

УДК 577.152.3

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗ IV-ТИПА

© 2010 г. Д. В. Бугреев*, Г. А. Невинский*,**#

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, Лаврентьева, 8;

**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Поступила в редакцию 30.03.2009 г. Принята к печати 20.04.2009 г.

ДНК-топоизомеразы, отвечающие за регуляцию уровня суперспирализации геномной ДНК, участвуют практически во всех жизненно важных процессах клетки, таких, как репликация, транскрипция, рекомбинация, и являются необходимыми для нормального функционирования клеток. В обзоре обобщены литературные данные по ДНК-топоизомеразам IV-типа. Проанализированы результаты, касающиеся термодинамических, структурных и кинетических аспектов функционирования топоизомераз и особенностей их механизма действия.

Ключевые слова: ДНК-топоизомераза, белково-нуклеиновые взаимодействия, механизмы действия ферментов.

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 освещены ранее в ряде монографий и обзоров [1–9]. Ферменты, которые изменяют и регулируют топологическое состояние клеточной ДНК, называются ДНК-топоизомеразами. Они принимают участие практически во всех жизненно важных процессах клетки и обнаружены у всех про- и эукариот, а также у некоторых вирусов. Топоизомеразы катализируют реакцию релаксации ДНК, введение в ДНК отрицательных и положительных супервитков, а также могут осуществлять реакции сцеplения, расщепления и способствовать ренатурации комплементарных колец одноцепочечных молекул ДНК. Функции некоторых топоизомераз, включая причины множественности этих ферментов в клетках про- и эукариот, рассмотрены в ряде обзоров [1, 2, 9–16]. Большое внимание в литературе уделяется вопросу о специфических ингибиторах топоизомераз, которые являются или могут стать лекарственными препаратами при лечении различных форм раковых заболеваний [17–22]. Бактериальные топоизомеразы иногда могут быть мишенями при лечении инфекционных болезней [23, 24].

Топоизомеразы подразделяют на два основных типа (или класса) в соответствии с механизмом их действия:

Сокращения: АК – аминокислота; дцДНК, оцДНК и ссДНК – двухцепочечная, одноцепочечная и суперскрученная ДНК; РСА – рентгеноструктурный анализ; topo – ДНК-топоизомераза I.

#Автор для связи (тел.: (383) 335-62-26; эл. почта: nevinisky@niboch.nsc.ru).

1. Ферменты типа I временно расщепляют только одну цепь ДНК и не требуют присутствия кофакторов, богатых энергией, типа АТР.
2. Ферменты типа II производят временный двухцепочечный разрыв, гидролизуя АТР [1].

Существующая в настоящее время классификация топоизомераз I-го типа рассмотрена в обзоре [13]. Сначала на основании различий биохимических свойств эукариотические и прокариотические топоизомеразы I-го типа были разделены на две группы согласно источнику их происхождения. Однако открытие новых топоизомераз I-го типа и изучение их свойств показало, что классификация ферментов по источнику происхождения не совсем адекватно отражает существующую ситуацию, поэтому было предложено [13] разделять топоизомеразы I-го типа, исходя из их первичной структуры.

Подкласс IA-топоизомераз включает топо I *E. coli* и похожие на нее по структуре и функциям топоизомеразы III, DAM топо III и обратную гиразу прокариот, а также топо III эукариот [9]. Особенности структуры и функции этих ферментов рассмотрены в обзоре [13].

Подкласс IB ДНК-топоизомераз включает в себя эукариотические топо I, а также топоизомеразы, кодируемые поксвирусами, такими, как вирус оспы. Наличие у прокариот топоизомеразы, соответствующей по структуре ферменту IB-подкласса, было установлено на примере топо V из *Methanopyrus kandleri* [25]. По биохимическим свойствам этот фермент также больше похож на топоизомеразы IB-, чем IA-подкласса: он релаксирует как отрицательно «-», так и положительно «+» закрученную ссДНК и при расщеплении образует ковалентную связь с 3'-концом расщепляемой цепи ДНК [25].

Реакция релаксации, катализируемая топоизомеразами IB-типа, инициируется нуклеофильной атакой фосфодиэфирной связи ДНК остатком тирозина, расположенным в активном центре фермента [13]. Энергия разрываемой связи сохраняется за счет вновь образуемой фосфотирозиновой связи между ферментом и 3'-концевым фосфатом расщепленной цепи ДНК, что, в конечном итоге, облегчает протекание реакции религирования. Релаксация ДНК происходит за счет вращения части дуплекса, расположенного в 3'-концевой зоне ДНК от сайта расщепления, вокруг одной или нескольких связей нерасщепленной цепи. Поскольку во время релаксации происходит взаимодействие вращающейся ДНК с определенными участками фермента, данный механизм релаксации был назван «контролируемым вращением» [26]. Религирование ДНК осуществляется в результате атаки фосфотирозиновой связи 5'-гидроксильной группой расщепленной цепи ДНК. После удаления разрыва фермент может провести еще один каталитический цикл или диссоциировать с релаксированной ДНК [27]. В

отличие от ферментов IA-подкласса, торо IB могут релаксировать как «-», так и «+»-ссДНК в отсутствие кофакторов типа АТР или ионов металлов, в то же время ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} способны стимулировать эффективность релаксирующей активности этих ферментов [27].

В данном обзоре впервые представлены обобщенные данные о топоизомеразах типа IB и механизмах их функционирования с учетом информации, полученной методами рентгеноструктурного, кинетического и термодинамического анализа.

Топоизомераза IB вируса оспы

Торо IB вируса оспы – самая маленькая из известных топоизомераз: она состоит из 314 а.о. Считается, что торо I вируса оспы имеет тороидальную форму и ДНК связывается в центральной части внутренней полости так, что фермент как бы оборачивается вокруг ДНК [28]. При связывании фермента со специфической последовательностью (5' –С/ТССТТ –, стрелкой показана точка расщепления) в составе ДНК-дуплекса [29] топоизомераза образует контакты с четырьмя межнуклеотидными фосфатными группами расщепляемой цепи, включая фосфат расщепляемой фосфодиэфирной связи, а также контактирует с тремя межнуклеозидными фосфатными группами нерасщепляемой цепи. В отличие от эукариотической торо I, данный фермент не образует контактов с 5'-участком ДНК относительно «точки» расщепления [28]. Элементы расщепляемой фосфодиэфирной связи, а также шести межнуклеозидных фосфатных групп, которые образуют контакты с торо I вируса, располагаются в малой бороздке СССТТ-специфической последовательности ДНК [30]. Удаление оснований из нуклеотидных звеньев вблизи точки разрыва в расщепляемой и нерасщепляемой цепях ДНК в основном приводит к существенному понижению скорости ее расщепления, хотя эффект зависит от положения этих звеньев [31]. Торо I вируса оспы катализирует разрыв и воссоединение цепей в СССТТ/N-специфических участках узнавания на противоположных сторонах “перекрестка”, образованного двумя молекулами двухцепочечных ДНК, содержащих четыре цепи одноцепочечных ДНК [32].

Торо I вируса оспы состоит из трех доменов, разделенных двумя пептидными участками, чувствительными к действию протеиназ (рис. 1а) [33]. N-Концевой домен торо I (АК-остатки с 1 по 80) не является строго необходимым для обеспечения каталитического действия фермента [34]. Каталитический домен, состоящий из 234 а.о. (с 81 по 314) и включающий в себя каталитический остаток Тут274, а также четыре консервативных АК-остатка активного центра (Arg130, Lys167, Arg223 и His265), проявляет те же самые свойства, что и полный фермент. Он релаксирует ссДНК,

катализируя реакцию сайт-специфической трансэтерификации, и, таким образом, является минимальным функциональным фрагментом топоизомераз IB-подкласса [34].

Удаление N-концевого домена практически не влияет на реакцию религирования, катализируемую ферментом, в то время как скорость реакции расщепления уменьшается в $10^{3.6}$ раз [34]. Данный фрагмент может принимать участие в конформационных изменениях, предшествующих химическим превращениям, происходящим после первоначального связывания ДНК [34]. Действительно, определенные АК-остатки N-концевого домена фермента образуют контакты с ДНК в большой бороздке [35]. Считается, что два остатка тирозина (Tyr70 и Tyr72), участвующие в таком взаимодействии, важны для конформационных перестроек, приводящих к активации реакции расщепления ДНК [34]. Шарнирный участок каталитического домена может способствовать таким перестройкам, поскольку связывание ДНК существенно влияет на устойчивость данного фрагмента к действию протеиназ, а замена двух АК-остатков (Gly132 и Tyr136), входящих в состав шарнирного участка, на аланин приводит к уменьшению скорости расщепления ДНК на два порядка. В то же время эти модификации фермента практически не влияют на стадию религирования ДНК [36]. Таким образом, конформационные перестройки, происходящие при участии N-концевого и шарнирного участков могут обеспечить правильную ориентацию АК-остатков активного центра топоизомераз по отношению к расщепляемой фосфодиэфирной связи ДНК [34].

