

## СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗ 1А-ТИПА

©2009 г. Д. В. БУГРЕЕВ<sup>1</sup>, Г. А. НЕВИНСКИЙ<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
СО РАН, Новосибирск,*

<sup>2</sup> *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

I. Введение. II. Классификация и некоторые свойства топоизомераз. III. Некоторые аспекты механизма действия топоизомераз. IV. ДНК-топоизомеразы подкласса 1А. V. Структурный анализ ферментов. VI. Взаимодействие топоизомеразы I из *E. coli* с ДНК. VII. ДНК-топоизомераза III *E. coli*. VIII. Обратная гириза. IX. ДНК-топоизомераза III из термофильных археобактерий. X. Эукариотическая ДНК-топоизомераза III. XI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Топологические перестройки ДНК играют важную роль в проявлении ее функциональных активностей (репликации, транскрипции, рекомбинации и т.д.), а также в организации структур более высокого порядка. Некоторые из этих вопросов проанализированы ранее в ряде монографий и обзоров [1–9]. Основную роль в изменении топологического состояния ДНК играют ферменты – топоизомеразы. Причины множественности топоизомераз в клетках про- и эукариот рассмотрены в обзорах [1, 8–12], включая анализ некоторых вопросов о механизмах функционирования топоизомераз [13–16]. В данном обзоре сделана попытка обобщения данных в основном о топоизомеразах 1А-типа высших и низших организмов и механизмах их функционирования с учетом новой информации, полученной в последнее время.

---

*Принятые сокращения:* а. о. – аминокислотный остаток; топо I – ДНК-топоизомераза I, сс ДНК – сверхскрученная ДНК, РСА – рентгеноструктурный анализ, оц и дц – одно- и двухцепочечная, соответственно.

\* *Адресат для корреспонденции:* 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8; электронная почта: nevinsky@niboch.nsc.ru

Работа поддержана грантом программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 10.5) и Интеграционным грантом Президиума СО РАН.

Современные представления о строении геномной ДНК позволяют заключить, что отдельные транскрипционно-активные единицы ведут себя как замкнутые структуры, утратившие свободные концы, и любые клеточные процессы, связанные с разделением комплементарных цепей ДНК, такие как репликация, транскрипция, рекомбинация и репарация, как известно, вызывают в молекулах ДНК ее различного рода структурные изменения, включая сверхспирализацию. В живой клетке некоторые молекулы ДНК, в том числе бактериальная хромосома, находятся в сверхспирализованной форме. На рис. 1 схематически показаны примеры различного топологического состояния ДНК. Принято считать, что отрицательная спирализация, условно обозначенная как «-», соответствуют закрученности двухцепочечной ДНК против часовой стрелки, а положительная «+» – по часовой стрелке. Возникающее при спирализации топологическое напряжение в ДНК генома клетки часто является препятствием для протекания многих реакций, катализируемых различными ферментами. В то же время, определенный уровень сверхспирализации необходим для проявления специфической функции некоторых клеточных белков.

Сверхспирализация стимулирует начальную стадию генетической рекомбинации, поскольку при этом облегчается встраивание однонитевых фрагментов в ДНК-дуплекс [9]. Таким образом, топологическое состояние клеточной ДНК может использоваться живыми клетками как механизм регуляции общей и локальной рекомбинации. Сверхспирализация ДНК необходима не только для протекания генетической рекомбинации, но также для процессов нормального деления клеток, репликации хромосомной и плазмидной ДНК, конъюгативного переноса плазмид между бактериями и нормальной транскрипции генов [9]. Сверхспирализация ДНК влияет также на индуцированный мутагенез. Особенно чувствительны к степени сверхспирализации процессы инициации репликации и транскрипции, а также дифференциальная регуляция транскрипции различных генов, поскольку сверхспирализация ДНК приводит к тому, что некоторые участки становятся доступными для связывания определенных белков. Фрагменты в ДНК (dC-dG) и (dT-dG) при ее сверхспирализации могут переходить из правоспиральных участков в левоспиральную Z-ДНК, которая может возникать в геномах различных организмов и иметь определенное значение на некоторых этапах функционирования ДНК.

Ферменты, которые изменяют и регулируют топологическое состояние клеточной ДНК, получили название ДНК-топоизомераз. Эти

ферменты принимают участие практически во всех жизненно важных процессах клетки и обнаружены у всех про- и эукариот, а также некоторых вирусов [1, 8]. Топоизомеразы катализируют реакцию релаксации ДНК, введение в ДНК отрицательных и положительных супервитков, а также могут осуществлять реакции сшивания, расщепления молекул ДНК и способствовать ренатурации комплементарных колец молекул ДНК.

Все топоизомеразы относят к ферментам класса изомераз (подкласс 99; подподкласс 1) и подразделяют на два основных типа (первого и второго типа) в соответствии с механизмом их действия. Ферменты типа I (КФ 5.99.1.2) временно расщепляют только одну цепь ДНК и «протягивают» одну цепь через разрыв во второй цепи ДНК: они не требуют присутствия энергетических кофакторов, а ферменты второго типа (КФ 5.99.1.3) являются АТР-зависимыми [17]. Ферменты первого типа подразделяются на ДНК-топоизомеразы IA-типа, которые в процессе гидролиза ДНК оказываются ковалентносвязанными с 5'-фосфатом и топоизомеразы IB-типа, образующие связь 3'-фосфатом гидролизуемой цепи ДНК [17]. После того, как ДНК расщепляется ферментом типа IB, перенос цепи осуществляется за счет вращения вокруг связей, удаленных от места разрыва. Напротив, ферменты типа IA расщепляют одну цепь ДНК и фиксируют два конца разрыва на некотором расстоянии друг от друга, в то время как другая цепь ДНК (или в некоторых случаях дц ДНК) проводится через эту брешь.

Следует подчеркнуть, что в отличие от топоизомераз первого типа, ферменты типа II производят временный двухцепочечный разрыв, гидролизуя АТР; они протягивают один участок двухцепочечной ДНК через другой. Данные ферменты также можно разделить на

#### Топологические переходы в ДНК

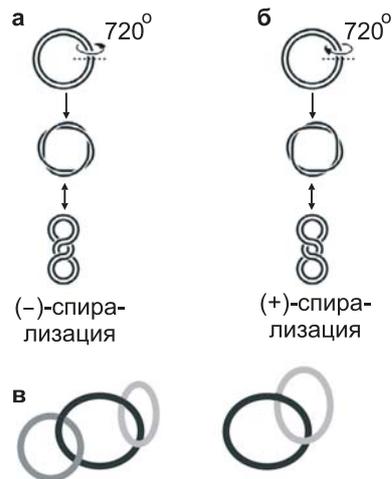


Рис. 1. Схематическое изображение сверхспирализации ДНК с образованием закрученности двухцепочечной ДНК против часовой стрелки – «(-)»-спирализация (а), и по часовой стрелке – «(+)-спирализация (б).

На схеме показаны две катеновые структуры ДНК – две и три сцепленные кольцевые структуры ДНК (в).

релаксирующие топоизомеразы и топоизомеразы, способные катализировать образование топологически напряженной формы ДНК.

ДНК-гираза (топоизомераза II) – бактериальный фермент, способный вносить отрицательные супервитки в замкнутые кольцевые ДНК, используя энергию АТФ. В регуляции топологического состояния хромосомной ДНК у бактерий также участвуют ДНК-топоизомеразы I-го типа, которые релаксируют отрицательные супервитки и, тем самым, оказывают на ДНК действие противоположное ДНК-гиразе. Совместное действие двух данных типов ферментов и их клеточная регуляция обеспечивает поддержание нужного уровня топологического состояния генома, необходимого для проявления активности различных ферментов, взаимодействующих с ДНК.

В отличие от бактерий, в клетках высших эукариот не найдено ферментов аналогичных ДНК-гиразе, однако у простейших в ядерном геноме обнаружены два гена гиразы, белковые продукты которых функционируют в пластидах [18]. Возможно, такие ферменты и не требуются высшим эукариотическим организмам, поскольку изменение топологии клеточной ДНК достигается при образовании нуклеосом. Предполагается, что именно нуклеосомное строение хроматина обеспечивает сверхспирализацию ДНК. Поскольку при накручивании топологически замкнутой ДНК на гистоновые глобулы образуются отрицательные супервитки, то между нуклеосомами должно накапливаться столько же положительных супервитков, и для их снятия необходимо присутствие релаксирующих ферментов, таких как топоизомераза I. Топоизомеразы I-го типа эукариот способны релаксировать как положительные, так и отрицательные супервитки и, наряду с топоизомеразами II-го типа, участвуют в регуляции уровня сверхспирализации как на уровне нуклеосомной ДНК, так и в ходе процессов, вызывающих изменения в топологии ДНК-дуплекса.

## II. КЛАССИФИКАЦИЯ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ТОПОИЗОМЕРАЗ

Первая ДНК-топоизомераза первого типа была выделена из *E. coli* в 1971 г. [19], которая позднее была охарактеризована более детально [20]. В 1972 г. эукариотическая топо I была обнаружена в клетках млекопитающих [21], а затем она была выделена из дрожжей и большого числа различных млекопитающих [21–29]. В дальнейшем большое число топоизомераз I было выделено из различных про- и эукариотических организмов: топо III из *E. coli* [31, 32] и из дрожжей [33], обратная гираза из термофильной археобактерии

*Sulfolobus acidocaldarius* [34] и, сравнительно недавно – топо V из гипертермофильного *Methanopyrus kandleri* [35, 36]. Новая топоизомераза IA-типа – Dam топо III, была выделена из термофильной археобактерии *Desulfurococcus amylolyticus* [37].

