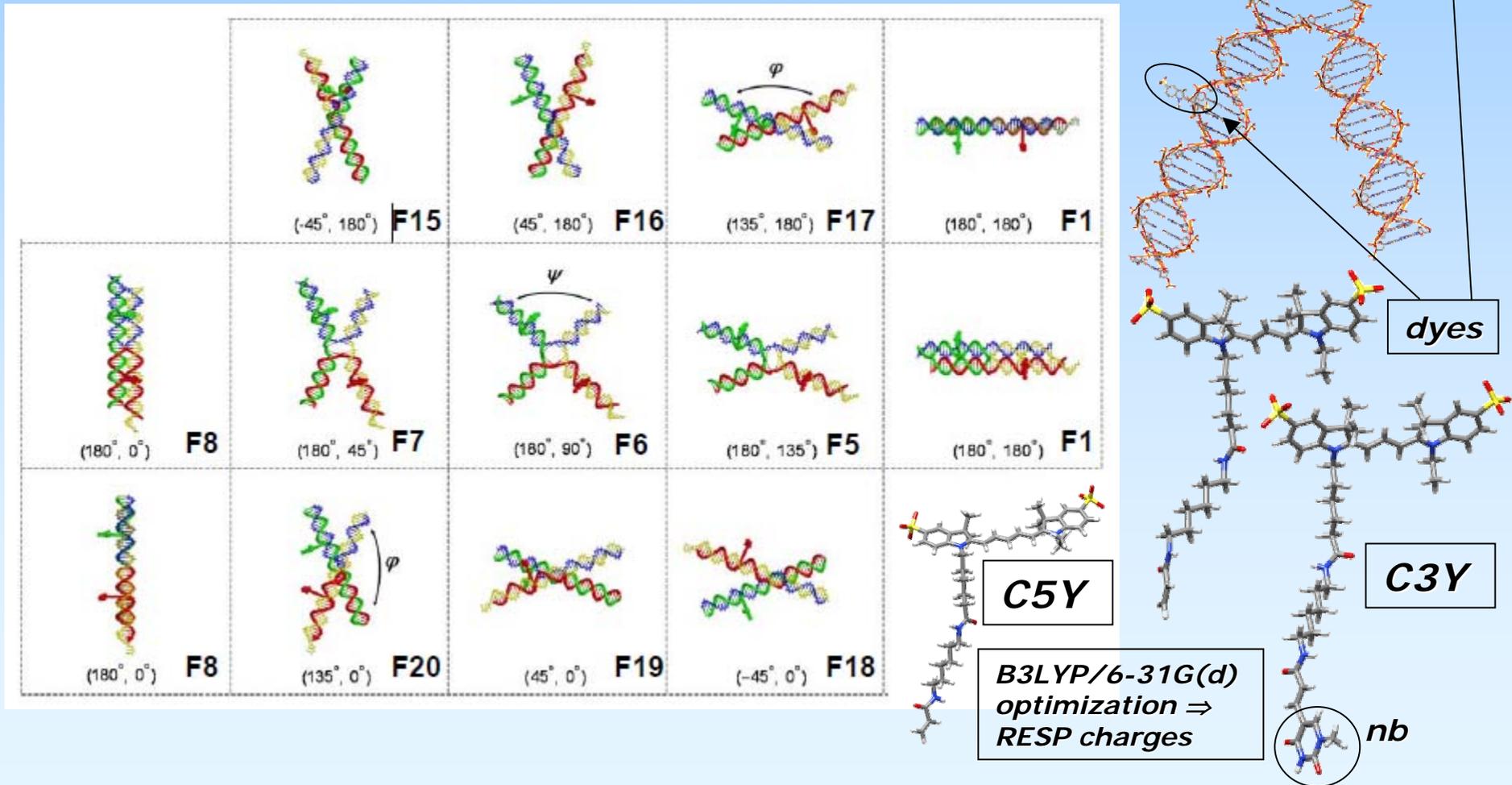
Intermediate rotation can generate either right- or left-handed structures

Biophysical Journal 2008, 95, 4372-4383

Structure, Dynamics, and Branch Migration of a DNA Holliday Junction: A Single-Molecule Fluorescence and Modeling Study

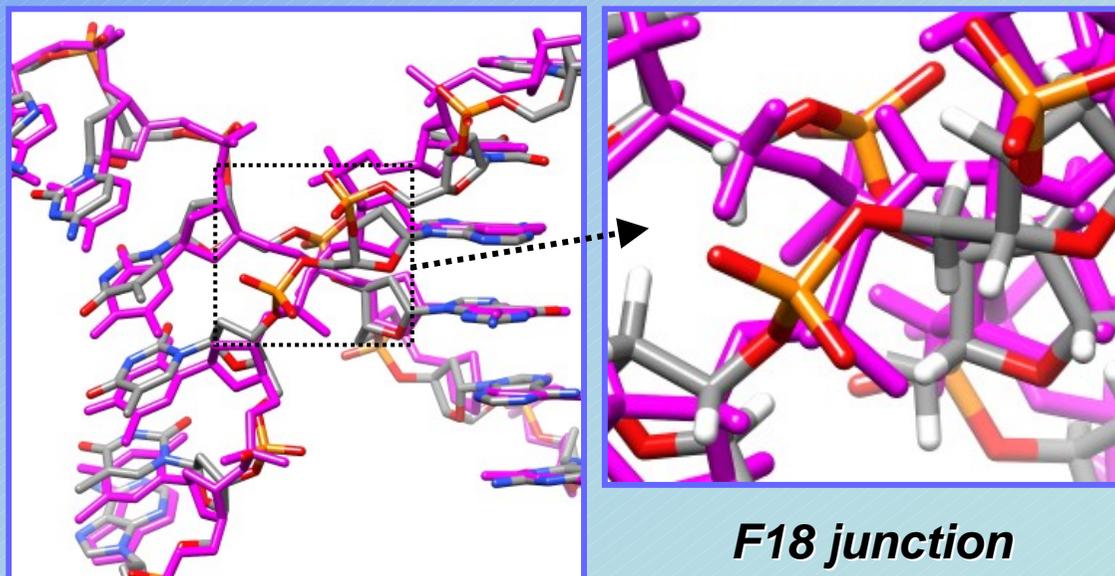
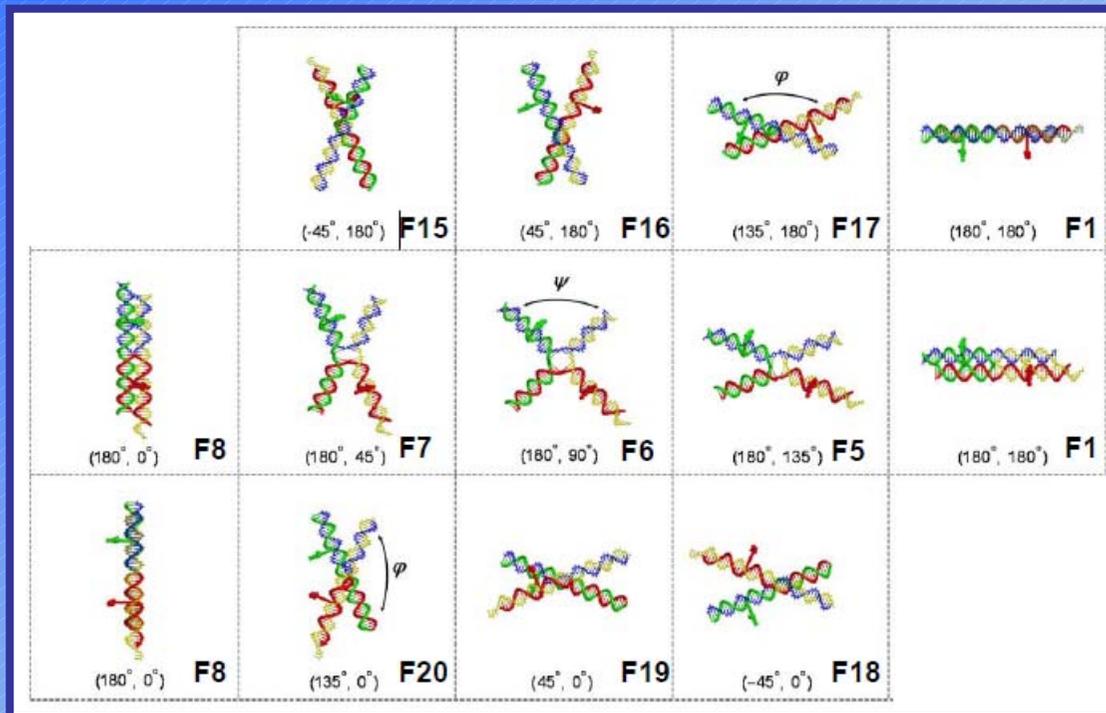
Mikhail A. Karymov,* Mathivanan Chinnaraj,[†] Aleksey Bogdanov,*[‡] Annankoil R. Srinivasan,[§] Guohui Zheng,[§] Wilma K. Olson,[§] and Yuri L. Lyubchenko*