Проведена замена Tyr274 в активном центре на его аналоги и показано, что торо, сохраняющие *пара*-положение ОН-группы в аналоге Tyr каталитически активны [37]. Изменение положения ОН-группы в ароматическом кольце или ее замена на NH_2 -, SH -или I-группы приводит к исчезновению каталитической функции фермента.

При изучении роли определенных остатков лизина топоизомеразы вируса оспы было обнаружено, что остатки Lys35, Lys85, два из трех остатков Lys133/135/138, Lys213, Lys249 и/или Lys250, а также Lys271 могут участвовать в связывании ДНК [38]. Было проанализировано влияние 22 аминокислотных замен на активность торо [39]. Установлено, что Ala14 важен для контактов торо с ДНК, в то время как замена остатков Ala168 и Ala124 приводит к ускорению разрыва ДНК. Показано, что Asp168 является ключевым регулятором оптимального баланса между реакциями гидролиза, религирования ДНК и освобождения продукта реакции. Кроме того, обнаружено, что Arg223 ускоряет реакцию трансэтерификации и важен для «правильного» электростатического состояния активного центра при образовании переходного состояния реакции [40].

Кинетические аспекты реакции, осуществляемой топо I вируса оспы, хорошо изучены [41] и в определенной степени могут быть применимы при рассмотрении катализа в случае других топоизомераз IB-подкласса. Скорость реакции религирования ДНК, определенная для 25-звенного олигонуклеотида, практически в 10 раз превышает скорость реакции расщепления ($k_r = 0.66 \text{ c}^{-1}$, $k_{cl} = 0.07 \text{ c}^{-1}$), что указывает на сдвиг равновесия в сторону образования комплекса фермента с нерасщепленным ДНК-субстратом. Фермент увеличивает скорость расщепления и религирования ДНК в $\sim 10^9$ и 10^{12} раз, соответственно, по сравнению с аналогичными реакциями, протекающими в растворе в отсутствие фермента [41]. Скорость расщепления межнуклеотидной связи в рацемической смеси тиофосфатных производных ДНК уменьшалась для двух стереоизомеров в 4.6 и 25 раз, соответственно. При этом первая цифра согласуется с понижением в 4–10 раз реакционной способности неферментативного нуклеофильного замещения фосфатной группы в 2,4-динитрофенилфосфате на группы с различными кислород- и азотсодержащими нуклеофилами (4–11 раз) при замене фосфата в этом соединении на тиофосфатную группу. Это может указывать на отсутствие каких-либо конформационных изменений одного из олигонуклеотидных тиофосфатных диастереомеров перед стадией расщепления [41].

В то же время понижение реакционной способности другого диастереомера в 25 раз все же не указывает на существенную стереоспецифичность топоизомеразы, в отличие, например, от фосфодиэстеразы змеиного яда и рибозимов из *Tetrahymena*, для которых в аналогичном случае происходит понижение скорости реакции в 500–1000 раз [41].

Поскольку топо I вируса оспы не связывает ионы металла, наблюдаемое в присутствии 5 мМ MgCl_2 увеличение скорости реакции примерно на порядок [41] может происходить за счет связывания ионов металла с ДНК. Авторы работы [41] считают, что фиксация расщепляемой межнуклеозидной фосфатной группы в активном центре фермента осуществляется не за счет специфического связывания с ионом Mg^{2+} , а за счет взаимодействия олигонуклеотида с положительно заряженным АК-остатком фермента. При этом один из тиоизомеров, скорее всего, имеет оптимальное расположение расщепляемой фосфодиэфирной связи относительно атакующей нуклеофильной группы топоизомеразы. Замена кислорода на серу не влияла на протекание реакции религирования. Таким образом, данная стадия реакции лимитируется происходящими в активном центре конформационными изменениями (рис. 16), а скорость реакции расщепления ДНК лимитируется скоростью разрыва и образования связей фермента с ДНК [41, 42].

Колоколообразная зависимость скорости реакции расщепления, катализируемой топо I вируса оспы, от pH раствора указывает на наличие двух АК-остатков фермента, протонируемых при pH от 4.6 до 9.7 [42]. Причем для обеспечения максимальной активности топоизомеразы одна из этих групп должна быть депротонирована (pK_a 6.3), а другая протонирована (pK_a 8.4) [42]. Такая зависимость подразумевает осуществление ферментом кислотно-основного катализа, при котором АК-группа с pK_a 6.3 выполняет роль основания, увеличивая нуклеофильность остатка Туг274, а вторая с pK_a 8.4 – роль кислоты, протонирующей уходящую 5'-НО-группу. Обратная реакция также протекает в соответствии с кислотно-основным катализом. Считается, что 6 из 9–12 порядков ускорения реакции, катализируемой топо, обеспечиваются за счет кислотно-основного катализа и 4.3–5.0 порядков – за счет стабилизации переходного состояния при взаимодействии расщепляемой фосфодиэфирной группы ДНК с Arg130 белка [42].

Консервативный остаток Arg130 не участвует в связывании ДНК на начальных стадиях ее узнавания ферментом, но может взаимодействовать с межнуклеотидной фосфатной группой на стадии катализа [42]. Остаток Arg223, который тоже является весьма консервативным, также может принимать участие в стабилизации переходного состояния, поскольку показано, что при заменах R223G, R223E и R223Q происходит существенное уменьшение как расщепляющей, так и релаксирующей активностей фермента [42]. В то же время указанные модификации фермента практически не влияют на связывание топо с ДНК [43, 44]. При этом R223K-мутант сохранял прежнюю активность, что указывает на необходимость наличия положительно заряженной группы в этой области активного центра топо [44].

Константы скорости расщепления и религирирования ссДНК существенно выше, чем для олигонуклеотидов ($k_{cl} = 0.3$, $k_r = 4 \text{ с}^{-1}$ соответственно), однако константы диссоциации для этих субстратов практически совпадают [45]. Топозависимая релаксация ссДНК происходит по механизму «свободного вращения»; ДНК вращается со скоростью примерно 20 об/с и за один каталитический акт происходит сброс примерно пяти супервитков ссДНК [45].

Эукариотические ДНК-топоизомеразы I

Группа эукариотических ДНК-топоизомераз IB-подтипа довольно разнообразна по относительной молекулярной массе и включает несколько ферментов, содержащих от 765 до 1019 а.о. [34]. Несмотря на это, нужно отметить, что эукариотические топо IB, даже из эволюционно отдаленных видов, достаточно гомологичны. При сравнении АК-последовательностей топо I человека, дрожжей и *Drosophila melanogaster* показано [26],

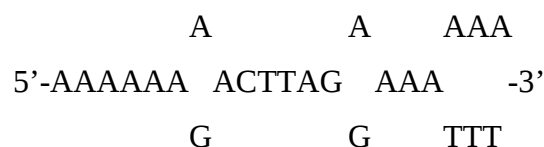
что основные различия затрагивают *N*-концевой участок ферментов, который, по некоторым данным, не участвует в связывании и каталитическом превращении ссДНК. В то же время домены, участвующие в узнавании ДНК и содержащие каталитически активный остаток тирозина, проявляют значительную степень гомологии, что и определяет общность биохимических характеристик белков данной группы. Также необходимо отметить, что в случае млекопитающих гомология ферментов может превышать 90%.

Исследование эукариотической топо I в значительной степени стимулировалось тем, что данный фермент является мишенью для ряда антираковых препаратов [46], поэтому наиболее хорошо изучена на настоящий момент топо I человека.