Существующая в настоящее время классификация топоизомераз I-го типа представлена в таблице. Из-за различия биохимических свойств эукариотических и прокариотических топоизомераз первого типа, ферменты были разделены на две группы согласно источнику происхождения. В отдельную группу обычно выделяют топо вирусной природы. Как прокариотические, так и эукариотические топоизомеразы катализируют релаксацию отрицательно ss ДНК («–», см. рис. 1). Кроме того, эукариотическая топо I также релаксирует положительно ss ДНК («+», см. рис. 1). Прокариотическая топо I способна катализировать реакцию заузливания оц кольцевой ДНК. Фермент вируса оспы примерно в три раза меньше по размеру эукариотической топо I и гомологичен его С-концевому участку; релаксирует как «–», так и «+» ss ДНК [38, 39].

Открытие новых топо первого типа и изучение их свойств показало, что классификация ферментов согласно источнику происхождения не совсем адекватно отражает существующую ситуацию, поэтому было предложено разделять топоизомеразы I-го типа, исходя из первичной структуры белков [1].

Так, эукариотическая топо III дрожжей оказалась очень похожа на топо I и III из *E. coli* и также как эти ферменты, была специфична к оц ДНК [40]. Открытие дрожжевой топо III и отнесение этого фермента к классу IA топоизомераз показало, что классификация топо на эукариотические и прокариотические не совсем правомерна. Недавно обнаружено, что клетки человека также содержат ген *TOP3*, гомологичный дрожжевому, но продукт человеческого гена содержит дополнительный С-концевой участок, подобный С-концевому участку фермента из *E. coli* [41]. Класс IA топоизомераз значительно расширился с открытием обратной гиразы, которая впервые была выделена из *S. acidocaldarius*. Было показано, что фермент катализирует АТР-зависимое введение в ДНК положительных супервитков [34, 42]. Активность, подобная таковой для фермента из *S. acidocaldarius*, была обнаружена во многих бактериях и археобактериях [43–45]. Причем оказалось, что N-концевой участок белка содержит мотивы, обнаруженные в ДНК-геликазах, а последовательность С-концевого участка похожа на таковую для ферментов из IA подкласса [46]. Кроме того, обратная гираза из *D. amylolyticus* проявляет такую же сиквенс-специфичность по отношению к расщепляемой ДНК, что и бактериальная топо I [47].

Таблица  
**Классификация ДНК-топизомера первого типа**

Характеристики ферментов	Прокариоты						Вирусы		Эукариоты	
	Торо I	Торо III	Dam торо III	Обратная гириза	Торо V	Торо I	Торо I	Торо I	Торо III	
Тип фермента*	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IB	IB	IA	
Размер	97 кДа	74 кДа	108 кДа	132–180 кДа	110 кДа	36 кДа	90–165 кДа	74–112 кДа		
Ген	<i>topA</i>	<i>topB</i>		<i>topRG</i>		<i>TOP1</i>	<i>TOP1</i>	<i>TOP3, TOP3α, TOP3β</i>		
Расщепляемый субстрат	оц	оц	оц	оц	оц	дц	дц	оц		
Ковалентная связь	5'-P	5'-P	5'-P	5'-P	3'-P	3'-P	3'-P	5'-P		
Зависимость от Mg <sup>2+</sup>	+	+	+	+	–	–	–	–		
Зависимость от АТФ	–	–	–	+	–	–	–	–		
Каталитическая активность	Релаксирует «←» сс ДНК	Расщепление двух оц ДНК	При 60–80°C релаксирует «←» сс ДНК	Введение положительных супервитков	Релаксирует «←», так и «+» сс ДНК	Релаксирует как «←», так и «+» сс ДНК	Релаксирует как «←», так и «+» сс ДНК	Релаксирует «←» сс ДНК		
Источник	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> , другие гипертермофильные бактерии	<i>Methanopyrus kandleri</i>	оспа	Дрожжи, млекопитающие, <i>Drosophila</i> , <i>Xenopus</i>	Дрожжи, млекопитающие		
Литературный источник	[19, 20]	[30, 31]	[36]	[33]	[34, 35]	[37, 38]	[21–29]	[32, 39]		

\* Все топоизомеразы относятся к ферментам пятого класса (изомеразы), 99-го подкласса и 1-го подподкласса (КФ 5.99.1).

Наличие у некоторых прокариот топоизомеразы, соответствующей ферменту IB подкласса, было установлено после выделения и анализа торо V из *M. kandleri* [35]. По биохимическим свойствам этот фермент больше похож на топоизомеразы IB, чем IA подкласса: он релаксирует как «-», так и «+» сс ДНК и при расщеплении образует ковалентную связь с 3'-концом расщепляемой цепи ДНК [35].

ДНК-топоизомеразы I и III-а из *Bacillus cereus* по своим свойствам похожи на торо I и III из *E. coli* [48]. Недавно выделена и охарактеризована необычная торо типа IA из *B. cereus* [49]. Этот фермент на 64% и 33% гомологичен торо III из *Bacillus subtilis* и *E. coli*, соответственно. Свойства этого фермента существенно отличаются от таковых у других бактериальных торо типа IA, включая IA и IB ферменты из *E. coli*. Этот фермент только частично релаксирует «-» сс ДНК и не способен полностью релаксировать ДНК. В отличие от *E. coli* торо III, торо III-а из *B. subtilis* не является декатеназой (на рис. 1 приведено схематическое изображение катенанов ДНК – двух или нескольких сцепленных между собой кольцевых молекул ДНК), расщепляющей катенаны ДНК, и фермент не способен компенсировать отсутствие *E. coli* торо III *in vivo*. Поэтому, торо III-а из *B. cereus* отнесена к уникальным прокариотическим торо IA-типа.

### III. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ТОПОИЗОМЕРАЗ

В настоящее время установлено, что каталитическая реакция, осуществляемая всеми топоизомеразами, включает в себя две следующие друг за другом реакции трансэтерификации. На первой стадии ОН-группа остатка тирозина активного центра фермента атакует межнуклеозидную фосфатную группу, образуя ковалентную тирозин-фосфатную связь с одним из концов расщепленной ДНК. Вторая реакция заключается в релаксировании цепи ДНК и освобождении фермента из ковалентного комплекса с ДНК (рис. 2). Собственно релаксация сс ДНК происходит между этими двумя реакциями. Механизм релаксации ДНК различен у ферментов из про- и эукариот, что будет подробно рассмотрено ниже [13–16].

Для всех известных топоизомераз показано, что в качестве нуклеофила в реакции расщепления ДНК выступает остаток тирозина активного центра фермента. По аналогии с другими фосфотрансферазными процессами, реакцию, осуществляемую топоизомеразами, следует отнести к реакциям, протекающим в соответствии с механизмом кислотно-основного катализа. Некоторые

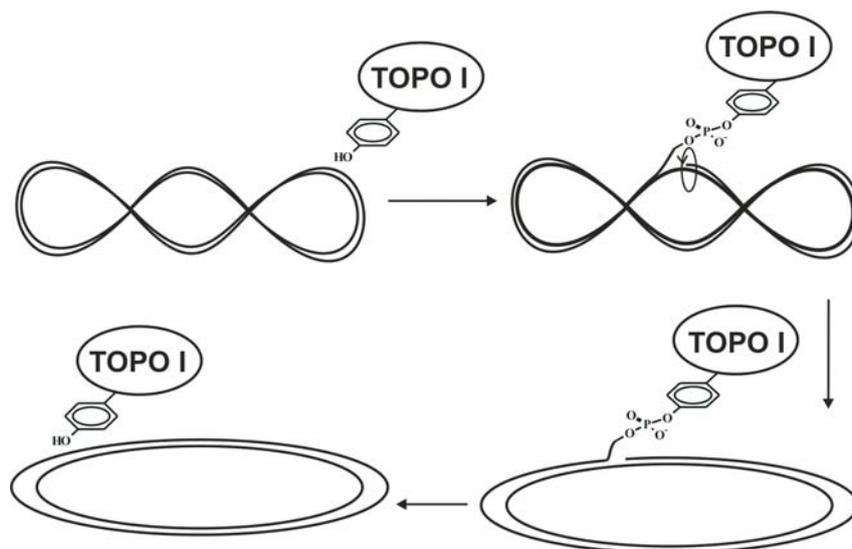


Рис. 2. Общий механизм действия ДНК-топоизомераз I-го типа: релаксация ферментом сверхспирализованной ДНК.

подтверждения этого были получены при исследовании кинетики реакции, катализируемой *topo I* вируса оспы. Вывод относительно основного катализа при атаке тирозином фосфодиэфирной связи ДНК и кислотного катализа, обеспечивающего протонирование уходящей 5'-гидроксильной группы, был сделан на основании полученной зависимости скоростей расщепления и религирования цепи ДНК от величины pH раствора [50, 51]. Эти данные, а также результаты кинетических исследований действия фермента, с использованием субстрата, где кислород (не участвующий в образовании фосфоэфирной связи с ДНК) расщепляемого фосфата заменен на серу, показали, что за реакцией расщепления происходит изменение конформации комплекса *topo I*-ДНК, при этом не разрушаются связи, образуемые а.о. фермента, осуществляющими кислотно-основной катализ, с расщепляемым фосфатом и освободившейся 5'-ОН группой. Кроме того, скорость реакции расщепления лимитируется эффективностью образования ковалентной связи, а скорость религирования – обратимыми конформационными изменениями фермента [51].

Фосфотирозиновый интермедиат, образуемый между ДНК и торо в ходе реакции, по-видимому, достаточно хорошо экранирован в активном центре фермента от молекул растворителя, поскольку реакция религирования с участием гидроксильной группы расщепленной цепи ДНК более вероятна, чем сольволиз фосфотирозиновой связи. При неправильном пространственном расположении гидроксильной группы дезоксирибозы, образующейся после расщепления ДНК, может протекать гидролиз или алкоголиз ковалентного комплекса ДНК с торо I *E. coli* и эукариот [52–55]. Эти процессы являются конкурирующими по отношению к нормальной реакции религирования и могут приводить к повреждению клеточной ДНК. Однако скорость сольволиза в этих случаях довольно низка при нейтральных значениях pH. Вероятно, ОН-группа молекулы воды в отличие от ОН-группы дезоксирибозы ДНК не совсем правильно ориентирована в каталитическом «кармане» фермента и поэтому не может обеспечить высокой скорости гидролиза фосфотирозиновой связи.