*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Nebraska Medical Center, 986025 Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska; [†]Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama; [‡]Department of Molecular Biophysics, Research Institute of Physics, St. Petersburg State University, 198504, Petrodvorets, St. Petersburg, Russia; and [§]Department of Chemistry and Chemical Biology, BioMaPS Institute for Quantitative Biology, Rutgers, The State University of New Jersey, Wright-Rieman Laboratories, Piscataway, New Jersey



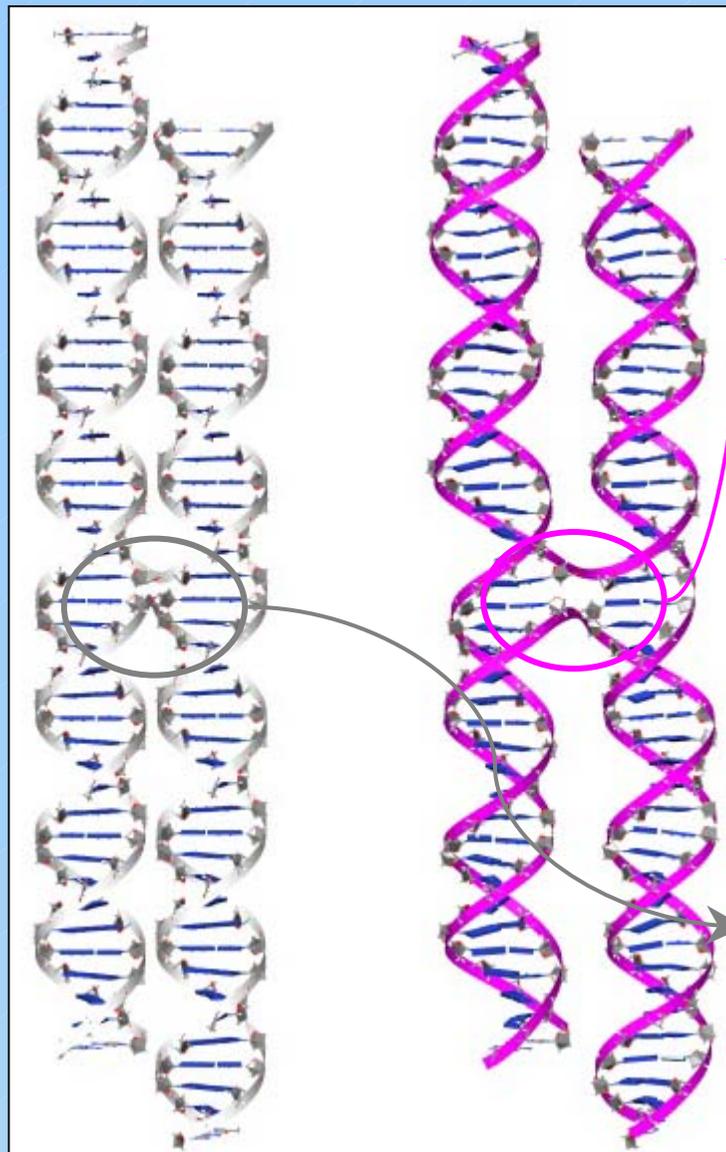
Optimization of all structures using an implicit solvent model (GB approximation)

Structure	DE (kcal/mol) <i>igb=1,</i> <i>s.c.=0.1</i> <i>M</i>	DE (kcal/mol) <i>igb=1,</i> <i>s.c.=1</i> <i>M</i>
F18	2	0
F15	9	7
F20	0	9
F6	12	15
F17	0	5
F7	14	42
F8	14	21
F1	48	37
F5	23	33
F16	220	220
F19	210	223



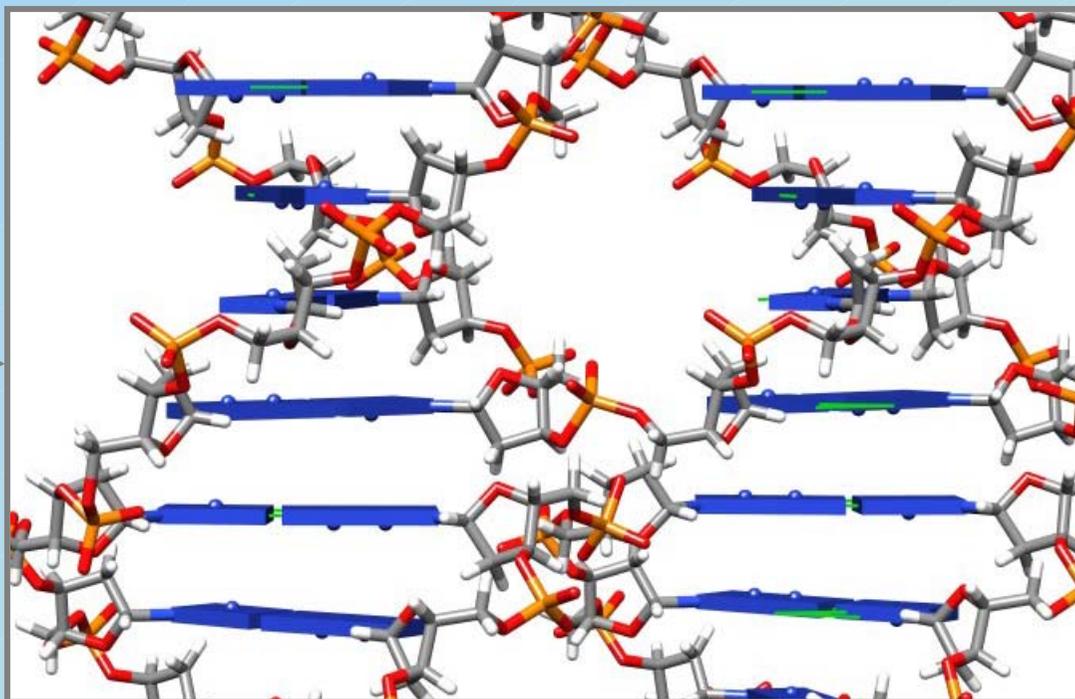
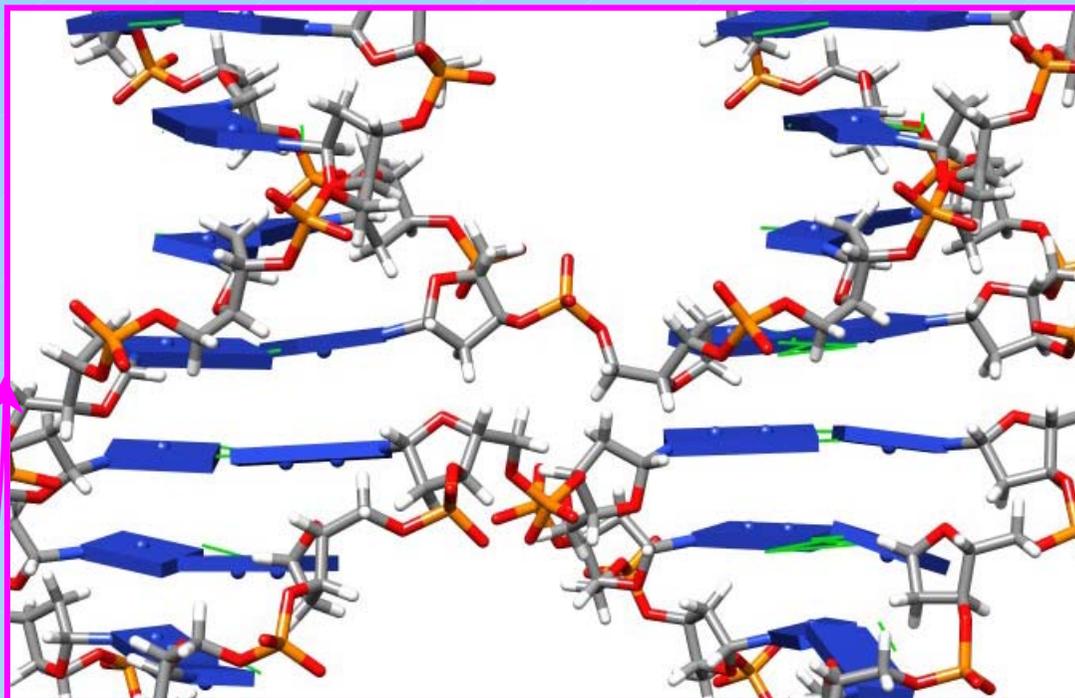
F1