Эукариотическая топо I связывает дцДНК [47] и “покрывает” область в 20 п.о. [48]. В отличие от прокариотического фермента, белок способен катализировать релаксацию как «-», так и «+»-ссДНК, образуя в ходе реакции ковалентную связь с 3'-фосфатной группой ДНК в сайте расщепления. Расщепление различных последовательностей ДНК топо I происходит с разной эффективностью [48–50]. Были предприняты попытки установить оптимальную для расщепления структуру и последовательность ДНК [51, 52]. Эукариотическая топо I предпочтительнее связывает ссДНК, чем ее релаксированную форму [53–56]. Считается, что повышенное сродство фермента к ссДНК обеспечивается ее структурными особенностями, которые связаны с топологическим напряжением ДНК [54–56]. Поскольку положительная и отрицательная суперспирализации противоположным образом влияют на параметры спирали ДНК (в случае «-»-ссДНК дуплекс недокручен, а в случае «+»-ссДНК – перекручен), способность фермента примерно с одинаковой эффективностью релаксировать «+»- и «-»-супервитки [57] указывает на то, что большее влияние на узнавание топологического состояния оказывает наличие изогнутости в ДНК, а не степень скрученности ДНК-дуплекса. Топо I способна различать топологические изомеры, отличающиеся всего на одно «зацепление» [54–56], что весьма неожиданно, поскольку разница в свободной энергии таких незначительно различающихся топоизомеров мала [58, 59].

Предпочтительное связывание ссДНК эукариотической топо I объясняется способностью фермента более эффективно связывать фрагменты ДНК, содержащие участки изогнутости (curvature) [52, 60], или два отдельных ДНК-сегмента одновременно [57, 61]. Предположение о связывании с двумя отдельными ДНК-сегментами основано на результатах, полученных электронной микроскопией, указывающих на взаимодействие топо I с дуплексом в участках пересечения цепей ДНК [61].

Оптимальная последовательность, необходимая для связывания и расщепления ДНК эукариотической топо I, определялась из сравнительного анализа различных сайтов ДНК, расщепляемых ферментом [62, 63]. Такие участки довольно часто встречаются в ДНК, и топоизомераза не проявляет абсолютной специфичности по отношению к узнаваемой последовательности. Однако, несмотря на это, существуют участки, более эффективно расщепляемые белком. Так ДНК-мотив:



прочно ассоциирован с топоизомеразой I *in vivo* [64–66] и с высоким сродством связывается с ферментом *in vitro*. Скорость реакции расщепления в таких участках в среднем примерно на три порядка превышает таковые в случае других последовательностей ДНК, расщепляемых топо I [67, 68].

Согласно данным нуклеазного расщепления и химического футпринтинга, эукариотическая топо I защищает от гидролиза обе цепи связанной ДНК на участке длиной 15–19 нуклеотидов, при этом сайт расщепления расположен примерно в центре защищаемого фрагмента ДНК [69].

Для расщепления ДНК необходимо взаимодействие топо I с двумя участками дуплекса. Как показано ниже, первый расположен в 5'-концевой части расщепляемой ссДНК (участок А) и второй (3'-концевой) предназначен для связывания цепи, содержащей 5'-гидроксильный конец ДНК после ее расщепления (участок В; участки А и В подчеркнуты на схеме) [70] (схема).

Минимальная длина участка ссДНК, необходимого для ее узнавания и протекания реакции расщепления, составляет 9 и 5 оснований на расщепляемой и нерасщепляемой цепях, соответственно [71] (обозначены на последовательности жирным шрифтом). Были определены участки последовательности, оказывающие наибольшее влияние на эффективность образования комплекса ДНК с ферментом [60, 69, 72, 73], а также основания, необходимые для каталитического расщепления и религирования ДНК [71, 74].

В расщепляемой цепи первое основание от 5'-конца сайта расщепления (–1-основание) всегда пиримидин (чаще всего Thy) [62, 63], но удаление данного основания (замена в ДНК-субстрате нуклеотидного на сахарофосфатное звено) слабо влияет на протекание реакции расщепления [69]. Удаление оснований в положениях с –2 по –7 приводит к полному ингибированию реакции [69]. Отсутствие других оснований в расщепляемой или нерасщепляемой цепях в некоторых случаях приводит к частичному

ингибированию расщепления либо даже к слабому увеличению активности фермента [69].

Активность топо I зависит от метилирования остатков цитозина в последовательностях ДНК. Реакция расщепления стимулируется при метилировании цитозина в -4-м положении и полностью ингибируется при метилировании -3-го основания [75]. Считается, что эффект ингибирования связан с наличием в большой бороздке ДНК метильных групп, которые могут мешать взаимодействию фермента с лигандом. Введение тимина в -3-е положение вместо канонического цитидина также ингибирует реакцию расщепления, при этом урацил в этом положении не оказывает влияния на скорость реакции [75].

Был проведен компьютерный анализ структурных особенностей последовательностей ДНК, гидролизующих топо человека [76], с помощью метода, предложенного Ощепковым с соавт. [77], основанного на рассмотрении конформационных и физико-химических характеристик структурных единиц ДНК-спирали и дающего детальную информацию о структурном подобию или различиях определенных участков ДНК. Обнаружен ряд общих особенностей конформации исследованных последовательностей ДНК для участка, расположенного непосредственно в районе сайта расщепления. Близкие значения обнаружены для таких структурных характеристик, как угол наклона оснований, сдвиг пары оснований, угол поворота спирали и шаг спирали, а также параметра, характеризующего наличие в малой бороздке стерически невыгодных контактов между атомами N3, NH₂-группы остатков гуанина и N3 остатков аденина, что соответствует наличию в сайте расщепления последовательностей пурин-пурин. Кроме того, в районе сайта гидролиза всех рассмотренных последовательностей, расщепляемых топо, наблюдается заметное понижение температуры плавления дуплекса, что может быть необходимым для облегчения образования изгибов и изломов в ДНК. Таким образом, очевидно, что последовательности, расщепляемые топо, имеют много общих структурных свойств, которые должны определять оптимальное изменение конформации расщепляемой последовательности ДНК после ее связывания с ферментом и возрастание скорости реакции топоизомеризации при наличии в ДНК торсионного стресса.

В целом показано, что стадия комплексообразования может вносить небольшой вклад в специфичность действия топо I эукариот. Модификации последовательностей ДНК в основном влияют на эффективность ферментзависимых конформационных перестроек ДНК, ведущих в случае специфических последовательностей к сближению

реагирующих орбиталей атомов, участвующих в катализе со стороны фермента и ДНК, что приводит к резкому возрастанию скорости реакции [78].

Особенности ДНК-топоизомеразы I человека

Человеческая топо I – односубъединичный белок, состоящий из 765 а.о. [79]. Фермент состоит из четырех основных доменов (рис. 1б): N-концевой и коровый домены, линкерный участок и C-концевой домен [80]. Неконсервативный N-концевой домен (~ 210 а.о.) сильно заряжен и содержит небольшое количество гидрофобных АК-остатков [80]. Он включает ряд сигнальных пептидов [81] и ответствен за локализацию фермента в ядре, опосредованную взаимодействием с нуклеолином [82]. Ранее считалось, что данный домен не важен для проявления активности топо I, поскольку фермент, лишенный N-концевого участка, также обладал топоизомеразной активностью [81]. В то же время последние данные указывают на то, что АК-остатки N-концевого домена могут оказывать влияние как на связывание ДНК ферментом, так и на каталитическую стадию, а также реакцию релаксации [83]. Хотя все сигнальные последовательности, ответственные за локализацию фермента в ядре (NLS – nuclear localization signal), играют одну и ту же роль (необходимы для транспорта белка в ядро), их состав и протяженность могут варьировать от коротких белковых мотивов до больших белковых доменов [84]. Классические белковые мотивы такого рода содержат большое число основных АК-остатков и представлены хорошо известным NLS-мотивом Т-антигена вируса SV40 [84]. При сравнении последовательностей таких консервативных участков с N-концевым доменом топо I обнаружено четыре предполагаемых NLS-мотива с большим содержанием остатков лизина [84]. Первый из них, NLS-I, включает в себя АК-остатки с 59 по 65, остальные расположены ближе к коровому домену (NLS-II: АК 150–156, NLS-III: АК 174–180 и NLS-IV: АК 192–198) (рис. 1б). Показано, что только NLS-II ответствен за транспорт фермента в ядро [84], а NLS-IV важен для локализации топо I в ядре. Кроме того, обнаружен новый NLS, расположенный в области АК-остатков с 117 по 156, который также необходим для транспорта, но, в отличие от классических мотивов, содержит большое число отрицательно заряженных АК [84]. Это может указывать на существование дополнительных механизмов, обеспечивающих «доставку» топо I в ядро.

В отличие от ядерной топо I, N-концевой домен митохондриальной топоизомеразы человека вместо описанных NLS-мотивов содержит АК-последовательности, ответственные за доставку фермента в митохондрии [85]. Гены митохондриальной и ядерной топо I имеют высокую степень гомологии, однако митохондриальная топо I немного короче, она содержит только 601 а.о. Кроме того, этот фермент проявляет

максимальную активность в присутствии ионов Ca^{2+} или Mg^{2+} и при более щелочных значениях pH [85].