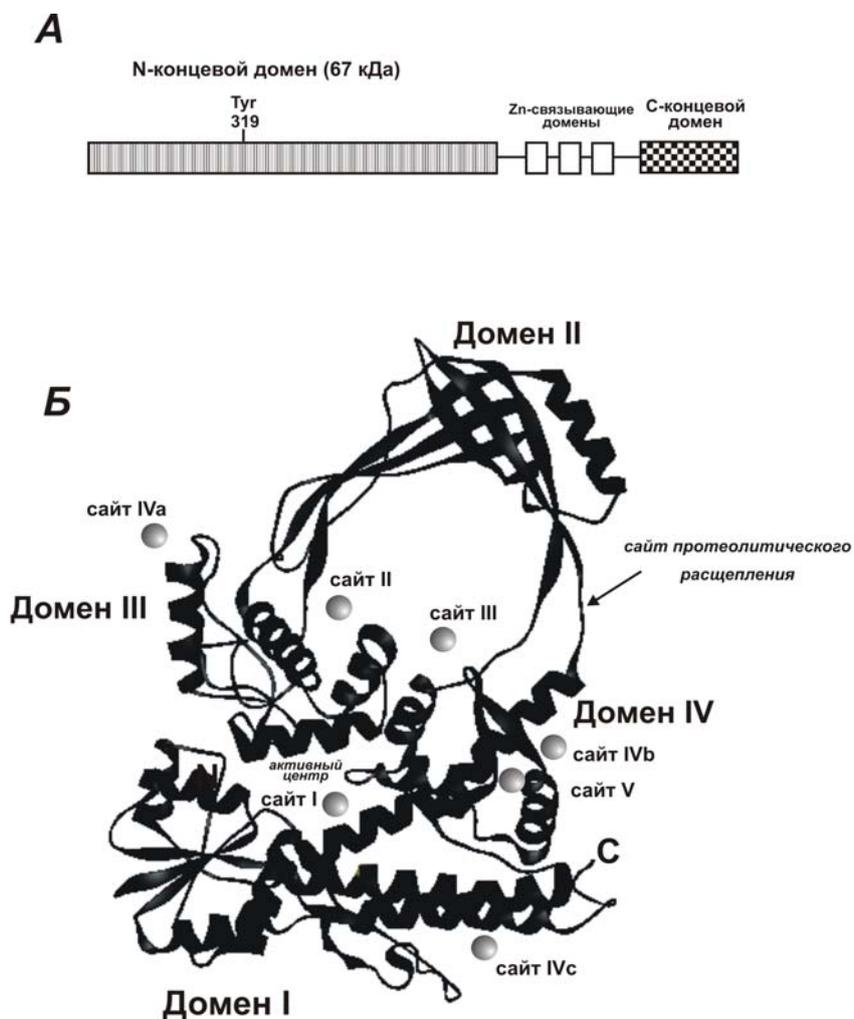
Если атом кислорода при атоме фосфора межнуклеозидной фосфатной группы заменен на атом серы, то при атоме фосфора возникает хиральный центр, которому соответствует два типа диастереомеров; они условно обозначаются как  $S_p$  и  $R_p$ . Взаимодействие расщепляемой межнуклеозидной фосфатной группы ДНК с а.о. активного центра торо I *E. coli* носит стереоспецифический характер, поскольку при замене атома кислорода (не участвующего в образовании фосфодиэфирной связи) расщепляемой фосфатной группы на серу, фермент способен расщеплять только  $R_p$  стереоизомеры олигонуклеотидов [53]. Замена фосфодиэфирной связи на 5'-фосфоротиатную связь приводит к необратимому расщеплению ДНК эукариотической торо I, поскольку 5'-сульфгидрильная группа, образующаяся после расщепления ДНК, не способна служить нуклеофилом в реакции религирования [56].

#### IV. ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА I *E. coli* – ТИПИЧНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ТОПОИЗОМЕРАЗ ПОДКЛАССА 1A

Из всех топоизомераз типа IA наиболее хорошо изучена торо I *E. coli* (*EcTopoI*) [19]. Этот фермент является мономерным металл-связывающим белком с мол. массой 97 кДа (рис. 3а). ДНК-топоизомераза I *E. coli* предпочтительно связывает оц ДНК и способна расщеплять одноцепочечные участки ДНК с последующим религированием. Фермент образует контакты как с 5'-, так и с 3'-концевыми участками ДНК сайта расщепления [20]. Наличие участка связывания

оц ДНК в каталитическом центре торо I позволяет ферменту расщеплять даже короткие олигонуклеотиды длиной в 7 звеньев. При этом расщепление происходит на расстоянии 3-х звеньев от 5'-конца и 4-х нуклеотидов от 3'-конца расщепляемого сайта [57].

После расщепления фермент остается ковалентно связанным через ОН-группу тирозина с 5'-фосфатом ДНК. В отличие от эукариотического фермента, торо I *E. coli* релаксирует только «-» сс ДНК. Такая специфичность торо I связана со способностью фермента узнавать именно оц участки ДНК, поскольку при связывании торо I с «-» сс ДНК энергии вполне достаточно, чтобы преодолеть энергетический барьер, связанный с разведением цепей ДНК на коротком участке дуплекса. Однако, в случае релаксированной или «+» сс ДНК для этого требуется значительно больше энергии, что объясняет неспособность торо образовывать ковалентный интермедиат с такими ДНК-субстратами [19, 20]. Участки фермента, расположенные вне каталитического «кармана» в случае торо IA подкласса, также принимают участие в связывании ДНК и непосредственно в реакции релаксации субстрата. Так, молекула торо I из *E. coli* содержит три иона  $Zn^{2+}$  [58, 59], которые связываются с С-концевым участком белка (а.о. 598–737), где расположены три тетрацистеиновых домена, участвующие в связывании и манипуляции цепями ДНК [60, 61]. В отсутствие всех трех  $Zn^{2+}$ -связывающих участков торо I не способна релаксировать ДНК, но ее способность связывать и расщеплять оц ДНК при этом сохраняется [59, 62, 63]. Первый, или два первых из трех  $Zn^{2+}$ -связывающих доменов необходимы ферменту для проявления релаксирующей активности, поскольку удаление С-концевой части белка, содержащей два первых тетрацистеиновых участка, приводит к инактивации фермента [62]. Удаление ионов цинка также полностью элиминировало релаксирующую активность торо I [64, 65], хотя фермент мог связывать и расщеплять при этом оц олигонуклеотиды [64]. Последние данные, касающиеся изучения механизма действия торо I *E. coli* указывают на то, что участок фермента, состоящий из С-концевого и  $Zn^{2+}$ -связывающих доменов (ZD-домен), не принимает участия в процессе узнавания ДНК и в каталитическом процессе расщепления–религирования, однако при этом контактирует с одной из цепей дуплекса, которую торо I пропускает через образующийся разрыв по ходу релаксации «-» ссДНК [66]. Устойчивый к протеолизу 30 кДа домен, расположенный в центральной части фермента, содержит остаток тирозина, выступающий в качестве нуклеофила в реакции расщепления ДНК. Этот домен способен расщеплять оц олигонуклеотиды [10]. Участок торо I (67 кДа), включающий в

Рис. 3. Строение ДНК-топоизомеразы I *E. coli*.

*А* – доменная организация торо I.

*Б* – структура N-концевого фрагмента фермента (67 кДа), определенная методом РСА. Расположение нуклеотид-связывающих сайтов торо I установлено исходя из данных РСА комплексов фермента с различными моно- и тринуклеотидами [73].

себя первые 596 а.о., по своей последовательности идентичен всем представителям топоизомераз подкласса IA [67]. Данный фрагмент белка не способен катализировать релаксацию ДНК, но может связывать и расщеплять оц ДНК также, как полный фермент или фермент, лишенный ионов  $Zn^{2+}$  [63]. Эти данные говорят о том, что ZD-домен фермента ответствен за манипуляцию цепями ДНК в процессе релаксации. Остальная часть торо выполняет функцию связывания, расщепления и последующего религирирования субстрата.

## V. СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ФЕРМЕНТОВ

Рентгеноструктурный анализ ферментов и их комплексов с лигандами является одним из наиболее информативных методов, позволяющих получить достаточно наглядную картину о пространственной структуре белков и их контактах с ДНК. На основании данных РСА могут быть сделаны некоторые предположения о возможном механизме действия фермента, что, несомненно, важно для изучения основных принципов белково-нуклеиновых взаимодействий. За последние годы проведено изучение структуры различных фрагментов ДНК-топоизомераз первого типа методами РСА и ядерного магнитного резонанса [67–72].

*Структура N-концевого фрагмента (67 кДа) 30 торо I E. coli* была определена с разрешением 2.2 Å [67]. Данный фрагмент фермента состоит из четырех доменов, которые образуют структуру, по форме напоминающую асимметричный тор (рис. 3б). Средний диаметр тора между  $\alpha$ -атомами углерода составляет 33.5 Å и между полипептидными цепями 27.5 Å. Первые 160 а.о. образуют  $\alpha/\beta$  домен или так называемую шпильку Россмана [73], состоящую из четырех параллельных  $\beta$ -цепей зажатых между четырьмя  $\alpha$ -спиралями (домен I). Этот домен содержит несколько высококонсервативных участков. Вершина тора (домен II) имеет изогнутую форму, образуемую за счет нескольких антипараллельных  $\beta$ -складок, пересекающихся под углом примерно 90°. Остаток тирозина, участвующий в расщеплении ДНК, расположен в третьем домене, состоящем из нескольких  $\alpha$ -спиралей и содержащим много высококонсервативных а.о. Оставшаяся часть 67 кДа фрагмента торо представляет собой ряд  $\alpha$ -спиралей, образующих домен IV.