Optimization: implicit solvent, saltcon= 0.1 M



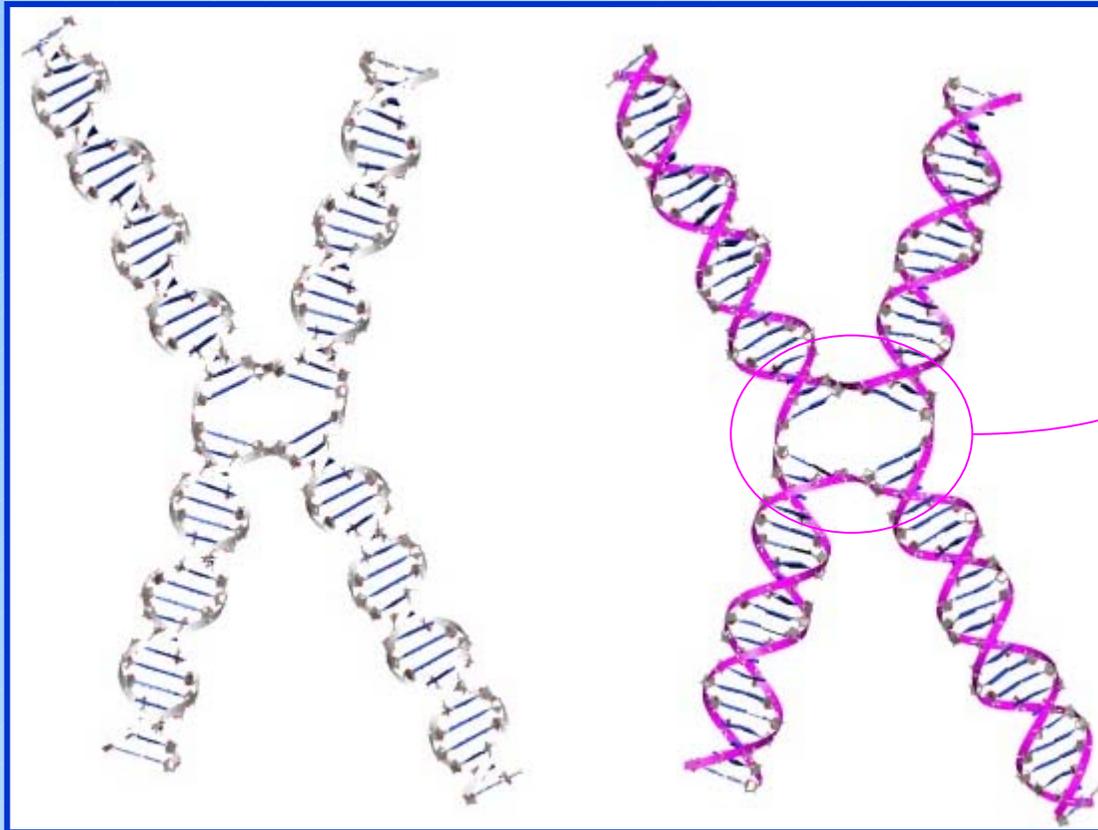
Starting

Optimized



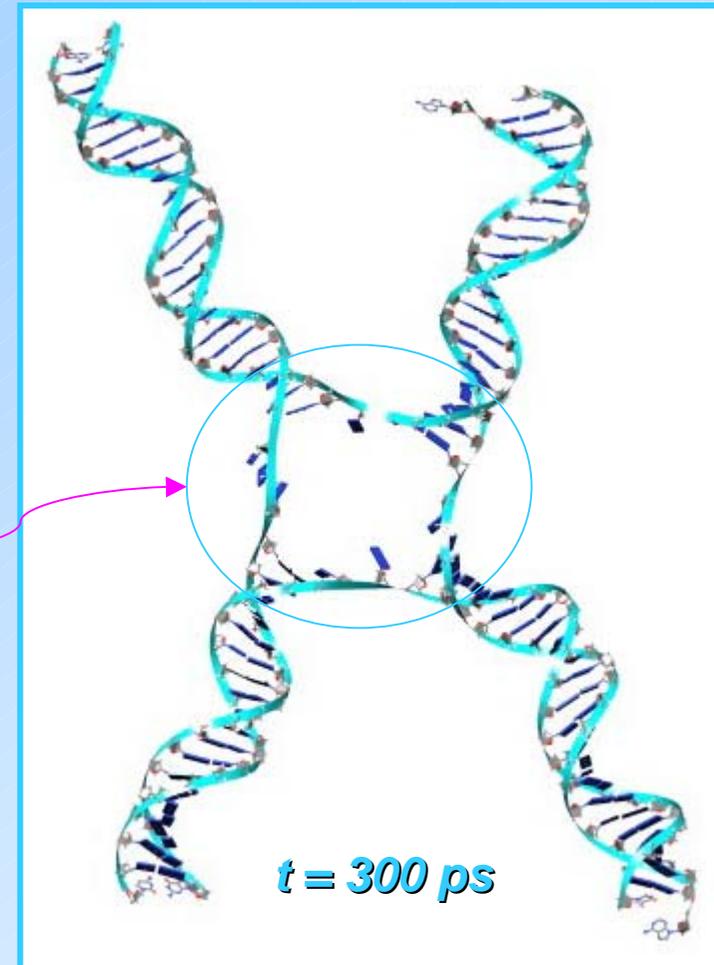
F5

**Optimization: implicit solvent,
saltcon= 0.1 M**



Starting

Optimized



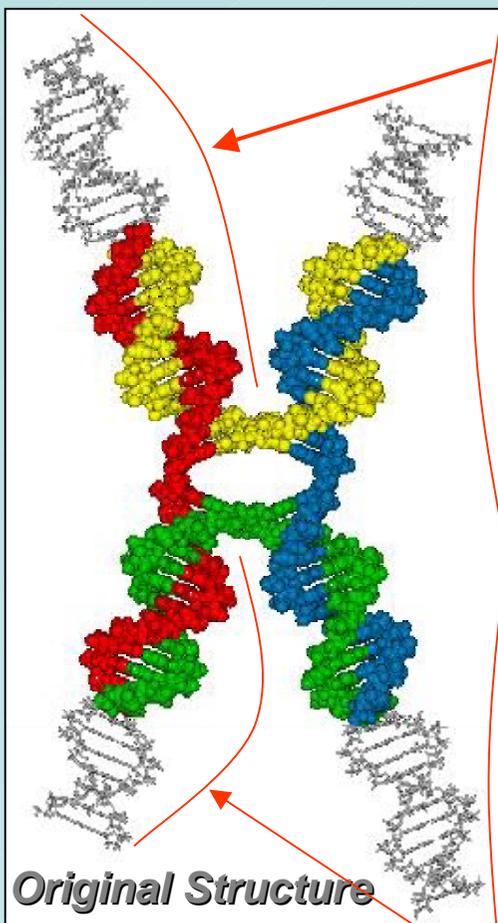
DEFINITION of a REDUCED MODEL

- **To extend the simulation time**
- **To reduce cpu time**
- **To define a reliable protocol to investigate junction behavior**