C-Концевой участок торо I человека (713–765 а.о.) содержит Туг723, который, гидролизуя ДНК, образует фосфоэфирную связь с 3'-концевым фосфатом расщепляемой цепи [86]. Проведена замена Туг723 в активном центре фермента на аналоги тирозина и показано, что человеческие топоизомеразы первого типа, содержащие различные аналоги Туг с фенольной ОН-группой в *пара*-положении каталитически активны [87]. В то же время перемещение ОН-группы в разные положения ароматического кольца или ее замена на NH_2 -, SH - или I-группы приводит к исчезновению катализа реакции топоизомеризации.

C-Концевой домен вместе с коровым доменом (субдомены I, II и III, участок 200–635), содержащим АК-остатки, формирующие ДНК-связывающий и активный центры фермента, способен обеспечивать практически полную ферментативную активность торо I [88]. Линкерный участок (АК 636–712), соединяющий коровый и C-концевой домены, скорее всего, не нужен для проявления активности торо I [88], но считается, что он принимает участие в процессе релаксации *сс*ДНК [26], а также на стадиях связывания ДНК и катализа [78].

Недавно получены данные РСА торо I человека в комплексе с ДНК [26, 89]. РСА проведен в двух вариантах: для фермента, состоящего из корового и C-концевого доменов (торо-64) [89], и для фермента, содержащего (помимо указанных фрагментов) еще и линкерный участок (торо-70) [26]. Неполный фермент торо-64 состоит из четырех субдоменов и может существовать в закрытой и открытой конформациях, показанных на левой и правой частях рис. 2а, соответственно. В «закрытой» конформации фермент образует белковую глобулу, содержащую в центральной части ДНК-связывающую «полость» диаметром 15–20 Å (рис. 2а); в этой конформации субдомены способны образовывать кольцо вокруг ДНК. Субдомены I, II и III вместе составляют коровый домен, который прочно ассоциирован с C-концевым доменом, образуя неполный фермент, активность которого близка к активности полного фермента [88]. Субдомен I включает в себя АК-остатки с 215 по 232 и с 320 по 433, и состоит из двух α -спиралей и девяти β -цепей. Субдомен II включает АК 233–319, представляющие собой пять α -спиралей и две β -цепи, и вместе с субдоменом I образует верхнюю половину белковой глобулы (рис. 2а). Эти субдомены по структуре имеют сходство с 26-кДа фрагментом топоизомеразы I из дрожжей [90], обладающей 53%-ной идентичностью по АК-составу с данными фрагментами фермента человека.

Субдомен III (АК 424–635) состоит из 10 α -спиралей и 3 β -цепей и содержит все АК-остатки активного центра за исключением Туг723. Данный участок образует нижнюю половину белковой глобулы и функционирует как шарнир, важный для образования открытой и закрытой форм фермента (рис. 3). В закрытой конформации субдомены I и III образуют контакты за счет трех АК-остатков от каждого субдомена и одного солевого мостика. Коровий домен фермента плотно контактирует с С-концевым доменом, в первую очередь, за счет контактов трех α -спиралей субдомена III [89]. Прочность контакта обеспечивается гидрофобными взаимодействиями за счет содержащихся в этом участке 11 неполярных АК-остатков.

Структура неполного фермента (торо-70) (рис. 2б) также дополнительно стабилизируется пятью специфическими водородными связями и тремя солевыми мостиками. С-Концевой домен содержит АК-остатки с 713 по 765 и состоит из пяти коротких α -спиралей и содержит каталитический остаток Туг723. Центральная полость торо содержит большое число заряженных АК-остатков: 15 Lys и 8 Arg, обеспечивающих высокий положительный электрический потенциал внутренней полости торо I. АК, участвующие в катализе, включая Туг723, также контактируют с положительно заряженной полостью. Существует значительное структурное сходство между некоторыми субдоменами торо I и другими ДНК-связывающими белками [91, 92].

Взаимодействие ДНК-топоизомеразы I с ДНК

Механизм узнавания ДНК торо I мыши и человека был детально изучен методом последовательного усложнения структуры лиганда, позволяющего выявить важность разных факторов белково-нуклеиновых взаимодействий и оценить относительный вклад каждого отдельного нуклеотидного звена в общее сродство ДНК к ферменту [93–95]. Показано, что оба фермента взаимодействуют с 10 нуклеотидными звеньями ДНК, находящимися в пределах основного ДНК-узнающего центра, но, кроме того, они могут взаимодействовать и с дополнительными звеньями, фланкирующими двухцепочечный декануклеотид, находящимися вне основной ДНК-узнающей полости торо I [95, 96]. Несмотря на то что эти торо I являются сиквенс-специфическими ферментами, они способны с достаточно высокой эффективностью связывать любые олигонуклеотиды [95–99]. В отличие от фермента мыши, торо I из плаценты человека имеет аномально высокое сродство к коротким олигонуклеотидам $d(pN)_{2-6}$, но эти же короткие последовательности олигонуклеотидов в составе более длинных лигандов, например декануклеотидов, имеют близкое сродство к торо I как мыши, так и человека [96, 97].

Взаимодействие человеческой и мышинной топо I с отдельными звеньями в составе неспецифических $d(pN)_{10}$ описывается близкими алгоритмами [96, 97]:

$$K_d[d(pN)_n] = K_d[(P_i)] \cdot [f]^{-n} = K_d[(P_i)] \cdot (e)^{1-n} \cdot (h_C)^{-c} \cdot (h_T)^{-t} \cdot (h_G)^{-g} \cdot (h_A)^{-a} \quad (n = 10),$$

где $K_d[(P_i)] = 0.36-0.38$ М – константа диссоциации, отражающая эффективность взаимодействия топо с одной из межнуклеозидных фосфатных групп одноцепочечной $d(pN)_{10}$, которая имеет повышенное сродство к ферменту, e и h_N – электростатический и гидрофобный факторы соответственно (эти факторы слабо отличаются для топо мыши и человека); c, t, g и a – число С, Т, G и А оснований в составе $d(pN)_{10}$.

Каждая из 9 межнуклеозидных фосфатных групп увеличивает сродство $d(pN)_{10}$ в ~1.6 раза (фактор e). Электростатический фактор e ($K_d = 1/e$) отражает повышение сродства $d(pN)_{10}$ за счет образования слабых аддитивных электростатических и/или водородных связей фермента с одной из 9-ти отрицательно заряженных фосфатных групп $d(pN)_n$. Величины ΔG^0 (≈ -0.3 ккал/моль), характеризующие взаимодействия межнуклеотидных фосфатных групп ДНК с обеими топоизомеразами, достаточно малы и сравнимы с таковыми для слабых диполь-дипольных и ион-дипольных взаимодействий. Это может свидетельствовать в пользу взаимодействия обеих топо с неспецифическими ДНК по типу взаимодействия не непосредственно контактирующих групп, а противоположно заряженных поверхностей биополимеров [96–99].

Топо мыши и человека образуют сравнимые по силе слабые аддитивные гидрофобные и/или Ван-дер-Ваальсовы контакты с основаниями $d(pN)_{10}$, которые характеризуются “гидрофобным” фактором h_N ($K_d = 1/h_N$). При взаимодействии с неспецифическими $d(pN)_{10}$ сродство топо практически не зависит от их последовательности и определяется общим числом оснований С, Т, G и А. Возрастание сродства топо к $d(pN)_{10}$ за счет гидрофобных взаимодействий с разными основаниями определяется факторами h_N : факторы h_N для топо мыши равны: С (1.02), Т (1.16), G (1.27) и А (1.40). Величины факторов h_N коррелируют с относительной гидрофобностью оснований: $C < T < G < A$. Образование большого числа слабых аддитивных взаимодействий топо с различными структурными элементами неспецифических $d(pN)_n$ обеспечивает достаточно высокое сродство таких лигандов к этим ферментам, например, K_d для $d(pA)_{10} = 8.5 \cdot 10^{-5}$ М (топо мыши) [96, 97].