Недавно также получены данные РСА торо I из *Thermotoga maritima* с разрешением 1.7 Å [74]. Полный бактериальный фермент имеет торо-подобную структуру и содержит консервативный домен транскриптации, включающий домены I–V и C-концевую последо-

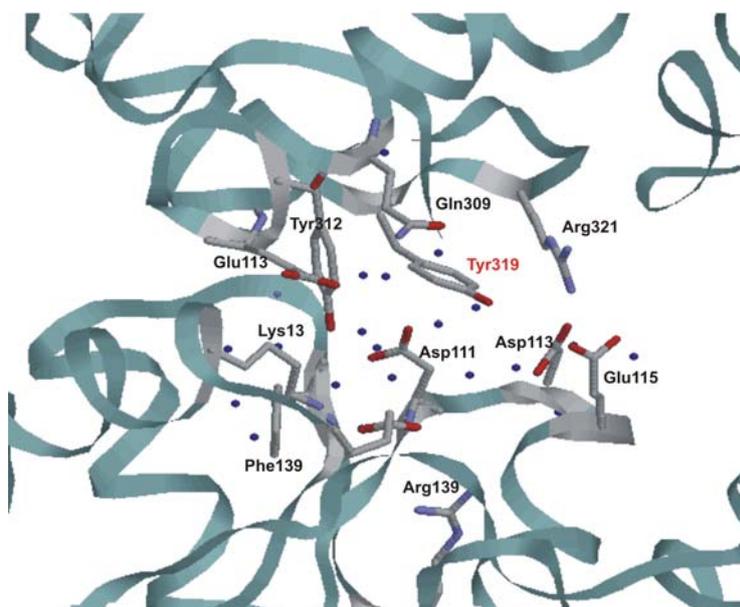


Рис. 4. Пространственное расположение различных остатков аминокислот в структуре ДНК-топоизомеразы I из *E. coli* вокруг каталитически активного а.о. Tyr319. Темно-синими точками указаны контакты между различными а.о.

вательность связывающую ион цинка (домен V), которая расположена напротив домена IV.

Расположение активного центра топо из *E. coli* определяется по наличию каталитического Tyr319 (домен III) в пространстве между доменами I и III (рис. 3б). Tyr319, а также расположенные в этой области а.о., принимают участие в образовании контактов между двумя этими доменами и образуют участок, который высококонсервативен для всех белков данного подкласса [75]. Tyr319 взаимодействует с рядом консервативных а.о. (Glu9, Lys13, Asp111, Asp 113, Glu115, Gln309, Glu313, Tyr312 и Arg321), образуя при этом обширную сеть водородных связей с участием молекул воды и солевых мостиков (рис. 4). Tyr319 образует водородную связь с Asp111 через молекулу воды и с Asp113 и Glu115 с участием двух молекул воды. Специфическая конформация этих трех а.о. по структуре напоминает участок экзонуклеазного центра фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* [76], который участвует в связывании иона металла. Однако связывание иона металла в этой области не было установлено при PCA N-концевого фрагмента топо I *E. coli*,

что неудивительно, поскольку данные а.о. вовлечены в образование сети водородных связей. Связывание иона магния этими а.о. может зависеть от конформационных изменений структуры фермента, которые происходят в процессе катализа либо когда белок принимает конформацию, при которой появляется возможность взаимодействия этих остатков с ДНК-субстратом.

Для идентификации а.о. активного центра торо, принимающих участие в реакции трансэтерификации между ДНК и каталитическим остатком Tyr319, были проведены эксперименты по замещению 12-ти высококонсервативных полярных а.о. (Glu9, His33, Asp111, Glu115, Gln309, Glu313, Thr318, Arg321, Thr322, Asp323, His365 и Thr496) на аланин [77]. При этом выяснилось, что только мутации Glu9 и Arg321 приводили к некоторому уменьшению релаксирующей активности фермента. В то же время, торо, несущая мутацию R321A, расщепляла ДНК с меньшей эффективностью. Замена Arg321 на лизин не оказывала существенного эффекта на активность фермента, тогда как замещение Glu9 на глутамин значительно уменьшало релаксирующую способность торо I, но не оказывало влияния на реакцию расщепления и религирования ДНК. Таким образом, Glu9, по-видимому, играет решающую роль на стадии трансэтерификации через взаимодействие с 3'-ОН-группой. Положительно заряженный остаток Arg321 также может принимать участие в этом процессе, взаимодействуя с расщепляемым фосфатом ДНК [77].

Проведен PCA комплекса N-концевого фрагмента (67 кДа) торо I из *E. coli* с оц ДНК и показано сближение параллельной ДНК белковой спирали фермента с ДНК [78]. Из данных PCA комплексов торо IA с оц ДНК следует, что Ser-192, Arg-195 и Gln-197 являются консервативными остатками и могут быть важными для катализа [79]. Сайт-направленные замены этих остатков на другие а.о. показал, что Arg-195 и Gln-197 необходимы для разрыва ДНК и, скорее всего, для правильной адаптации структуры G цепи ДНК с ферментом перед ее каталитическим расщеплением [80]. Мутация остатка Ser-192 не влияла на связывание сс ДНК, но приводила к уменьшению скорости ее релаксации.

Недавно проведен экспериментально-теоретический анализ роли Ser10 и Lys13, которые являются консервативными остатками всех торо типа IA [81]. Замена этих а.о. в торо I из *E. coli* на Ala приводила к снижению гидролитической и релаксирующей активностей фермента. Lys13 взаимодействует с Glu9, который считается участвующим в катализе. Снижение активностей фермента при замене лизина, как полагают авторы, может быть связано с тем, что он является донором

протона для Glu9 или катионом, облегчающим реакцию гидролиза ДНК. Ser10 образует водородную связь с межнуклеотидной фосфатной группой и его замена приводит к нарушению правильного связывания.

С помощью сайт-направленного мутагенеза консервативного N-концевого Gly-194 альфа-петли торо I *E. coli* показано, что повышенная подвижность а.о. вокруг Gly-194 необходима для проявления ферментом гидролизующей и релаксирующей активностей, ассоциированных с раскрытием и закрытием так называемых «ворот» фермента при его связывании с расщепляемой G-цепью ДНК, а также для последующих процессов релаксации [82].

30 кДа фрагмент, образующийся при протеолизе *EcTopoI*, состоит из доменов II и III. Чувствительный к протеолизу участок фермента расположен в полипептидной цепи, соединяющей эти домены с остальной глобулой белка (рис. 3б). Интересно, что удаление этих двух доменов не вносит существенного изменения в конформацию остальной части белковой молекулы.

Торо I может существовать в виде двух возможных конформаций: «закрытой», когда домен III образует контакты с доменом I, и в «открытой», когда домен III отделяется от основной глобулы фермента за счет небольшого поворота петли, образуемой доменами II и III, вокруг двух экспонированных и чувствительных к протеолизу полипептидных цепей, соединяющих эти домены с остальной частью фермента (рис. 5).

Возможность торо I принимать более одной конформации чрезвычайно важна для осуществления механизма узнавания ДНК и манипуляции ее цепями. В закрытой конформации активный центр фермента не доступен для взаимодействия с ДНК (рис. 5а). В открытой конформации (рис. 5б) и «каталитический» тирозин, и другие а.о. домена I, участвующие в катализе и узнавании субстрата, могут взаимодействовать с ДНК. Кроме того, в открытой конформации одно- или двухцепочечная ДНК может легко входить (и выходить) во внутреннюю полость фермента через открывающееся пространство между доменами I и III. Наличие тороидальной структуры белка предполагает, что внутренняя полость тора может быть участком связывания ДНК. Эта область содержит достаточное количество линейно расположенных положительно заряженных а.о., а размер полости предполагает возможность связывания дц ДНК без каких-либо стерических помех. Наличие внутри тора значительного положительного электростатического потенциала также указывает на возможную роль данного участка в связывании ДНК [67].

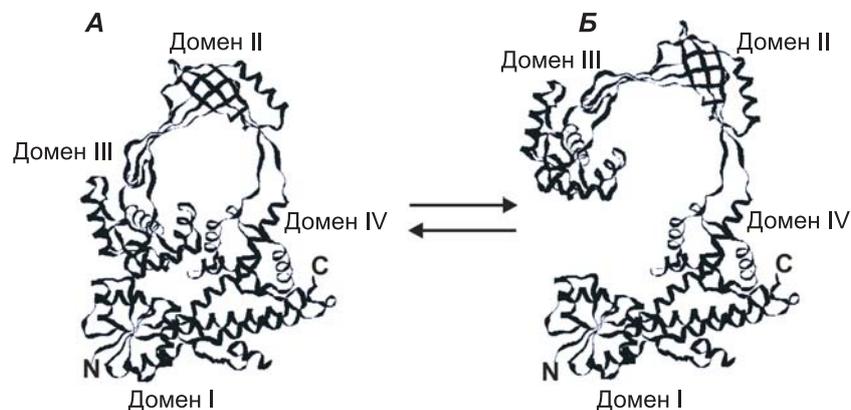


Рис. 5. Конформационные перестройки, происходящие в торо I *E. coli*.

А – закрытая конформация фермента.

Б – открытая конформация фермента.

Одним из интересных аспектов реакции, осуществляемой торо, является стадия релаксации сс ДНК. В случае ферментов IA подкласса совокупность биохимических и структурных исследований свидетельствует в пользу механизма, когда релаксация происходит путем пропускания нерасщепляемой цепи ДНК через разрыв, образуемый во второй цепи, при этом происходит сброс только одного супервитка.