Molecular Dynamics Simulations
NVE, T=300 K, saltcon = 0 M
Total simulation time = 300 ps

F5 Reduced Model

Original Sequence: 176 bases
44 bp for each chain



24 nb

A176
C175
T174
A173
T172
T171
C170
G169
A168
A167
C166
G165
T164
T163
C162
G161
T160
A159
T158
C157
T156
C155
T154
A153
||
T152
T151
A150
T149
G148
C147
A146
C145
T144
C143
G142
G141
G140
A139
T138
C137
C136
T135
A134
G133

24 nb

G104
T103
T102
C101
G100
T99
A98
T97
C96
T95
C94
T93
A92

20 nb

T91
T90
A89
T88
G87
C86
A85
C84
T83
C82
C81
G80
G79

T1
G2
A3
T4
A5
A6
G7
C8
T9

13 nb

C1
A2
A3
G4
C5
A6
T7
A8
G9
A10
G11
A12
T13

T14
G15
G16
A17
T18
C19
G20

A66
A67
T68
A69
C70
T72
G73
A74
G75
G76
C77
C78

T21
G22
G23
A24
T25
C26
G27

A112
G111
T110
T109
G108
C107
T106
A105
C104
G103
T102
A101
G100

T28
G29
G30
A31
T32
C33
G34

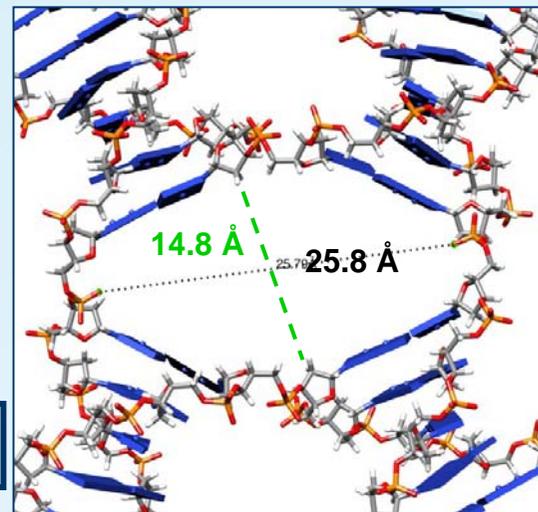
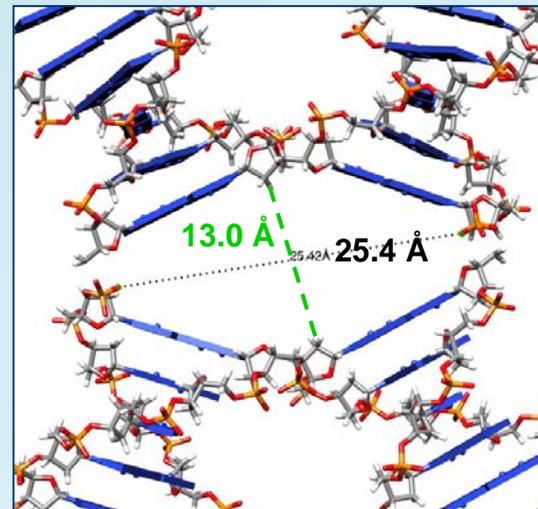
A65
G64
T63
T62
G61
C60
T59
A58
C57
G56
T55
A54
C53

A45
C46
C47
T48
A49
A50
C51
C52

T65
C66
A67
A68
C69
G70
A71
T72
G73
C74
A75
T76
G77
C78

T40
C41
A42
A43
C44
G45
A46
T47
G48
C49
A50
T51
G52

Reduced Model: 104 bases
26 bp for each chain



Reduced Model

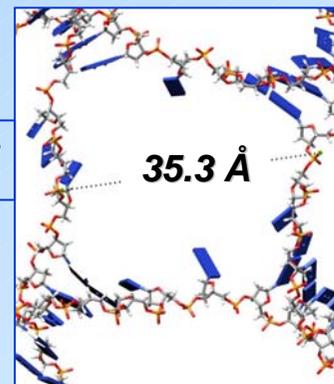
Optimization: implicit solvent, igb=1, saltcon= 0.1 M

F5 Reduced Model

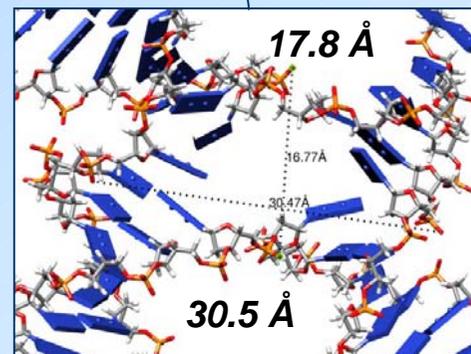
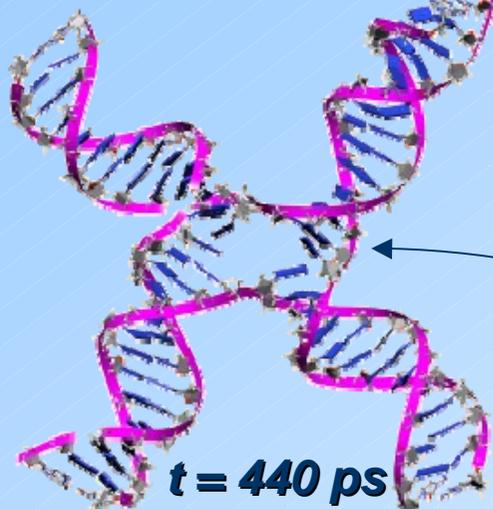
Molecular Dynamics Simulations