Образование двухцепочечных структур ведет к уменьшению доступности оснований ДНК для их взаимодействия с АК-остатками фермента и поэтому на уровне двухцепочечных олигонуклеотидов гидрофобные и/или Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия топо с основаниями ДНК практически не реализуются. Уменьшение эффективности взаимодействий топо с основаниями при переходе от одноцепочечных к

двухцепочечным $d(pN)_{10}$ в некоторой степени компенсируется образованием прочных контактов фермента со второй цепью ДНК и увеличением сродства первой цепи к торо за счет комплементарных взаимодействий между цепями. В целом это ведет к повышению сродства двухцепочечной ДНК по сравнению с одноцепочечной в ~ 10 раз [96, 97]. Вклад слабых аддитивных взаимодействий межукулеотидных фосфатных групп каждой из цепей неспецифической двухцепочечной ДНК в сродство фермента к дуплексу сопоставим [96, 97], что согласуется с данными РСА о сопоставимом числе контактов торо с каждой из двух комплементарных цепей ДНК [26, 89]. Сродство торо к двухцепочечному $d(pN)_{10}$ в хорошем приближении описывается алгоритмом: $K_d[d(pN)_n] = K_d[(P_i)] \cdot (e)^{1-2n} = K_d[(P_i)] \cdot (1.67)^{1-2n}$, где n – число пар оснований в составе дуплекса.

При переходе от неспецифических к специфическим одно- и двухцепочечным $d(pN)_n$ сродство фермента к этим лигандам существенно возрастает [96–99]. Из сравнения величин K_d для одно- и двухцепочечных специфических $d(pN)_n$ различной длины ($n = 1-10$), соответствующих различным участкам расщепляемой и комплементарной ей цепи, оценены величины K_d , характеризующие прочность контактов торо мыши и человека с отдельными структурными элементами специфической последовательности. Взаимодействие ферментов со специфической ДНК описано с помощью термодинамической модели (рис. 4) [97]. Наиболее прочные контакты торо образуют с расщепляемой цепью ДНК, причем основной вклад в сродство обеспечивается $[-2(T), -1(T)]$ -звеньями сайта расщепления, а также $[-5(G), -4(A)]$ -динуклеотидом, удаленным от активного центра [97]. Результаты термодинамического анализа хорошо согласуются с данными РСА [26, 89].

Единственным специфическим контактом торо с ДНК является водородная связь фермента с $[1(T)]$ -звеном ДНК. Остальные водородные связи и электростатические константы торо с межукулеотидными фосфатными группами ДНК (см. рис. 4) имеют в своей основе неспецифический характер и могут реализовываться на уровне как специфической, так и неспецифической ДНК. В то же время при переходе от неспецифической к специфической последовательности ДНК происходит существенное усиление этих исходно неспецифических контактов и они приобретают характер в некоторой степени специфических. Одной из причин усиления таких контактов является то, что ДНК-связывающий центр торо обладает изогнутостью [96, 97]. Поскольку специфические последовательности ДНК способны легче переходить в изогнутую конформацию, они образуют с ферментом более прочные кооперативно-координированные контакты (рис. 5з) [96]. В целом, неспецифические взаимодействия

торо с двухцепочечной $d(pN)_{10}$ обеспечивают около пяти порядков сродства ($K_d \sim 10^{-5}$ М) и усиливаются примерно на порядок в случае специфических $d(pN)_{10}$ ($K_d \sim 10^{-6}$ М) [96, 97]. Дополнительные взаимодействия торо с АТ-фланкирующими последовательностями протяженных специфических $d(pN)_n$ ($20 > n > 10$) увеличивают сродство еще примерно на один порядок ($K_d \sim 10^{-7}$ М). Возрастание сродства различных неспецифических и специфических олигонуклеотидов после их предынкубации с ферментом зависит от их структуры и длины, но в пределе сродство возрастает примерно на один порядок ($K_d \sim 10^{-8}$ М). Сродство протяженных $d(pN)_{20}$ ($K_d \sim 10^{-8}$ М) сопоставимо с таковым для релаксированной плазмидной ДНК, а разница в сродстве между суперскрученной и релаксированной ДНК составляет примерно два порядка [96, 97]. Таким образом, вклад специфических взаимодействий торо со структурными элементами ссДНК ($K_d \sim 10^{-10}$ М) [45] не превышает 2 порядков [96, 97]. В целом, высокое сродство торо к ссДНК обеспечивается суммой всех перечисленных выше факторов: $10^{-5} \text{ М} \bullet 10^{-1} \bullet 10^{-1} \bullet 10^{-1} \bullet 10^{-2} = 10^{-10}$ М. Особую роль в специфичности действия торо играют конформационные изменения ДНК, которые, как известно, обеспечивают подгонку реагирующих орбиталей атомов со стороны фермента и специфической ДНК с точностью до $\sim 10\text{--}15^\circ$ (орбитальное управление). Напряжение, обусловленное деформацией связи на 10° , составляет всего 2.7 ккал/моль, и такой энергетический барьер легко преодолевается уже при температуре $25\text{--}30^\circ\text{C}$. Стадия адаптации структуры ДНК (в отличие от стадии комплексообразования фермента с ДНК) исключительно чувствительна к последовательности и исходной структуре ДНК в растворе и именно эффективная адаптация ДНК ведет к повышению скорости реакции для специфической ДНК по сравнению с неспецифической на $\sim 3\text{--}4$ порядка [96, 97].

Топоизомераза связывает ДНК-субстрат в своей центральной части, так что фермент как бы оборачивается вокруг ДНК, при этом все три субдомена (I, II и III) корового домена и С-концевой участок фермента взаимодействуют с ДНК [63]. Связывание ДНК происходит таким образом, что положительно заряженная поверхность ДНК-узнающей полости фермента располагается в непосредственной близости от сахарофосфатного остова ДНК. Участок субдомена I (АК 410–429), представляющий собой β -цепь, тесно контактирует с ДНК, располагаясь в большой бороздке строго напротив сайта расщепления. Область контактов между субдоменами I и III, обеспечивающая переход фермента в закрытую конформацию, также образует контакты с ДНК. Кроме того, α -спираль субдомена III (АК 586–605) дополнительно стабилизирует

взаимодействие белка с ДНК, обеспечивая контакты с –4 и –5 фосфатными группами дуплекса.

Фермент взаимодействует только с центральной частью ДНК длиной в 10 п.о. (нуклеотидные звенья с –4 по +6) в основном за счет контактов с межнуклеотидными фосфатными группами ДНК. Торо I образует один специфический контакт в малой бороздке ДНК между Lys532 и O2-карбонильным атомом кислорода (–1)-тимина расщепляемой цепи. Образование этого контакта объясняет наличие тимина в –1-положении практически во всех участках предпочтительного связывания ДНК с топоизомеразой [63], поскольку тимин – это единственное основание, у которого электронные пары O2 не участвуют в образовании уотсон-криковских водородных связей и способны образовывать водородную связь с аминогруппой остатка Lys532. В то же время самые последние данные РСА [97] указывают на то, что замена Thy(–1) на цитозин не приводит к исчезновению специфического контакта, а предпочтительное расщепление участков, содержащих T(–1), может быть связано с конформационными изменениями структуры дуплекса, происходящими после связывания ДНК с ферментом [100]. Данные РСА также выявили конформационные изменения ДНК: концы ДНК-дуплекса, находящегося в комплексе с ферментом, сдвигаются на 5.4 Å в направлении, перпендикулярном оси ДНК [100], при этом дуплекс образует некоторый изгиб, что отчасти подтверждает нашу гипотезу об изогнутости ДНК-узнающего центра, сформулированную на основании результатов термодинамического анализа [96, 97].

Несмотря на то что линкерный домен не является абсолютно необходимым для проявления активности торо I, он, по-видимому, играет определенную роль в связывании ДНК и влияет на скорость ее расщепления. Действительно, неполный фермент (при полном отсутствии или с нарушенной функцией линкерного домена) связывает ДНК в 20 раз хуже, чем полная торо70 [88]. Кроме того, равновесие реакции расщепление / религирование в случае неполного фермента сдвинуто в сторону религирования [88]. Наличие или отсутствие линкерного домена также оказывает значительное влияние на функционирование торо I в присутствии специфического ингибитора камптотецина [101], что может быть подтверждением участия линкерного домена в реакции релаксации, о чем сделано предложение в работе [26]. Удаление части линкерного домена приводит к нарушению доменной организации фермента и, в результате, образованию димерных форм торо I [102].