Данные РСА о структуре фрагмента торо I (67 кДа) позволяют высказать предположение о возможном механизме пропускания цепи ДНК через образовавшийся разрыв, исходя из возможности существования у фермента, по крайней мере, двух конформационных состояний – открытой и закрытой конформации. Наиболее наглядно механизм можно представить на примере реакции сцепления/расщепления дц ДНК [67] (рис. 6). Торо I *E. coli* может катализировать реакцию сцепления/расщепления двух дц ДНК при условии, что одна из них содержит одноцепочечный участок, поскольку фермент способен расщеплять только оц ДНК. Данная реакция хорошо изучена [83, 84] и, исходя из данных РСА, считается, что сначала происходит переход фермента в открытую конформацию (рис. 6б) с последующим связыванием двух молекул ДНК (рис. 6в), при этом одна из молекул попадает во внутреннюю полость торо I, а вторая – в активный центр фермента. Далее происходит расщепление ДНК в оц участке с разведением разорванной цепи (рис. 6г), после чего фермент способен пропустить другую молекулу ДНК через образовавшийся разрыв (рис. 6д). Затем происходит «сведение» расщепленной цепи и реакция

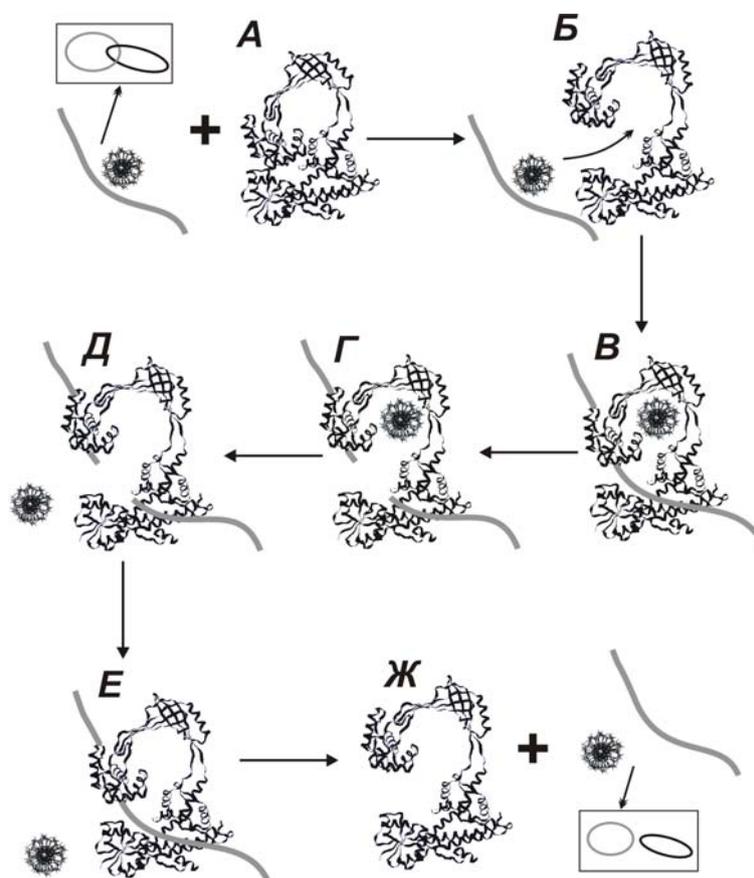


Рис. 6. Механизм реакции разъединения двух кольцевых молекул ДНК (одна из которых содержит одноцепочечный разрыв), катализируемой топо I *E. coli* (пояснения к схеме даны в тексте) по [67].

религирования (рис. 6е). После чего молекула ДНК диссоциирует из активного центра фермента (рис. 6ж). Согласно данной схеме, в процессе реакции белок должен подвергаться значительным конформационным перестройкам для того, чтобы развести разорванную цепь ДНК и обеспечить попадание второй молекулы ДНК во внутреннюю полость фермента. Необычная структура топоизомеразы удовлетворяет всем этим требованиям. Хорошо видно, что необходим переход фермента в открытую форму для обеспечения доступности активного центра. Реакция расщепления и разведение разорванной цепи происходит практически синхронно. При этом удерживание

ДНК ферментом происходит за счет ковалентного взаимодействия одной половины расщепленной цепи (плюс конец) с доменом III и нековалентного взаимодействия другой (минус конец) с доменом I. Анализ нуклеотидной последовательности в области сайта расщепления показал, что нековалентные взаимодействия фермента с минус концом расщепленной цепи носит специфический характер, с предпочтительным связыванием четырех остатков цитозина с 5'-конца от сайта расщепления. Возможность домена I связывать минус конец цепи подтверждается наличием в этом участке шпильки Россмана, обнаруженной в сайтах связывания нуклеотидов или динуклеотидов различных белков.

Из данных РСА становится понятным механизм релаксации сс ДНК топоизомеразой I *E. coli*, а также возможность фермента релаксировать только отрицательные супервитки. Вначале происходит связывание дц ДНК во внутренней полости торо I, а дальше должно произойти разведение цепей так, чтобы одна из них оказалась в активном центре. Последующее расщепление и пропускание второй цепи через образовавшийся разрыв обеспечивает сброс одного супервитка в ДНК. Такое разделение цепей в случае «+» сс ДНК требует очень много энергии, а в случае «-» сс ДНК этот процесс протекает гораздо легче. Количество затраченной на разделение цепей энергии зависит от степени сверхспирализации, поэтому скорость релаксации тем выше, чем больше топологическое напряжение в ДНК.

## VI. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ I ИЗ *E. coli* С ДНК

Последние результаты РСА, полученные для различных комплексов торо I *E. coli* с моно- и тринуклеотидами, указывают на то, что в пределах белковой глобулы фермента существуют, по крайней мере, пять потенциальных участков связывания ДНК [85]. Локализация соответствующих сайтов узнавания приведена на рис. 2. Согласно полученным данным, в процессе узнавания торо I образует контакты с сахарофосфатным остовом лигандов, и, по всей видимости, не взаимодействует с основаниями [85].

Первый ДНК-связывающий сайт расположен в районе активного центра фермента, в полости между доменами I, III и IV, при этом фосфатная группа мононуклеотидов контактирует с Arg114 и Arg161. Кроме того, поблизости расположены еще два остатка Arg136 и Arg493, что обеспечивает высокий положительный потенциал данного участка и делает его наиболее оптимальным для связывания ДНК [85]. Второй

сайт располагается в большой центральной полости торо I. Данный участок, судя по всему, предназначен для связывания одной из цепей ДНК, которая оказывается во внутренней полости фермента после разведения нитей дуплекса. В узнавании могут участвовать остатки Arg296 и Arg396, которые образуют связи с фосфатными группами. Третий сайт также расположен в центральной полости торо I в непосредственной близости от положительно заряженного кластера белка, что делает этот участок высокоаффинным сайтом узнавания ДНК. Здесь в непосредственные контакты с лигандом вовлечены остатки Arg516, Gln291 и Arg515 [85]. Четвертый сайт специфически связывает 3',5'ADP (5'-pAp-3'), который не взаимодействует ни с одним из других выявленных участков. При связывании лиганда с ферментом, 3'-фосфат контактирует с Glu520, что является достаточно необычным случаем взаимодействия карбоксильной группы белка с межнуклеозидной фосфатной группой ДНК. В образующейся структуре 3',5'ADP формирует мостик между соседними молекулами белка, что может указывать на то, что связывание нуклеотидов в этом участке фермента, скорее всего, является лишь особенностью кристаллической упаковки. В то же время, 3',5'ADP активировал конформационные изменения фермента, в том числе и в районе активного центра, что не исключает определенной роли данного сайта в связывании ДНК с первым узнающим центром [85]. Пятый сайт был классифицирован, как фосфат-связывающий участок, формируемый остатками Arg535 и Arg202 домена IV.

Показано, что минимальным субстратом для торо I *E. coli* является одноцепочечный олигонуклеотид длиной в семь звеньев для олигоаденилатов и восемь звеньев в случае олиготимидилатов [57]. Расщепление ДНК происходит таким образом, что фермент должен образовывать контакты с тремя межнуклеозидными фосфатными группами с 3'-конца и двумя фосфатными группами с 5'-конца относительно сайта расщепления. При этом взаимодействие торо I с расщепляемой и (-1)-фосфатной группами не носит стереоспецифического характера, в то время как субстрат содержащий (*Rp*)-тиоизомер в (+1)-положении расщеплялся ферментом в 10 раз менее эффективно, чем его (*Sp*)-изомер [86]. Обратная зависимость наблюдается для фосфатных групп (+3) и (-2)-сайтов, где (*Rp*)-конформация является более предпочтительной, чем (*Sp*)-аналог. При этом разница в скорости расщепления различных тиоизомеров была существенно выше, чем различия в сродстве модифицированных лигандов [86]. Это может указывать на то, что расщепление может происходить только в случае правильного расположения субстрата в активном центре, когда конформационные

изменения в ДНК, необходимые для каталитической стадии реакции, протекают наиболее эффективно.

## VII. ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА III *E. coli*

ДНК-топоизомераза III *E. coli* – полипептид, состоящий из 653 а.о. [87], впервые была выделена из клеток, содержащих делецию по гену, кодирующему торо I (torA), как белок способный релаксировать сс ДНК [32]. Затем было обнаружено, что данный фермент обладает также способностью с высокой эффективностью катализировать расщепление цепей ДНК в процессе репликации [88]. Показано, что фермент работает в клетках *E. coli* как декатеназа [89].