NVE, $T=300\text{ K}$, cut = 99., igb=1,
dt=0.001 ps

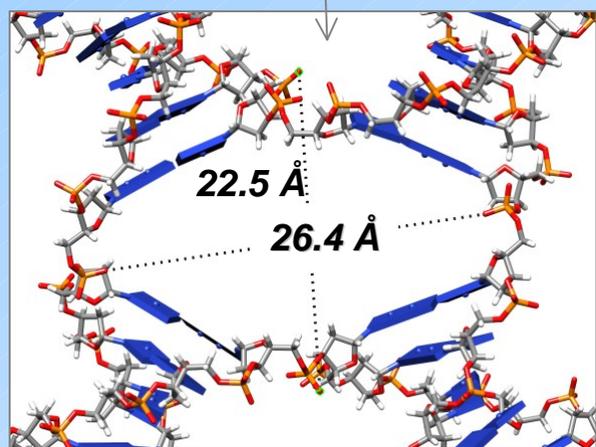
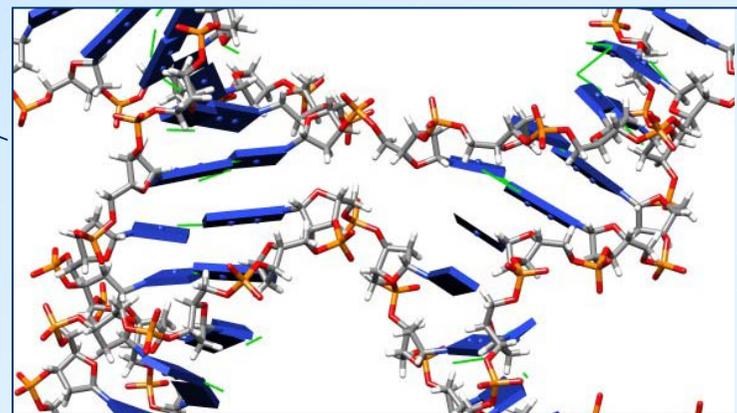
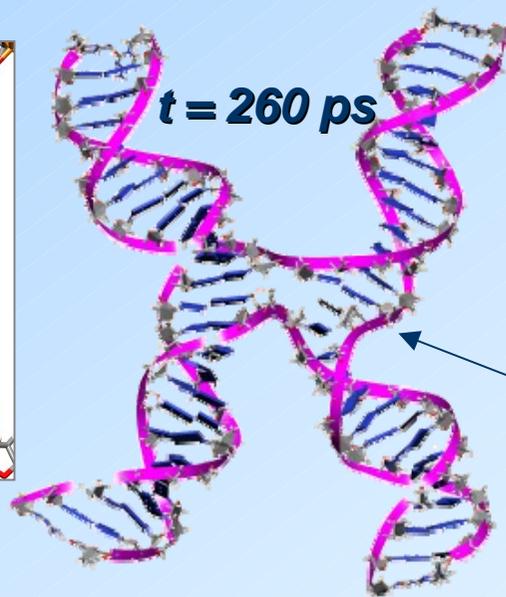
saltcon = 0 M



saltcon = 1.0 M

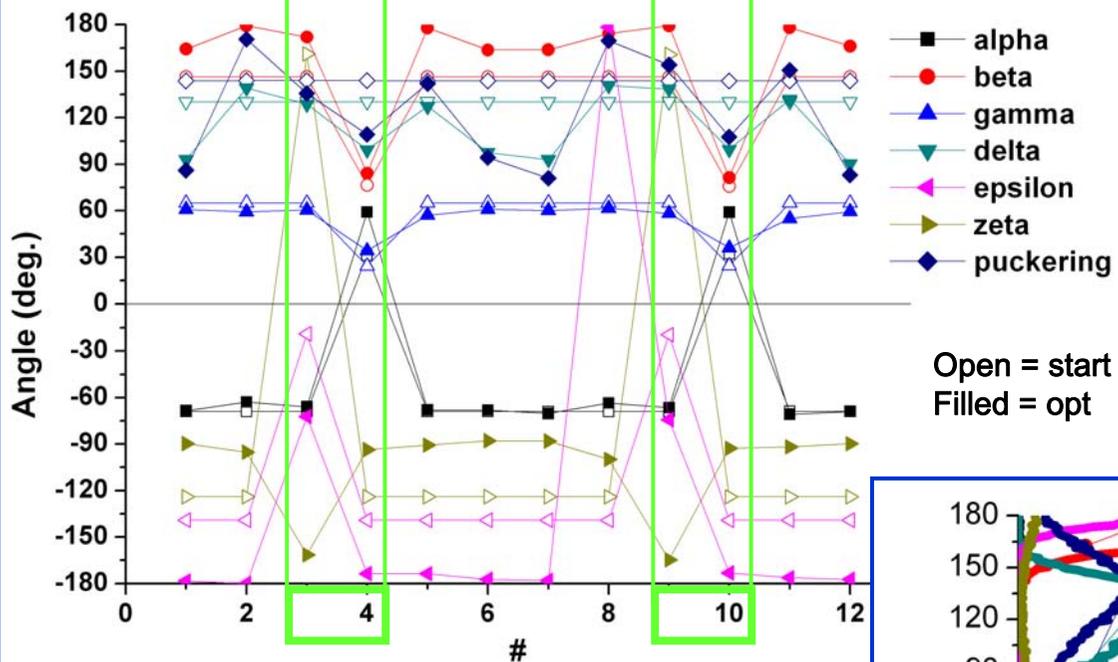


t = 260 ps

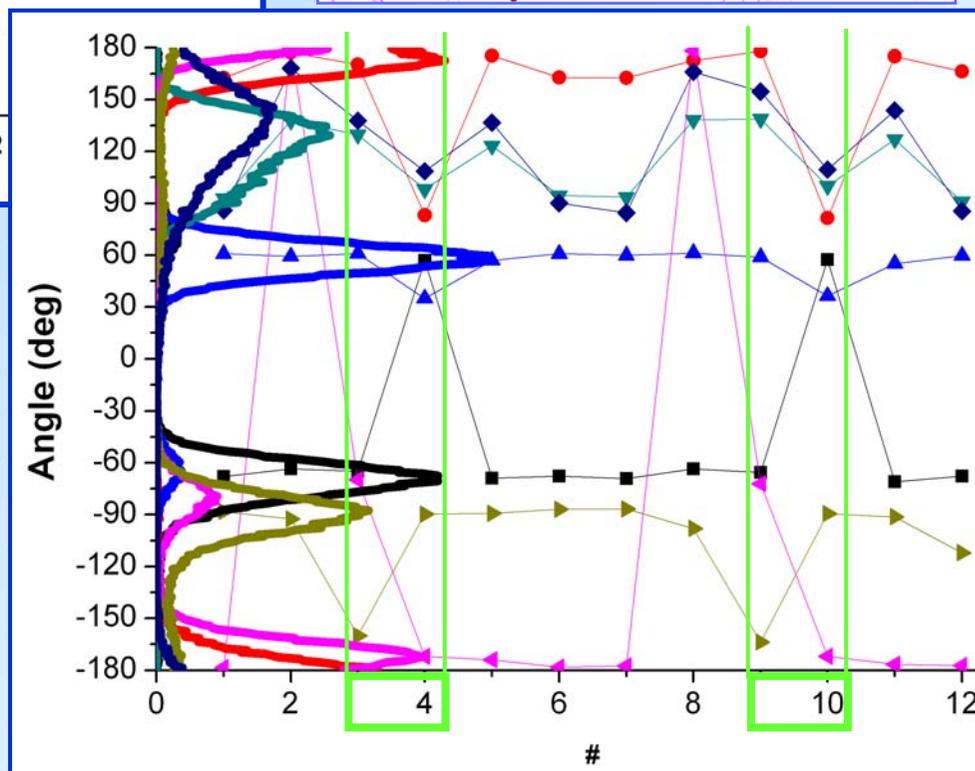
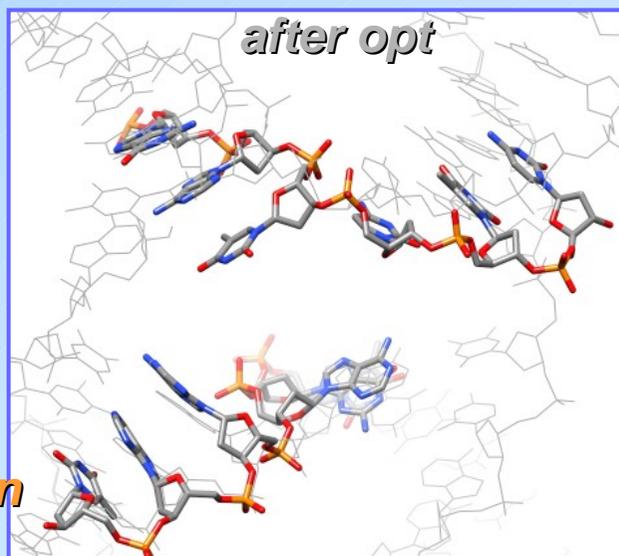
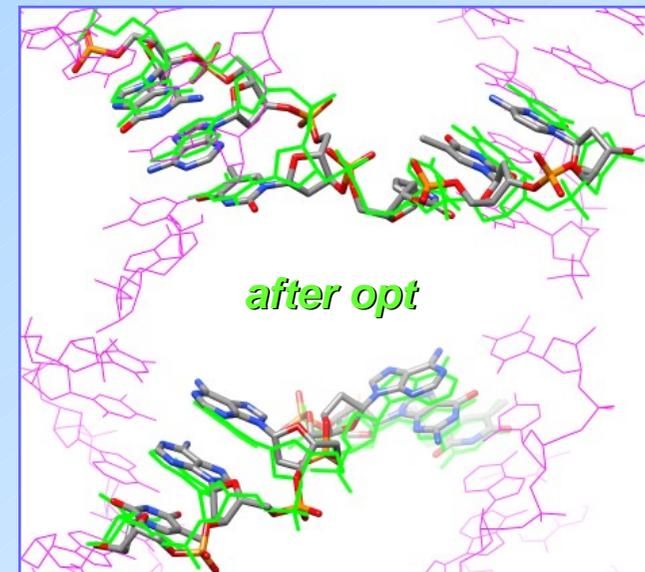