Структура линкерного домена (АК-остатки Pro636–Lys712) была определена с помощью РСА торо-70 (рис. 2б) [26]. Линкерный домен, содержащий 77 АК-остатков, состоит из двух протяженных α -спиралей, соединенных коротким участком Met675–

Ala678, которые образуют структуру спираль–поворот–спираль. Две α -спирали линкерного домена взаимодействуют между собой, образуя ряд классических лейцин-лейциновых гидрофобных контактов, а также контактов с участием алифатических участков обеих пептидных цепей. Доступная для ДНК поверхность линкерного домена достаточно сильно заряжена. Участок домена, обращенный к ДНК (его верхняя часть), содержит большое количество АК-остатков, несущих положительный заряд: девять остатков Lys и Arg и только два остатка Asp. Нижняя часть линкера, напротив, имеет незначительный положительный заряд (семь остатков Lys и Arg компенсируются шестью остатками аспарагиновой и глутаминовой кислот). Полученные данные указывают на то, что такая специфическая структура линкерного домена может играть важную роль в механизме действия топоизомеразы [26].

Линкерный домен выступает из основной глобулы фермента и отклонен на 30° от оси ДНК-дуплекса (рис. 2б и 3), а его вершина находится на расстоянии примерно 35 Å от ближайшей межнуклеотидной фосфатной группы ДНК. В связи с этим, домен образует лишь два контакта с межнуклеозидными фосфатными группами ДНК-лиганда, расположенными между +7- и +8-нуклеотидами нерасщепляемой и +9- и +10-нуклеотидами расщепляемой цепи, с помощью Arg708 и Lys650 АК-остатков белка, соответственно. Все остальные семь положительно заряженных АК-остатков этого домена не образуют каких-либо прямых контактов с ДНК. Аналогичную ситуацию можно наблюдать для двух α -спиралей коровых субдоменов I и II (АК-остатки с Thr303 по Thr338), поверхность которых, обращенная к ДНК, также содержит шесть положительно заряженных АК-остатков, но образуется только один контакт Arg316 с межнуклеотидной фосфатной группой между +5- и +6-звеньями расщепляемой цепи.

Наличие двух близко расположенных участков фермента, имеющих положительно заряженные поверхности, обращенные к ДНК, но не образующих с ней прямых контактов, предполагает их важную роль в реализации механизма топоизомеризации за счет создания положительного потенциала и возможности образования контактов с ДНК в особых ситуациях [26]. Предполагается, что, несмотря на достаточное удаление от ДНК, линкерный домен фермента может участвовать в его связывании с ДНК, если спираль будет в необходимой степени изогнута или если в дуплексе образуется излом (рис. 5) [78]. Поддержание конформации ДНК с изломом за счет взаимодействия с линкерным доменом может играть решающую роль на стадии катализа, поскольку изменение структуры ДНК обеспечивает необходимые перестройки в активном центре фермента, а также ДНК, которые важны для эффективности протекания реакции расщепления [78].

Активный центр топоизомеразы I

На основании результатов РСА и сравнительного анализа АК-последовательностей всех эукариотических топоизомераз [26], а также результатов влияния на активность ферментов аминокислотных замен, введенных с помощью направленного мутагенеза [36, 86, 103–107], был предложен механизм расщепления и религирования фосфодиэфирной связи ДНК [26].

Коллинеарное расположение гидроксильной группы каталитического остатка тирозина относительно О5'–Р-фосфоэфирной связи обеспечивает нуклеофильную атаку ОН-группой Туг этой связи с последующим образованием ковалентной связи фермента с 3'-концом расщепленной ДНК. Остатки Arg488 и His632 являются абсолютно консервативными для всех клеточных и вирусных топоизомераз IB-типа [26]. Согласно данным модификации topo человека, дрожжей и вируса оспы, эти АК-остатки играют важную роль в реакции расщепления–религирования ДНК [36, 86, 103–107], они взаимодействуют с атомами кислорода расщепляемой фосфоэфирной связи (рис. 6) [26].

Принимающие участие в катализе консервативные АК-остатки аргинина (Arg488 и Arg532) необходимы для стабилизации переходного состояния через образование водородной связи с одним из атомов кислорода межнуклеозидной фосфатной группы (рис. 6). Другой атом кислорода фосфатной группы интермедиата образует водородную связь с N^ε2-атомом His632, который в принципе мог бы выступать в качестве кислотного катализатора, протонирующего 5'-атом кислорода уходящей группы в ходе реакции нуклеофильного замещения (рис. 6). В то же время данные по замене His632 на другие АК-остатки позволили предположить, что данная АК вряд ли может играть роль донора протона, и значение His632 может сводиться только к координации расщепляемой фосфатной группы в активном центре topo I [27].

На начальном этапе в радиусе 4 Å от атакующей ОН-группы Туг723 не было обнаружено каких-либо групп, способных выступать в качестве основания, увеличивающего ее нуклеофильность. Ближайшим АК-остатком является His632 (рис. 6), который, как предполагалось, не может играть эту роль, поскольку N^ε2-атом остатка гистидина расположен на расстоянии 5.5 Å от гидроксильной группы Туг. Предполагалось, что роль основного катализатора в рассматриваемой реакции может выполнять молекула воды [26]. Действительно, согласно новым данным РСА [100], молекула воды располагается в активном центре в непосредственной близости от ОН-группы Туг723 и образует водородную связь с гуанидиниевой группой Arg590 (рис. 6) [100]. Таким образом, молекула воды может играть роль основания, активирующего каталитическую группу Туг723. Кроме того, гуанидиниевая группа Arg590,

расположенная на расстоянии 2.5 Å от НО-группы Tug723, может существенно изменять ее кислотность [100]. Все эти факторы должны существенно облегчать депротонирование НО-группы Tug723 и способствовать ее нуклеофильной атаке фосфодиэфирной связи [100]. Поворот расщепляемой межнуклеотидной фосфатной группы в активном центре приводит к тому, что Lys532 приобретает возможность взаимодействовать с одним из атомов кислорода фосфатной группы, не участвующим в образовании новой фосфоэфирной связи [100].

Возможность участия His632 в качестве основания в реакции религирования ДНК, которое могло бы увеличить нуклеофильность 5'-ОН-группы расщепленной ДНК, осталась под вопросом, поскольку такую роль остатка гистидина невозможно было выявить на основании данных структуры ковалентного комплекса ДНК с topo I [89].

Также интересную особенность можно отметить при анализе данных РСА комплексов ДНК с ферментом, который содержит или лишен линкерного домена [26, 89]. В отсутствие линкерного домена расположение атакующей НО-группы каталитического остатка Tug723 и межнуклеозидной фосфатной группы ДНК в активном центре не соответствует оптимальному, в то время как при наличии линкерного домена конформация расщепляемой фосфодиэфирной связи изменяется, при этом происходит поворот относительно C4'-C5'-связи на угол 45° [26, 78]. В то же время более сильный поворот должен привести к наиболее оптимальному расположению реагирующих групп [26, 78]. Необходимо отметить, что подобные изменения конформации сахарофосфатного остова происходят при образовании изломов в ДНК [108]. Таким образом, не исключено, что каталитической реакции расщепления предшествует формирование излома или изгиба в ssДНК, что в свою очередь облегчается за счет связывания ДНК с «изогнутым» ДНК-узнающим центром фермента [78]. В результате такого изменения структуры происходит изменение конформации расщепляемой фосфоэфирной связи, что оптимизирует взаимодействия между реагирующими группами со стороны фермента и субстрата и приводит к увеличению скорости реакции [78].

Механизм действия ДНК-топоизомеразы I

Детальный механизм действия фермента был предложен нами на основании совокупности имеющихся данных РСА [26, 89] и термодинамического анализа [78, 95–107]. Весь процесс происходит в несколько стадий и подробно описан нами в работе [78] и схематически изображен на рис. 7. На первом этапе (рис. 7а, б) фермент переходит в открытую конформацию, когда возможно взаимодействие ДНК с внутренней полостью topo I. При этом происходит образование неспецифических контактов ДНК с ферментом. Необходимо отметить, что возможность topo I эффективно взаимодействовать с любой

последовательностью дцДНК, позволяет ферменту скользить по ДНК в поиске специфических участков. Далее топо I переходит в закрытую конформацию и осуществляет поиск специфической последовательности (рис. 7в, з). При образовании прочных специфических контактов с Thy и близлежащей (–1)-фосфатной группой фермент останавливается и формирует контакты с межнуклеозидной фосфатной группой между –5(G)- и –4(A)-звеньями специфической последовательности [97]. Если эти контакты образовались, то становится возможным последующее кооперативное усиление дополнительных контактов фермента с двумя межнуклеозидными фосфатными группами между –4(A)-, –3(C)- и –2(T)-звеньями. Дальнейшее образование дополнительных специфических контактов фермента с межнуклеозидными фосфатными группами в зоне +1(A)–+9(T) и усиление всех контактов подготавливает специфическую ДНК для дальнейшей «подгонки» ее структуры до каталитически активного состояния. (рис. 7д, е) [97].