В отличие от торо I, торо III практически не способна релаксировать отрицательно сс ДНК при стандартных условиях проведения реакции (10 мМ Mg<sup>2+</sup>, 50 мМ Na<sup>+</sup> или K<sup>+</sup> и 37°C), а требует для этого повышенной температуры (52°C) и более низкой концентрации солей (<20 мМ) [32, 88]. В то же время, расщепление димеров плазмидной ДНК, а также разделение цепей ДНК в процессе репликации, катализируемые торо III, не требуют столь жестких ограничений и осуществляются при стандартных условиях [88]. Торо I не способна катализировать *in vitro* реакцию разделения цепей при репликации [90], что ведет к разграничению роли этих топоизомераз в клетке: торо III расщепляет новосинтезированные молекулы ДНК в ходе репликации, а торо I участвует в поддержании необходимой степени сверхспирализации хромосомной ДНК [88].

Недавно показано, что биологическая роль торо III в процессах рекомбинации близка к таковой для RuvABC белка [91]. Поскольку клетки *E. coli* не жизнеспособны только когда дефектны одновременно по двум ферментам IA-типа, торо I и III, считается, что эти ферменты делят между собой основные функции топоизомераз в клетках [92].

Торо III является сиквенс-специфическим белком. Олигонуклеотиды, содержащие последовательность:



с большей эффективностью связываются и расщепляются ферментом. В то же время, фермент может взаимодействовать и с другими последовательностями, что позволяет торо III, связываясь с неспецифическими участками, осуществлять поиск необходимой последовательности, двигаясь по ДНК [93].

Минимальный участок ДНК, необходимый для проявления активности торо III, составляет семь нуклеотидных звеньев: 6 из них расположены на 5'-конце и только одно нуклеотидное звено на 3'-конце сайта расщепления [93]. Торо также асимметрично взаимодействует с ДНК последовательностью и защищает от гидролиза нуклеазой 14 звеньев, 2 из которых находятся на 3'- и 12 на 5'-конце ДНК от точки расщепления [93]. Таким образом, в процессе катализа фермент образует прочные нековалентные контакты с 5'-участком и лишь минимальное число контактов с 3'-участком ДНК. Такое асимметричное взаимодействие в значительной степени оправдано, поскольку в ходе катализа фермент оказывается ковалентносвязанным с 3'-фрагментом последовательности и, следовательно, не требует прочного закрепления этой части ДНК за счет нековалентных связей. В отличие от торо I, данный фермент помимо ДНК способен расщеплять молекулы РНК [94].

Торо III, также как и торо I, с высокой эффективностью взаимодействует с оц ДНК и достаточно слабо с дуплексами [95]. В случае релаксации сс ДНК ферментом, связывание с оц участками может происходить после разведения цепей дуплекса, что облегчается при наличии отрицательной сверхспирализации. При расщеплении образующихся в ходе репликации цепей ДНК, торо III может связываться с короткими участками, образующимися в реплицирующейся ДНК после удаления РНК-праймеров [93]. Данное предположение подтверждается тем, что реакция расщепления ДНК-димеров, катализируемая торо III, существенно облегчается при наличии даже небольших оц участков в ДНК-субстрате [88].

Анализ гена, кодирующего торо III (*topB*), показал, что данный фермент в значительной степени гомологичен торо I [86]. Однако, несмотря на существенную гомологию, эти ферменты катализируют различные реакции. В то же время, гомология данных белков распространяется только на первые 600 а.о. С-концевые участки торо I и торо III существенно различаются, но оба участвуют в связывании ДНК [95, 96]. С-концевой участок торо I содержит три «цинковых пальца» и большое число остатков Lys и Arg [58]. В случае торо III данный участок не содержит каких-либо известных мотивов, но также богат положительно заряженными а.о. [95]. Показано, что сродство фермента к ДНК постепенно снижается при последовательном удалении С-концевых а.о. белка. При отсутствии всех этих а.о. уменьшается процессивность действия фермента в реакции релаксации «–» сс ДНК, но это никак не сказывается на выборе сайта расщепления [95]. Удаление 49 а.о. с С-конца торо III приводит к уменьшению ее

средства к оц субстрату примерно на два порядка и приблизительно к такому же понижению каталитической активности фермента [93]. Замена данных а.о. в торо III на С-концевой фрагмент торо I ведет практически к полному восстановлению релаксирующей активности, при этом способность фермента расцеплять цепи ДНК улучшается, но незначительно [93]. Таким образом, различия в структуре С-концевых доменов данных ферментов во многом определяют разницу в проявляемой каталитической активности.

РСА торо III *E. coli* показал, что структурная организация фермента достаточно близка к таковой для топоизомераз IA-типа [97]. Белковая глобула образована четырьмя доменами, формирующими тороидальную структуру, что напоминает строение торо I, однако относительное расположение четырех доменов существенно различается. Основное различие между белками состоит в наличии в торо III дополнительных 17 а.о., образующих положительно заряженную петлю, выступающую со стороны центральной полости фермента. Данный фрагмент может быть вовлечен в реакцию сцепления – расцепления ДНК [85]. Действительно, удаление данного домена приводило к резкому (на 4 порядка) падению активности торо III в реакции каталитического разделения цепей ДНК, в то время как способность релаксировать ДНК уменьшалась лишь в 20 раз [98]. Участок торо III, предназначенный для связывания оц ДНК, представлен в виде «бороздки», расположенной на одной из сторон белковой глобулы и направленной в сторону активного центра фермента [97].

### VIII. ОБРАТНАЯ ГИРАЗА

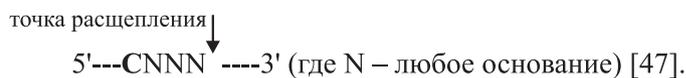
Обратная гираза – один из примеров белков с необычными функциями, продуцируемых гипертермофильными организмами. Данный фермент, в отличие от других топоизомераз, осуществляет введение положительных супервитков в ДНК, используя при этом энергию АТФ или dАТФ [99]. В присутствии других трифосфатов (УТФ, GТФ или СТФ) обратная гираза катализирует только релаксацию «←» сс ДНК [100]. Фермент с большей эффективностью гидролизует АТФ в присутствии оц ДНК, чем дц ДНК, что указывает на предпочтительное связывание белка с оц участками ДНК [100]. Впервые обратная гираза была выделена из *S. acidocaldarius* [34]. Изучение механизма действия фермента показало, что в ходе реакции обратная гираза образует ковалентную связь с 5'-фосфатной группой расщепляемой ДНК [47], и, следовательно, ее можно отнести к топоизомеразам IA-типа. В дальнейшем было показано, что такой тип активности присутст-

вует во всех гипертермофильных бактериях [101], а «+» сверхспирализация, обеспечиваемая ферментом, необходима для стабилизации дуплексной структуры хроматина при высоких температурах, что предотвращает локальное плавление ДНК, а также облегчает процесс ренатурации дц структуры после «прохождения» этих участков ДНК транскрипционным комплексом [89].

Обратная гириза – мономерный белок с большой мол. массой [99]. Анализ аминокислотной последовательности фермента из *S. acidocaldarius* показал, что С-концевой домен очень напоминает эти домены у топо I *E. coli* и топо III дрожжей [46]. При этом N-концевой домен не имеет каких-либо гомологий с известными топоизомеразными, но содержит несколько геликазных мотивов, включая АТР-связывающий участок [46]. Показано, что топоизомеразный домен фермента может проявлять ДНК-релаксирующую активность, а геликазный фрагмент не способен катализировать плавление цепей дуплекса, и, скорее всего, действует в составе полного фермента в качестве АТРазы, осуществляющей конформационные изменения белка, необходимые для проявления каталитической активности [101]. Обратная гириза, выделенная из *M. kandleri*, в отличие от ферментов, полученных из других источников, была гетеродимером, состоящим из 43 кДа (RgyA) и 138 кДа (RgyB) субъединиц, которые, по аналогии с мономерными ферментами, проявляли топоизомеразную и АТРазную активности, соответственно [99].

Обратная гириза, так же как и бактериальная топо I, с высокой эффективностью связывается с оц участками ДНК [45, 100], что не удивительно, учитывая определенную гомологию между ними. Такое предпочтение можно связать с непосредственными функциями, выполняемыми ферментами. В случае топо I легкость образования оц участков связана с избыточным количеством отрицательных супервитков, в то время как для обратной гиризы участком связывания могут служить оц области, образующиеся в результате денатурации дц ДНК при действии высоких температур.

Исследование специфичности действия обратной гиризы из *Desulurococcus amylolyticus* показало, что фермент с большей эффективностью расщепляет последовательность:



Такое же предпочтение отмечалось при узнавании и расщеплении ДНК бактериальной топо I [47]. Относительная частота расщеплений различных последовательностей для обратной гиризы также зависела

от концентрации  $Mg^{2+}$  и температуры [47]. Считается, что фермент образует прочный контакт с цитозином в  $-4$  положении последовательности, и это позволяет избежать проскальзывания 5'-участка ДНК в процессе катализа [47]. В то же время, относительное удаление такого прочного контакта от сайта расщепления дает возможность более гибко реагировать на конформационные перестройки в ходе «продвигания» второй цепи через образовавшийся разрыв.

### IX. ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА III ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ АРХЕБАКТЕРИЙ (DAM ТОРО III)

Dam topo III – новая топоизомераза IA-типа, выделенная из термофильной археобактерии *D. amylolyticus* [37]. Фермент представляет собой мономерный белок с мол. массой 108 кДа. Dam topo III проявляет специфичность к оц участкам ДНК и ее каталитическое действие заключается в изменении числа зацеплений в спиральной структуре клеточной ДНК [37]. Фермент проявляет различные активности в зависимости от температуры проведения реакции: при 60–80°C релаксирует только « $\rightarrow$ » сс ДНК (увеличивает число зацеплений), а при 82–99°C способен релаксировать как « $+$ » (уменьшая число зацеплений), так и « $\rightarrow$ » сс ДНК. Интересно, что способность фермента релаксировать « $+$ » сс ДНК зависит от фазы роста клеток *D. amylolyticus*: активность Dam topo III выше в экспоненциальной фазе по сравнению со стационарной [37]. Для работы фермента необходимы ионы  $Mg^{2+}$ , а добавление АТФ не влияет на каталитическую активность [37]. Важно подчеркнуть, что данный тип активности помимо *D. amylolyticus* характерен и для других термофильных археобактерий [37].