t = 0 ps

F5 HJ torsion angles



HJ: bases 3-4 and 9-10



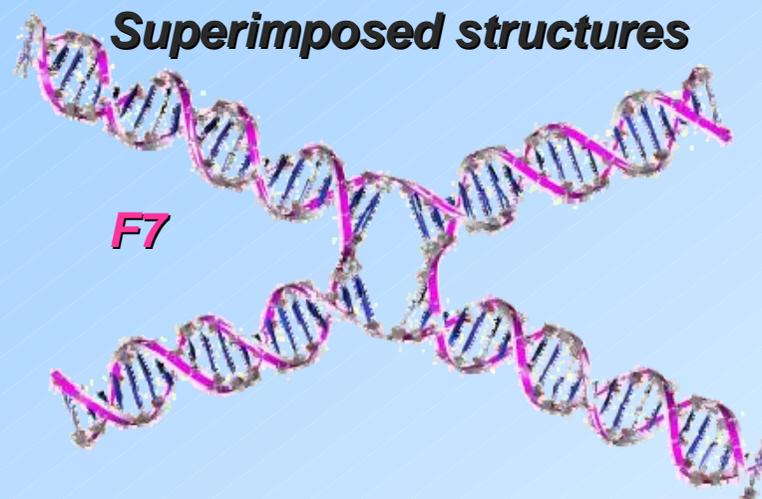
F6, F7, F8



F6

Superimposed structures

**Optimization: implicit solvent,
igb=1, saltcon= 0.1 M**



F7

Superimposed structures



Starting



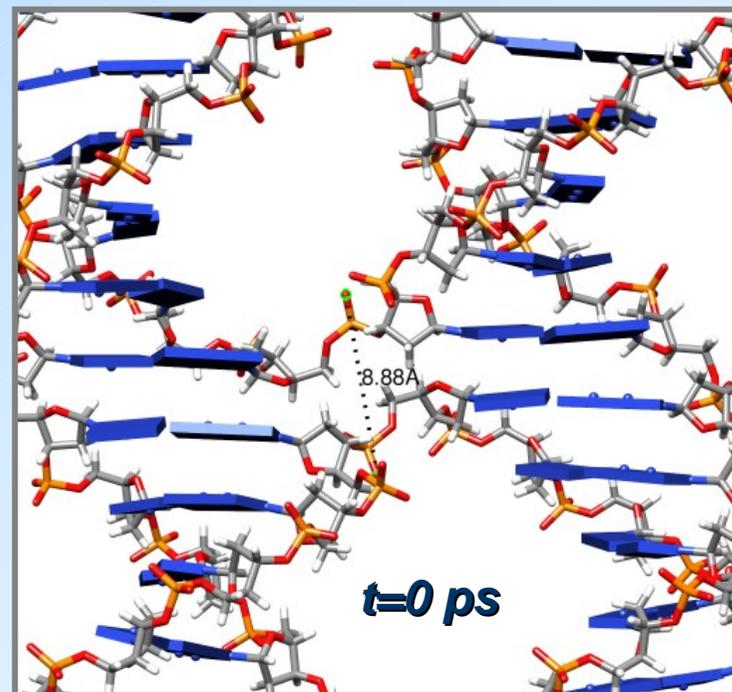
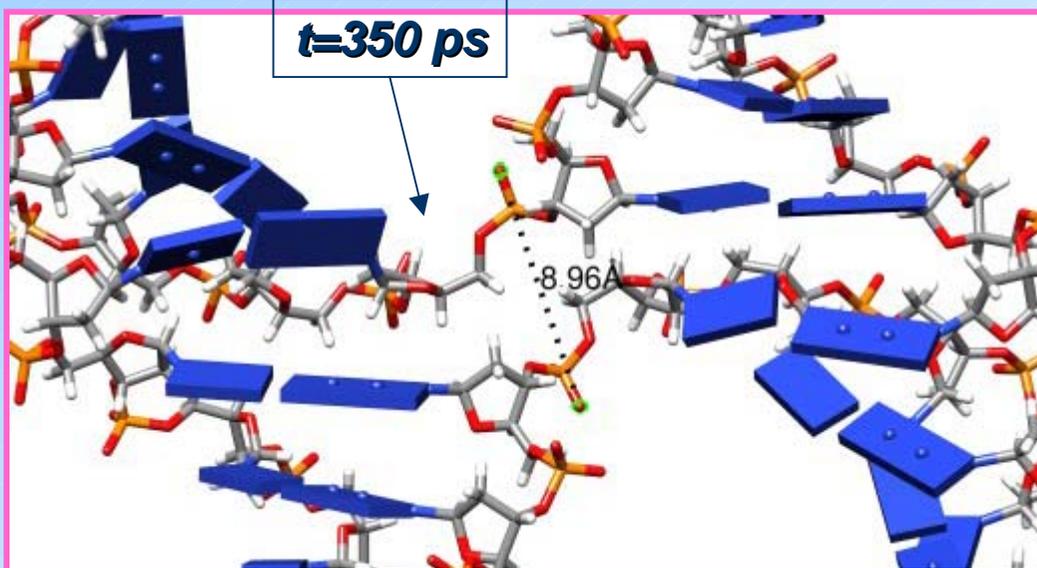
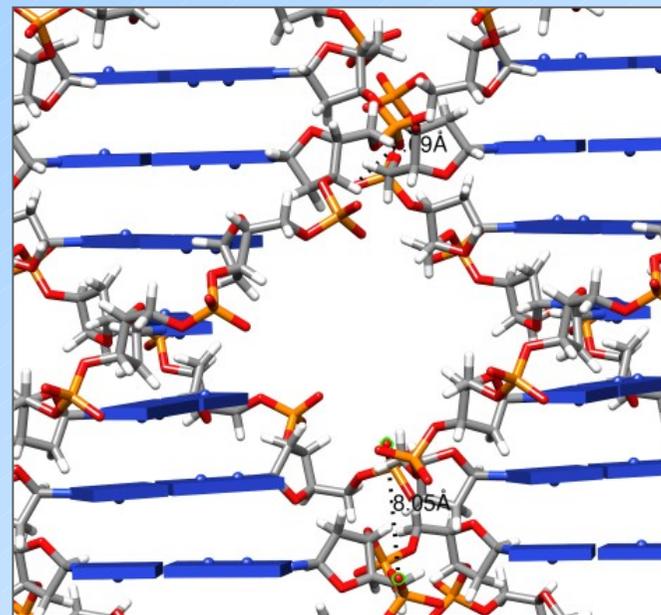
Optimized