Далее в районе сайта расщепления происходит образование излома в ДНК. При этом установление контактов дуплекса с линкерным доменом топо I позволяет удерживать ДНК в конформационно активном состоянии (рис. 7ж, з). Образование излома облегчается за счет изогнутости ДНК-связывающего центра топо I, которая более выражена как раз в районе сайта расщепления, а также за счет топологического напряжения ДНК. В результате такого изменения конформации происходит поворот расщепляемой фосфатной группы вокруг связи C4'–C5' (рис. 7, стадия ж), что должно соответствовать оптимальному расположению реагирующих групп в активном центре фермента. При таком повороте также может осуществляться более прочное закрепление расщепляемой фосфоэфирной группы, поскольку расстояния до координирующих ее Arg488, Arg590 и His632 уменьшаются с 3.2, 3.0 и 3.3 Å до 2.7, 2.7 и 2.8 Å соответственно. Энергия образующейся Туг-фосфатной связи ковалентного интермедиата между HO-группой Туг723 топоизомеразы и ДНК примерно на 1 ккал/моль выше, чем энергия разрываемой фосфоэфирной связи ДНК [41]. Однако энергетические затраты, идущие на образование излома, повышают энергию этой связи, делая атаку HO-группы Туг723 термодинамически выгодной. При реакции религирования энергетически богатая фосфотирозиновая связь легко разрушается и происходит замещение атома кислорода HO-группы Туг на атом кислорода 5'-ОН-группы ДНК. Релаксация ДНК приводит к уменьшению топологического напряжения спирали и снижает степень изогнутости ДНК, что облегчает диссоциацию фермента (рис. 7и, к).

Существуют два возможных механизма реакции релаксации ДНК, осуществляемой различными топоизомеразами первого типа. Механизм свободного вращения ДНК и механизм пропускания цепи через образующийся разрыв принципиально различаются между собой и осуществляются топо различных подклассов. Считается, что процесс релаксации ссДНК, катализируемый топо человека, происходит при вращении дуплекса вокруг неразорванной цепи ДНК. Однако механизм в этом случае отличается от классического и может быть назван механизмом контролируемого вращения, поскольку белок в ходе релаксации способен контактировать с вращающейся частью ДНК и, тем самым, регулировать процесс топоизомеризации [26]. Данная модель была предложена на основании следующих соображений. При свободном вращении цепи ДНК вокруг одной из связей возможны столкновения ДНК с белковой глобулой топо. Это отрицает возможность обычного свободного вращения. Движение вращающейся части ДНК было смоделировано, с допуском, что изгиб в ДНК может быть имитирован псевдосвязями, закрепляющими 3'-атом кислорода между -1- и +1-нуклеотидами нерасщепленной цепи. Если смоделировать вращение ДНК вокруг таких псевдосвязей, то участок ДНК, расположенный на 5'-конце сайта расщепления, может быть пространственно сближен с линкерным доменом фермента, а при дальнейшем вращении ДНК на угол $\sim 180^\circ$ сближен с другим участком фермента, способным контактировать с ДНК (две α -спирали в белковой последовательности Thr303–Tyr338). Таким образом, положительно заряженные участки линкерного домена и области Thr303–Tyr338 могут взаимодействовать с вращающейся ДНК в процессе релаксации [26].

ДНК-топоизомераза V

ДНК-топоизомераза V была выделена из гипертермофильных бактерий [25, 109]. Эта топоизомераза связывается с поликлональными антителами к топо I человека и по своим биохимическим свойствам близка к топоизомеразам IB-подкласса [109]. Фермент релаксирует как «-», так и «+»-ссДНК при температуре меньше 90°C по механизму, сходному с механизмом для эукариотических топо I [109]. При температуре от 90 до 100°C действие топо V приводит к уменьшению числа зацеплений в дцДНК, что характерно для реакции, катализируемой гиразой [110]. Подобную ферментативную активность топо V способна проявлять даже при очень высоких температурах вплоть до 122°C [110]. Таким образом, при температурах ниже точки плавления ДНК топо V релаксирует дцДНК. При высоких температурах, когда происходит плавление ДНК-дуплекса, образуются участки с «+»-суперспирализацией, которые предохраняют ДНК от дальнейшей денатурации [110]. В этих условиях топо V может катализировать

релаксацию «+»-супервитков, что приводит к дальнейшему плавлению дцДНК. Считается, что каталитическое действие торо V, проявляемое при экстремально высоких температурах, может быть очень важным для развития гипертермофильных бактерий, поскольку позволяет преодолевать топологические проблемы, затрудняющие протекание жизненно важных клеточных процессов [110].

Таким образом, топоизомеразы IV-типа являются исключительно конформационно активными ферментами, которые узнают как специфические, так и неспецифические ДНК. Сложная пространственная белковая структура торо IV-типа позволяет этим ферментам работать как с суперскрученными, так и релаксированными ДНК, а специфичность их действия обусловлена большим числом различных факторов, которые обеспечивают тонкую подгонку структуры специфической ДНК до каталитически активного состояния.

Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН и Президиума СО РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки – медицине» и грантом Президиума СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J.C. // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. V. 65. P. 635–692.
2. Wang J.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. P. 430–440.
3. Shuman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 3489–3493.
4. Zhu J., Schiestl R.H. // *Mol. Cell Biol.* 1996. V. 16. P. 1805–1812.
5. Trowbridge P.W., Roy R., Simmons D.T. // *Mol. Cell Biol.* 1999. V. 19. P. 1686–1694.
6. Pommier Y., Pourquier P., Fan Y., Strumberg D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1400. P. 83–105.
7. Merino A., Madden K.R., Lane W.S., Champoux J.J., Reinberg D. // *Nature.* 1993. V. 365. P. 227–232.
8. Kato S., Kikuchi A. // *Nagoya J. Med. Sci.* 1998. V. 61. P. 11–26.
9. Champoux J.J. // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 369–413.
10. Berger J.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1400. P. 3–18.
11. Gupta M., Fujimori A., Pommier Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1262. P. 1–14.
12. Sharma A., Mondragon A. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. V. 5. P. 39–47.
13. Forterre P., Gribaldo S., Gadelle D., Serre M.C. // *Biochimie.* 2007. V. 89. P. 427–446.
14. Cretaio E., Pattarello L., Fontebasso Y., Benedetti P., Losasso C. // *Ital. J. Biochem.* 2007. V. 56. P. 91–102.
15. Leppard J.B., Champoux J.J. // *Chromosoma.* 2005. V. 114. P. 75–85.
16. Schoeffler A.J., Berger J.M. // *Q. Rev. Biophys.* 2008. V. 41. P. 41–101.
17. Singh P., Bhardwaj A. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2008. V. 8. P. 388–398.
18. Wethington S.L., Wright J.D., Herzog T.J. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2008. V. 8. P. 819–831.
19. Feun L., Savaraj N. // *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 2008. V. 8. P. 707–716.
20. Beretta G.L., Perego P., Zunino F. // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2008. V. 12. P. 1243–1256.
21. Teicher B.A. // *Biochem. Pharmacol.* 2008. V. 75. P. 1262–1271.
22. Giles G.I., Sharma R.P. // *Med. Chem.* 2005. V. 1. P. 383–394.
23. Tse-Dinh Y.C. // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2007. V. 7. P. 3–9.
24. Das B.B., Ganguly A., Majumder H.K. // *Adv. Exp Med Biol.* 2008. V. 625. P. 103–115.
25. Slesarev A.I., Stetter K.O., Lake J.A., Gellert M., Krah R., Kozyavkin S.A. // *Nature.* 1993. V. 364. P. 735–737.
26. Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G., Champoux J.J. // *Science.* 1998. V. 279. P. 1534–1541.
27. Yang Z., Champoux J.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 677–685.
28. Sekiguchi J., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 29760–29764.