Способность Dam topo III релаксировать « $+$ » сс ДНК, вероятно, не имеет физиологического значения и является результатом действия высоких температур на ДНК. Действительно, плавление цепей « $+$ » сс ДНК при повышении температуры должно приводить к появлению оц участков. Dam topo III проявляет специфичность к таким областям и способна осуществлять релаксацию ДНК. При более низких температурах « $+$ » сс ДНК (в отличие от « $\rightarrow$ » сс ДНК) более устойчива к «разъединению» комплементарных цепей и, следовательно, не проявляет субстратных свойств.

Таким образом, при перmissive для *D. amylolyticus* температуре (вплоть до 97°C) Dam topo III будет в большей степени способствовать денатурации клеточной ДНК, чем стабилизации ее

дуплексной структуры. Следовательно, маловероятно, чтобы данный фермент принимал участие в регуляции топологического состояния клеточной ДНК и, в частности, релаксировал «+» сс ДНК, поскольку высокое сродство обратной гиразы к оц участкам, образующимся в клеточной ДНК, должно препятствовать связыванию Dam торо III с этими областями [37]. Помимо поддержания ДНК в определенном топологическом состоянии, роль бактериальных топоизомераз может заключаться в расцеплении новообразовавшихся ДНК молекул в ходе репликации [37]. Dam торо I (обратная гираза), по-видимому, не может выполнять эту функцию из-за неспособности уменьшать число зацеплений в ДНК и, соответственно, разделять две ДНК молекулы [37]. В случае Dam торо III конечным продуктом последовательного раскручивания сс ДНК при высоких температурах должно быть полное разделение комплементарных цепей [37]. Следовательно, Dam торо III является аналогом торо I мезофильных бактерий, и, по-видимому, необходима для рассоединения структур, образующихся в процессе репликации [37].

#### Х. ЭУКАРИОТИЧЕСКАЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА III

Эукариотическая торо III впервые была обнаружена в 1989 году [33]. Ген, кодирующий торо III дрожжей, был идентифицирован по его способности обеспечивать подавление митотической рекомбинации между повторяющимися последовательностями. Белок, кодируемый данным геном, был гомологичен торо I и III *E. coli*, и не имел какого-либо сходства с известными эукариотическими топоизомеразами [33]. По своим биохимическим свойствам фермент напоминал торо III *E. coli*. Белок с большей эффективностью связывал оц ДНК, катализировал рассоединение катенанов и был способен релаксировать только «→» сс ДНК, образуя ковалентную связь с 5'-концом ДНК в участке разрыва [102], но, в отличие от других эукариотических торо I, проявлял довольно слабую релаксирующую активность [33]. Казалось, что отсутствие фермента с такой низкой топоизомеразной активностью не должно было сильно сказываться на развитии клеток, содержащих торо I и II. Однако, клетки дрожжей, лишённые торо III, росли значительно медленнее, имели повышенную способность к рекомбинации и были не способны к спорообразованию [33]. Поэтому считается, что основная роль торо III дрожжей *in vivo* заключается не в способности фермента регулировать топологическое состояние клеточной ДНК, а в расцеплении комплементарных цепей дуплекса после их разделения геликазой [103].

Торо III может функционировать совместно с клеточной теломеразой и оказывать влияние на стабильность теломер [103]. Стабилизация теломер у дрожжей, опосредованная действием торо III, один из примеров того, что различные ДНК-топоизомеразы, помимо их канонической функции, заключающейся в изменении топологии ДНК, играют важную роль в стабилизации клеточного генома. Механизмы, позволяющие топоизомеразам обеспечивать стабильность генома, предотвращая митотическую рекомбинацию, остаются пока неизвестными. Считается, что данные ферменты необходимы для расщепления рекомбинационных интермедиатов, когда цепи ДНК оказываются перекрученными [103]. Процесс рекомбинации, таким образом, может быть прерван действием геликазы, катализирующей разъединение двух неправильно спаренных цепей ДНК [103]. Участие геликаз в уменьшении частоты рекомбинации подтверждается также в работах [104, 105]. Обнаружено, что дрожжевая SGS1 геликаза взаимодействует с торо III [106–107]. Мутация *SGS1* гена приводит к сокращению продолжительности жизни, что фенотипически очень похоже с мутацией гена при синдроме Вернера у человека [106]. Таким образом, торо III функционирует в комплексе с белками SGS1-семейства и может быть необходимой для поддержания стабильности генома и регуляции процессов клеточного старения [106].

Только одна форма торо III была обнаружена в клетках прокариот и низших эукариот [106], в то время как в клетках млекопитающих были обнаружены две изоформы торо III [106, 108]. Ген, кодирующий человеческую торо III $\alpha$  (*hTOP3 $\alpha$* ), гомологичную дрожжевой торо III, расположен на 17p11.2–12 хромосоме [41]. Аналог мышинового фермента, как оказалось, важен на стадии раннего эмбриогенеза [109]. Второй ген, кодирующий человеческую торо III (*hTOP3 $\beta$* ), расположен на 22q11 хромосоме [110]. С данного гена происходит наработка трех альтернативных транскриптов, кодирующих белки, различающиеся в С-концевом участке, который участвует в связывании ДНК [106]. Похожая ситуация наблюдалась и при экспрессии *hTOP3 $\alpha$*  гена [106]. Различный характер экспрессии генов, кодирующих торо III, в результате которого синтезируются различные изоформы белка может указывать на различные физиологические функции этих топоизомераз, особенно учитывая тот факт, что действие торо III $\alpha$  в клетке не может быть заменено торо III $\beta$  ферментом или другими топоизомеразами [106]. Различные формы торо III могут проявлять разную каталитическую активность по отношению к различным ДНК-субстратам. Такой вывод можно сделать, учитывая, что различия ферментов затрагивают именно С-концевой домен. Действительно,

даже небольшие различия в строении данного участка топо I и топо III *E. coli*, приводят к тому, что в значительной степени гомологичные ферменты проявляют разную каталитическую активность [106].

Мышиная топо IIIβ была на 36% гомологична топо IIIα. Фермент релаксировал «–» сс ДНК, причем каталитическая активность повышается при увеличении степени сверхспирализации [108]. Топо IIIβ лишь частично релаксировала сс ДНК при 37°C, полное превращение ДНК происходило при повышенных температурах [108]. Это может указывать на то, что топо IIIβ специфична к оц участкам, которые легко образуются в «–» сс ДНК при высоком уровне сверхспирализации. При частичной релаксации образование оц областей ДНК затруднено, но все-таки, может происходить при повышении температуры за счет локального плавления ДНК-дуплекса.

## XI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Начиная с 70-х годов исследования топоизомераз выявили большое разнообразие этих ферментов в про- и эукариотических клетках. За прошедший период была установлена биологическая функция ферментов разных типов, а также аналогии и различия в их структурах и механизмах действия.

ДНК-топоизомеразы IA-типа разрывают одну из цепей и «протаскивают» другую цепь через образовавшийся разрыв, снимая, таким образом, топологический стресс сверхспирализованной ДНК. Топоизомеразы второго типа образуют двухцепочечный разрыв с использованием энергии АТФ или других нуклеотидов и протягивают участки ДНК через образовавшийся разрыв.

Анализ топоизомераз с помощью различных методов, включая РСА, стационарную и быструю кинетику, сайт-направленный мутагенез и т.д., позволил установить роль отдельных аминокислот непосредственно как в катализе реакций, так и в кооперативных взаимодействиях между различными доменами.

В целом очевидно, что в клетках про- и эукариот есть несколько различных топоизомераз, отличающихся по своей биологической функции. Именно существование большого числа различных топоизомераз обеспечивает необходимое равновесие между релаксированными, слабо и сильно спирализованными формами ДНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wang, J.C. (1996) *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 635–692.
2. Merino, A., Madden, K. R., Lane W. S., Champoux, J. J., Reinberg, D. (1993) *Nature*, **365**, 227–232.
3. Trowbridge, P.W., Roy, R., Simmons, D. T. (1999) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 1686–1694.
4. Zhu, J., Schiestl, R.H. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1805–1812.
5. Shuman, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3489–3493.
6. Pommier, Y., Pourquier, P., Fan, Y., Strumberg, D. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 83–105.
7. Kato, S., Kikuchi, A. (1998) *Nagoya J. Med. Sci.*, **61**, 11–26.
8. Champoux, J.J. (2001) *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 369–413.
9. Wang, J.C. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 430–440.
10. Sharma, A., Mondragon, A. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 39–47.
11. Gupta, M., Fujimori, A., Pommier, Y. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1262**, 1–14.
12. Berger, J. M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 3–18.
13. Viard, T., De la Tour, C.B. (2007) *Biochimie*, **89**, 456–467.
14. Champoux, J.J. (2002) *Trends in Pharmacol. Science*, **23**, 199–201.
15. Corbet, K.D., Berger, J.M. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Struct.*, **33**, 95–118.
16. Leppard, J.B., Champoux J.J. (2005) *Chromosoma*, **114**, 75–85.
17. Champoux, J. J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11998–2000.
18. Wilson, R.J. (2002) *J. Mol. Biol.*, **319**, 257–274.
19. Wang, J.C. (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 523–533.
20. Kirkegaard, K., Wang, J.C. (1985) *J. Mol. Biol.*, **185**, 625–637.
21. Champoux, J.J., Dulbecco R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 143–146.
22. Durnfoed, J.M., Champoux, J.J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 1086–1089.
23. Riou, G.F., Gabillot, M., Douc-Rasy, S., Kayser, A., Barrois, M. (1983) *Eur. J. Biochem.*, **253**, 479–484.
24. Pylleyblank, D.E., Morgan, A.R. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5206–5209.
25. Hsieh, T., Brutlag, D. (1980) *Cell*, **21**, 115–125.
26. Liu, L.F. (1983) *Methods in Enzymol.*, **100**, 133–137.
27. Tanizawa, A., Tabuchi, A., Bertrand, R., Pommier, Y. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25463.
28. Brun, G., Vannier, P., Scovassi, I., Callen, J.-C. (1981) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 407–415.
29. Castora, F.J., Kelly, W.G. (1986) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 1680–1684.
30. Lazarus, G.M., Henrich, J.P., Kelly, W.G., Schmitz, S.A., Castora, F.J. (1987) *Biochemistry*, **26**, 6195–6203.
31. Dean, F., Krasnow, M.A., Otter, R., Matzuk, M.M., Spengler, S.J., Cozzarelli, N. R. (1983) *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.*, **47**, 769–777.
32. Srivenugopal, K.S., Lockshon, D., Morris, D.R. (1984) *Biochemistry*, **23**, 1899–1906.
33. Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R. (1989) *Cell*, **58**, 409–419.
34. Kikuchi, A., Asai, K. (1984) *Nature* **309**, 677–681.
35. Slesarev, A.I., Stetter, K.O., Lake, J.A., Gellert, M., Krah, R., Kozyavkin, S.A. (1993) *Nature*, **364**, 735–737.
36. Slesarev, A.I., Lake, J.A., Stetter, K.O., Gellert, M., Kozyavkin, S.A. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 3295–3303.
37. Slesarev, A.I., Zaitzev, D.A., Kopylov, V. M., Stetter, K.O., Kozyavkin S.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 12321–12328.
38. Sekiguchi, J., Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 29760–29764.