F8

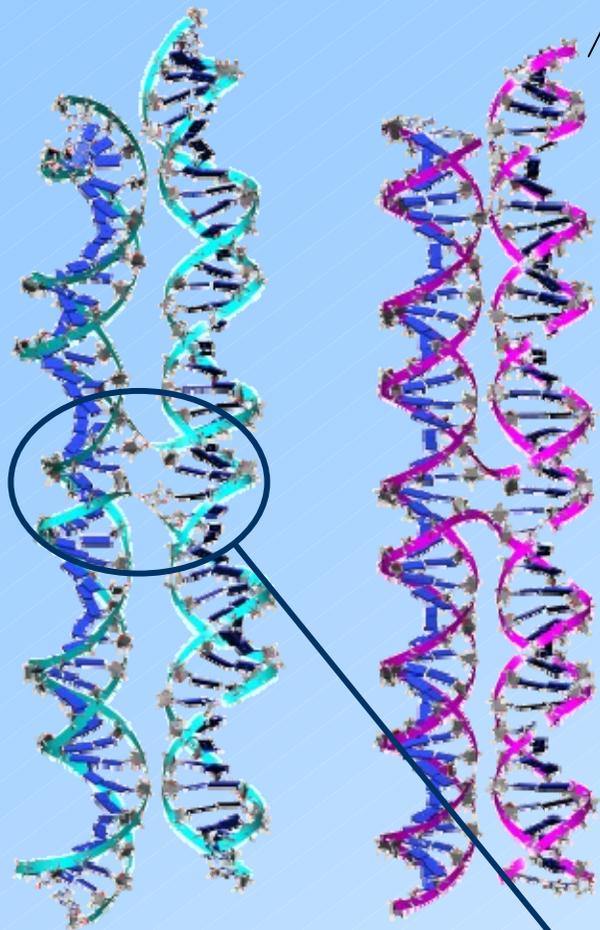
F8: Molecular Dynamics

**NVE, $T=300$ K,
cut = 99.,
igb=1,
dt=0.001 ps,
saltcon= 1.0 M**

Starting Model



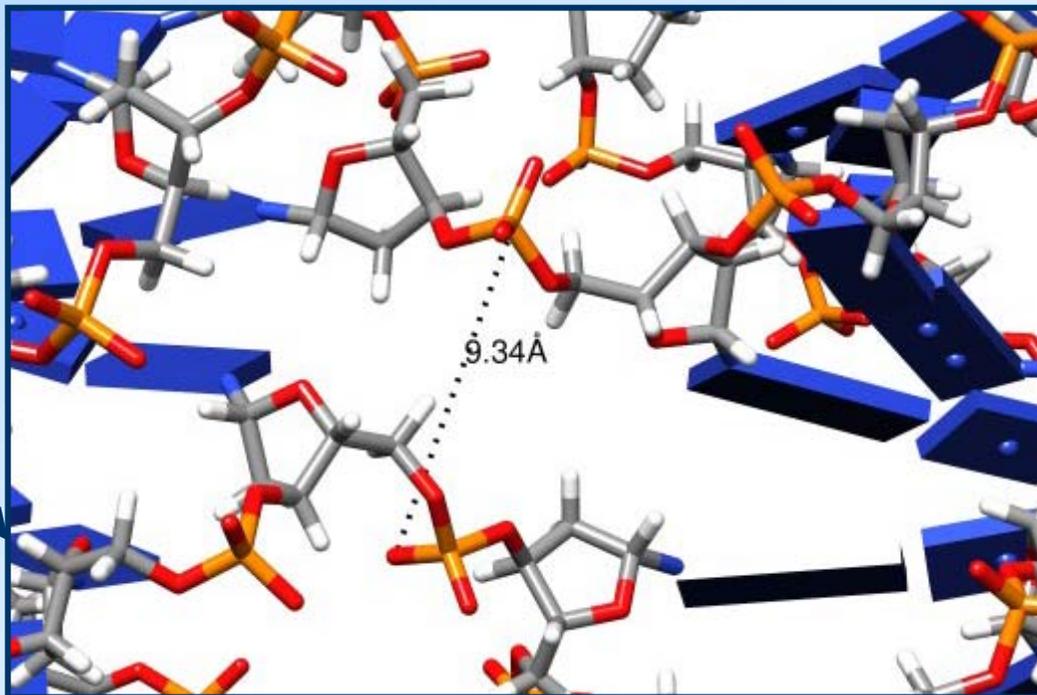
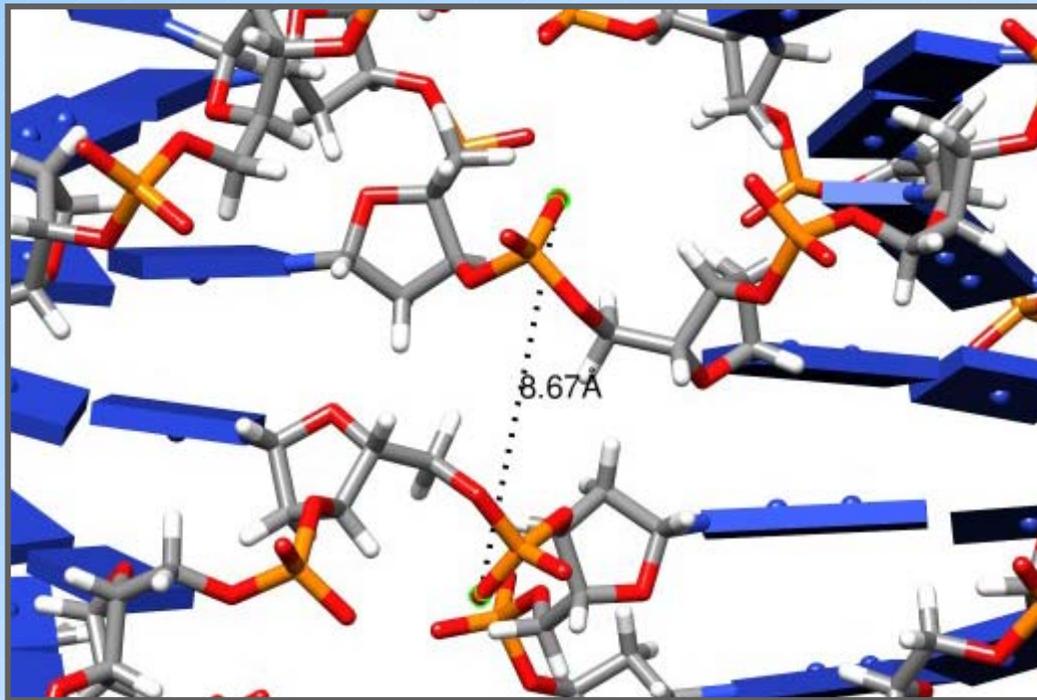
F20: MD



$t=0$ ps

$t=110$ ps

**NVE, $T=300$ K, cut = 99.,
igb=1, dt=0.001 ps,
saltcon= 1.0 M**



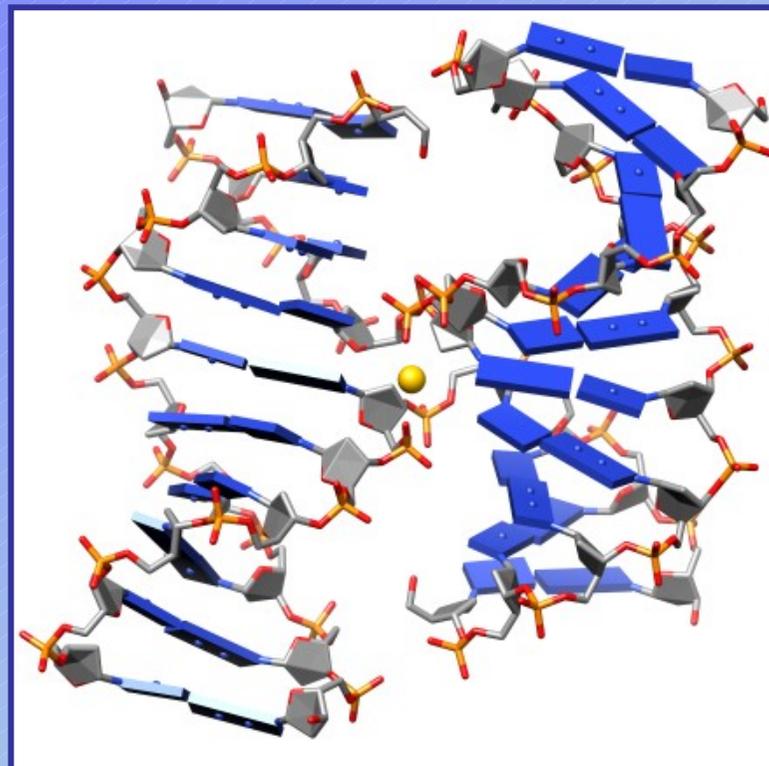
Optimization and Molecular Dynamics using the GB approximation

1dcw  

DOI 10.2210/pdb1dcw/pdb

Red - Derived Information

Title	STRUCTURE OF A FOUR-WAY JUNCTION IN AN INVERTED REPEAT SEQUENCE.						
Authors	Eichman, B.F., Vargason, J.M., Mooers, B.H.M., Ho, P.S.						
Primary Citation	Eichman, B.F., Vargason, J.M., Mooers, B.H., Ho, P.S. (2000) The Holliday junction in an inverted repeat DNA sequence: sequence effects on the structure of four-way junctions. <i>Proc.Nat.Acad.Sci.USA</i> 97 : 3971-3976 [Abstract] PubMed						
History	Deposition 1999-11-05 Release 2000-04-17 Last Modified (REVDAT) 2009-02-24						
Experimental Method	Type X-RAY DIFFRACTION Data 						
Parameters	Resolution[Å] 	R-Value	R-Free	Space Group			
	2.10	0.230 (obs.)	0.317	C 2 (C 1 2 1)			
Unit Cell	Length [Å]	a	66.50	b	23.50	c	76.90
	Angles [°]	alpha	90.00	beta	114.80	gamma	90.00
Molecular Description	Polymer: 1						
Asymmetric Unit	Molecule: DNA Chains: A, type: polydeoxyribonucleotide length: 40 (5'-D>(*CP*CP*GP*GP*TP*AP*CP*CP*GP*G)-3') B, C, D						



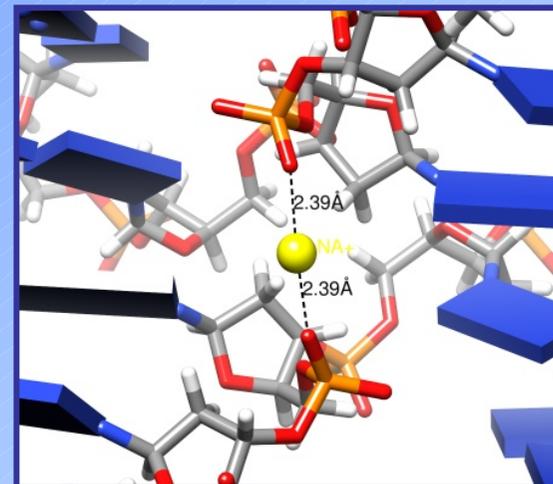
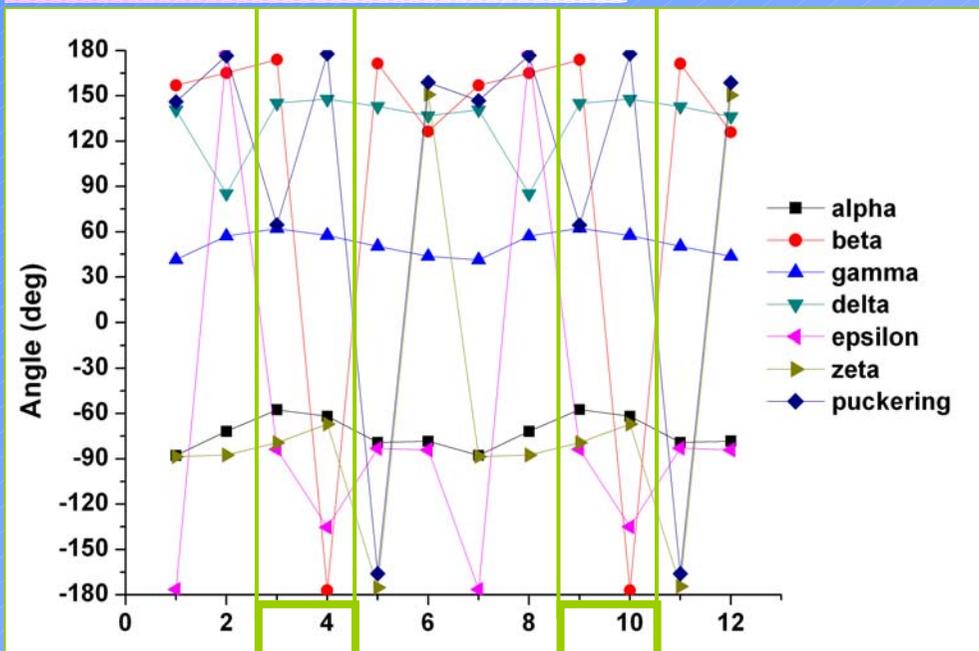
MD Simulations

- salt conc. = 0.1 M + Na⁺ restr.
- salt conc. = 1.0 M + Na⁺ restr.
- salt conc. = 10.0 M + Na⁺ restr.
- salt conc. = 1.0 M no restraints

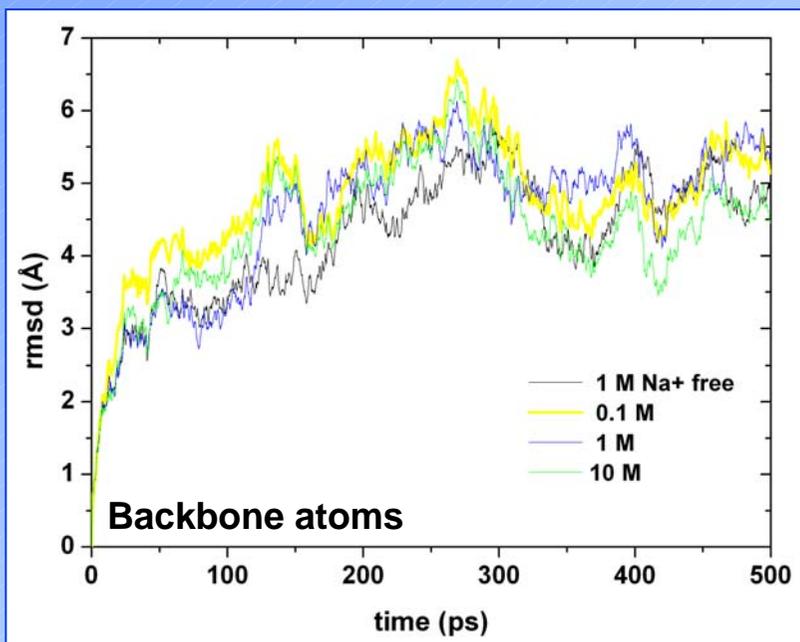
Total Simulation Time = 500 ps

Classification	DNA					
Source	Polymer: 1 Scientific Name: Synthetic construct 					
Ligand Chemical Component	Identifier	Name	Formula	Ligand Expo	Drug Simil	
	NA	SODIUM ION	Na			
GO Terms	Polymer		Molecular Function		Biological Process	
	DNA (5'-D>(*CP*CP*GP*GP*TP*AP*CP*CP*GP*G)-3') (1DCW:A,B,C,D)		• none		• none	

1DCW: Salt conc. = 1.0 M



Dihedral Angle Distributions are almost equal



Na⁺ ion does not influence the dynamics of the junction (?)



Salt conc.