39. Shuman, S., Prescott, J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 17826–17836.
40. Kim, R.A., Wang, J.C. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17178–17185.
41. Hanai, R., Caron, P. R., Wang, J.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3653–3657.
42. Nadal, M., Jaxel, C., Portemer, C., Forterre, P., Mirambeau, G., Duguet, M. (1988) *Biochemistry*, **27**, 9102–9108.
43. Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Nadal, M., Stetter, K.O., Forterre, P., Duguet, M. (1990) *J. Bacteriol.*, **172**, 6803–6808.
44. Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Huber, R., Forterre, P., Duguet, M. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 3921–3923.
45. Slesarev, A.I., Kozyavkin, S.A. (1990) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **7**, 935–942.
46. Confalonieri, F., Elie, C., Nadal, M., de La Tour, C., Forterre, P., Duguet, M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, **90**, 4753–4757.
47. Kovalsky, O.I., Kozyavkin, S.A., Slesarev A.I. (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2801–2805.
48. Li, Z., Hiasa, H., DiGate, R. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5415–5425.
49. Li, Z., Hiasa, H., DiGate, R. (2006) *Mol. Microbiol.*, **60**, 140–151.
50. Stivers, J.T., Shuman, S., Mildvan, A.S. (1994) *Biochemistry*, **33**, 327–339.
51. Stivers, J.T., Shuman, S., Mildvan, A.S. (1994) *Biochemistry*, **33**, 15449–15458.
52. Tse-Dinh, Y.C., Wang, J.C. (1986) *J. Mol. Biol.*, **191**, 321–331.
53. Domanico, P.L., Tse-Dinh, Y.C. (1988) *Biochemistry*, **27**, 6365–6371.
54. Domanico, P.L., Tse-Dinh, Y.C. (1991) *J. Inorg. Biochem.*, **42**, 87–96.
55. Christiansen, K., Knudsen, B. R., Westergaard, O. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 11367–11373.
56. Burgin, A.B., Huizenga, B.N., Nash, H.A. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 2973–2979.
57. Tse-Dinh, Y.C., McCarron, B.G., Arentzen, R., Chowdhry, V. (1983) *Nucleic Acids Res.*, **11**, 8691–8701.
58. Tse-Dinh, Y. C., Beran-Steed, R.K. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 15857–15859.
59. Tse-Dinh, Y.C. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 14317–14320.
60. Tse-Dinh, Y.C., Beran, R. K. (1988) *J. Mol. Biol.*, **202**, 735–742.
61. Zhu, C.X., Tse-Dinh, Y.C. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **33**, 195–204.
62. Zumstein, L., Wang, J.C. (1986) *J. Mol. Biol.*, **191**, 333–340.
63. Lima, C.D., Wang, J.C., Mondragon, A. (1993) *J. Mol. Biol.*, **232**, 1213–1216.
64. Zhu, C.X., Samuel, M., Pound, A., Ahumada, A., Tse-Dinh, Y.C. (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 375–385.
65. Samuel, M., Zhu, C.X., Villanueva, G.B., Tse-Dinh, Y.C. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 302–308.
66. Ahumada, A., Tse-Dinh, Y.C. (2002) *BMC Biochem.*, **3**, 13–14.
67. Lima, C.D., Wang, J.C., Mondragon, A. (1994) *Nature*, **367**, 138–146.
68. Sharma, A., Hanai, R., Mondragon, A. (1994) *Structure*, **2**, 767–777.
69. Lue, N., Sharma, A., Mondragon, A., Wang, J.C. (1995) *Structure*, **3**, 1315–1322.
70. Yu, L., Zhu, C.X., Tse-Dinh, Y.C., Fesik, S.W. (1995) *Biochemistry*, **34**, 7622–7628.
71. Redinbo, M.R., Stewart, L., Kuhn, P., Champoux, J.J., and Hol, W.G. (1998) *Science*, **279**, 1504–1513.
72. Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G., Champoux, J.J. (1998) *Science*, **279**, 1534–1541.
73. Brandeen, C.I. (1980) *Q. Rev. Biophys.*, **13**, 317–338.
74. Hansen, G., Harrenga, A., Wieland, B., Schomburg, D., Reinemer, P. (2006) *J. Mol. Biol.*, **358**, 1328–1340.
75. Caron, P.R., Wang, J.C. (1994) *Adv. Pharmacol.*, **29B**, 271–297.

76. Beese, L.S., Steitz, T.A. (1991) EMBO J., **10**, 25–33.
77. Chen, S.J., Wang, J.C. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 6050–6056.
78. Perry, K., Mondragon, A. (2004) Structure, **12**, 7–9.
79. Changela, A., DiGate, R.J., Mondragon, A. (2001) Nature, **411**, 1077–1081.
80. Cheng, B., Feng, J., Mulay, V., Gadgil, S., Tse-Dinh, Y.C. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 39207–39213.
81. Strahs, D., Zhu, C.X., Cheng, B., Chen, J., Tse-Dinh, Y.C. (2006) Nucleic Acids Res., **34**, 1785–1797.
82. Cheng, B., Feng, J., Gadgil, S., Tse-Dinh, Y.C. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 8648–8654.
83. Brown, P.O., Cozzarelli, N.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 843–847.
84. Tse, Y., Wang, J.C. (1980) Cell, **22**, 269–276.
85. Feinberg, H., Changela, A., Mondragon, A. (1999) Nat. Struct. Biol., **6**, 961–968.
86. Roche, C.J., Tse-Dinh, Y.C. (2001) Int. J. Biol. Macromol., **29**, 175–180.
87. DiGate, R.J., Marians, K.J. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 17924–17930.
88. DiGate, R.J., Marians, K.J. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 13366–13373.
89. Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., Marians, K.J. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 8653–8660.
90. Hiasa, H., DiGate, R.J., Marians, K.J. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 2093–2099.
91. Lopez, C.R., Yang, S., Deibler, R.W., Ray, S.A., Pennington, J.M., Digate, R.J., Hastings, P.J., Rosenberg, S.M., Zechiedrich, E.L. (2005) Mol. Microbiol., **58**, 80–101.
92. Stupina, V.A., Wang, J.C. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 355–360.
93. Zhang, H.L., Malpure, S., and DiGate, R.J. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 23700–23705.
94. DiGate, R.J., Marians, K.J. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 20532–20535.
95. Zhang, H.L., DiGate, R.J. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 9052–9059.
96. Beran-Steed, R.K., Tse-Dinh, Y.C. (1989) Proteins, **6**, 249–258.
97. Mondragon, A., DiGate, R. (1999) Structure Fold Des., **7**, 1373–1383.
98. Li, Z., Mondragon, A., Hiasa, H., Marians, K.J., DiGate, R.J. (2000) Mol. Microbiol., **35**, 888–895.
99. Krah, R., O'Dea, M. H., Gellert, M. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 13986–13990.
100. Shibata, T., Nakasu, S., Yasui, K., Kikuchi, A. (1987) J. Biol. Chem., **262**, 10419–10421.
101. Declais, A.C., Marsault, J., Confalonieri, F., de La Tour, C. B., Duguet, M. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 19498–19504.
102. Gangloff, S., de Massy, B., Arthur, L., Rothstein, R., Fabre, F. (1999) EMBO J., **18**, 1701–1711.
103. Kim, R.A., Caron, P.R., Wang, J.C. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 2667–2671.
104. Kodadek, T. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 9712–9718.
105. Morel, P., Hejna, J.A., Ehrlich, S.D., Cassuto, E. (1993) Nucleic Acids Res., **21**, 3205–3209.
106. Ng, S.W., Liu, Y., Hasselblatt, K.T., Mok, S.C., Berkowitz, R.S. (1999) Nucleic Acids Res., **27**, 993–1000.
107. Bennett, R. J., Noirot-Gros, M. F., Wang, J.C. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 26898–26905.
108. Seki, T., Seki, M., Onodera, R., Katada, T., Enomoto, T. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 28553–28556.
109. Li, W., Wang, J.C. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 1010–1013.
110. Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Schmeits, J.L., Wang, J., Shimizu, N. (1997) Genome Res., **7**, 250–261.