29. Shuman S., Prescott J. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 17826–17836.
30. Sekiguchi J., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 31731–31734.
31. Tian L., Sayer J.M., Jerina D.M., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 39718–39726.
32. Liao S., Mao C., Birktoft J.J., Shuman S., Seeman N.C. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 1520–1531.
33. Sekiguchi J., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 11636–11645.
34. Cheng C., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 11589–11595.
35. Sekiguchi J., Shuman S. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 3448–3457.
36. Wittschieben J., Shuman S. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3001–3008.
37. Gao R., Zhang Y., Choudhury A.K., Dedkova L.M., Hecht S.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 3321–3331.
38. Hanai R., Wang J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 11904–11908.
39. Hwang Y., Minkah N., Perry K., Van Duyne G.D., Bushman F.D. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 38052–38060.
40. Tian L., Claeboe C.D., Hecht S.M., Shuman S. // *Structure.* 2005. V. 13. P. 513–520.
41. Stivers J.T., Shuman S., Mildvan A.S. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 327–339.
42. Stivers J.T., Shuman S., Mildvan A.S. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 15449–15458.
43. Morham S.G., Shuman S. // *Genes Dev.* 1990. V. 4. P. 515–524.
44. Klempner N., Traktman P. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 15887–15899.
45. Stivers J.T., Harris T.K., Mildvan A.S. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 5212–5222.
46. Wang H.K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. // *Med. Res. Rev.* 1997. V. 17. P. 367–425.
47. Been M.D., Champoux J.J. // *J. Mol. Biol.* 1984. V. 180. P. 515–531.
48. Trask D.K., Muller M.T. // *Nucleic Acids Res.* 1983. V. 11. P. 2779–2800.
49. Andersen A.H., Svejstrup J.Q., Westergaard O. // *Adv. Pharmacol.* 1994. V. 29A. P. 83–101.
50. Tanizawa A., Kohn K.W., Pommier Y. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5157–5166.
51. Shen C.C., Shen C.K. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 212. P. 67–78.
52. Camilloni G., Caserta M., Amadei A., Di Mauro E. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1129. P. 73–82.
53. Muller M.T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 824. P. 263–267.
54. Camilloni G., Di Martino E., Caserta M., Di Mauro E. // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 7071–7085.
55. Camilloni G., Di Martino E., Di Mauro E., Caserta M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 3080–3084.
56. Caserta M., Amadei A., Camilloni G., Di Mauro E. // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 8152–8157.
57. Madden K.R., Stewart L., Champoux J.J. // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 5399–5409.

58. Depew D.E., Wang J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 4275–4279.
59. Pulleyblank D.E., Shure M., Tang D., Vinograd J., Vosberg H.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 4280–4284.
60. Krogh S., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J. // Nucleic Acids Res. 1991. V. 19. P. 1235–1241.
61. Zechiedrich E.L., Osheroff N. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 4555–4562.
62. Edwards K.A., Halligan B.D., Davis J.L., Nivera N.L., Liu L.F. // Nucleic Acids Res. 1982. V. 10. P. 2565–2576.
63. Been M.D., Burgess R.R., Champoux J.J. // Nucleic Acids Res. 1984. V. 12. P. 3097–3114.
64. Bonven B.J., Gocke E., Westergaard O. // Cell. 1985. V. 41. P. 541–551.
65. Christiansen K., Bonven B.J., Westergaard O. // J. Mol. Biol. 1987. V. 193. P. 517–525.
66. Ness P.J., Koller T., Thoma F. // J. Mol. Biol. 1988. V. 200. P. 127–139.
67. Thomsen B., Mollerup S., Bonven B.J., Frank R., Blocker H., Nielsen O.F., Westergaard O. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 1817–1823.
68. Busk H., Thomsen B., Bonven B.J., Kjeldsen E., Nielsen O.F., Westergaard O. // Nature. 1987. V. 327. P. 638–640.
69. Stevnsner T., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 10110–10113.
70. Christiansen K., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 721–729.
71. Svejstrup J.Q., Christiansen K., Andersen A.H., Lund K., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12529–12535.
72. Andersen A.H., Gocke E., Bonven B.J., Nielsen O.F., Westergaard O. // Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. P. 1543–1557.
73. Jaxel C., Capranico G., Kerrigan D., Kohn K.W., Pommier Y. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 20418–20423.
74. Christiansen K., Svejstrup A.B., Andersen A.H., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9690–9701.
75. Leteurtre F., Kohlhagen G., Fesen M.R., Tanizawa A., Kohn K.W., Pommier Y. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 7893–7900.
76. Oschepkov D.Yu., Bugreev D.V., Vityaev E.E., Nevinsky G.A. // Proceedings of the third international conference on BGRS. Novosibirsk, Russia, 2002. V. 1. P. 161–164.
77. Oshchepkov D.Yu., Turnaev I.I., Vityaev E.E. // Proceedings of the third international conference on BGRS. Novosibirsk, Russia, 2002. V. 1. P. 43–46.
78. Бугреев Д.В., Бунева В.Н., Невинский Г.А. // Молекулярн. биол. 2003. Т. 37. С. 325–339.
79. D'Arpa P., Machlin P.S., Ratrie H., 3rd Rothfield N.F., Cleveland D.W., Earnshaw W.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 2543–2547.
80. Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7602–7608.
81. Alsner J., Svejstrup J.Q., Kjeldsen E., Sorensen B.S., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 12408–12411.

82. Bharti A.K., Olson M.O., Kufe D.W., Rubin E.H. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 1993–1997.
83. Lisby M., Olesen J.R., Skouboe C., Krogh B.O., Straub T., Boege F., Velmurugan S., Martensen P.M., Andersen A.H., Jayaram M., Westergaard O., Knudsen B.R. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 20220–20227.
84. Mo Y.Y., Wang C., Beck W.T. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 41107–41113.
85. Zhang H., Barcelo J.M., Lee B., Kohlhagen G., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Pommier Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 10608–10613.
86. Madden K.R., Champoux J.J. // Cancer Res. 1992. V. 52. P. 525–532.
87. Gao R., Zhang Y., Dedkova L., Choudhury A.K., Rahier N.J., Hecht S.M. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 8402–8410.
88. Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. // J. Mol. Biol. 1997. V. 269. P. 355–372.
89. Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J.J., Hol W.G. // Science. 1998. V. 279. P. 1504–1513.
90. Lue N., Sharma A., Mondragon A., Wang J.C. // Structure. 1995. V. 3. P. 1315–1322.
91. Klemm J.D., Rould M.A., Aurora R., Herr W., Pabo C.O. // Cell. 1994. V. 77. P. 21–32.
92. Hickman A.B., Waninger S., Scocca J.J., Dyda F. // Cell. 1997. V. 89. P. 227–237.
93. Невинский Г.А. // Молекулярн. биол. 1995. Т. 29. С. 16–37.
94. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 291–305.
95. Bugreev D.V., Vasyutina E.L., Kolocheva T.I., Buneva V.N., Andoh T., Nevinsky G.A. // Biochimie. 1998. V. 80. P. 303–308.
96. Bugreev D.V., Buneva V.N., Sinitsyna O.I., Nevinsky G.A. // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2003. V. 29. P. 143–153 (Бугреев Д.В., Бунева В.Н., Синицина О.И., Невинский Г.А. // Биоорган. химия. 2003. Т. 29. С. 163–174).
97. Bugreev D.V., Sinitsyna O.I., Buneva V.N., Nevinsky G.A. // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2003. V. 29. P. 249–261 (Бугреев Д.В., Синицина О.И., Бунева В.Н., Невинский Г.А. // Биоорган. химия. 2003. Т. 29. С. 277–289).
98. Nevinsky G.A., Bugreev D.V., Buneva V.N., Yasui Y., Nishizawa M., Andoh T. // FEBS Lett. 1995. V. 368. P. 97–100.
99. Bugreev D.V., Vasyutina E.L., Buneva V.N., Yasui Y., Nishizawa M., Andoh T., Nevinsky G.A. // FEBS Lett. 1997. V. 407. P. 18–20.
100. Redinbo M.R., Champoux J.J., Hol W.G. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 6832–6840.
101. Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 32950–32960.
102. Ireton G.C., Stewart L., Parker L.H., Champoux J.J. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 25820–25830.
103. Levin N.A., Bjornsti M.A., Fink G.R. // Genetics. 1993. V. 133. P. 799–814.
104. Jensen A.D., Svejstrup J.Q. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 236. P. 389–394.
105. Megonigal M.D., Fertala J., Bjornsti M.A. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 12801–12808.

106. *Cheng C., Wang L.K., Sekiguchi J., Shuman S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 8263–8269.*
107. *Petersen B.O., Shuman S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 3891–3896.*
108. *Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer-Verlag, 1984.*
109. *Slesarev A.I., Lake J.A., Stetter K.O., Gellert M., Kozyavkin S.A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 3295–3303.*
110. *Kozyavkin S.A., Pushkin A.V., Eiserling F.A., Stetter K.O., Lake J.A., Slesarev A.I. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13593–13595.*

РИСУНКИ И СХЕМА

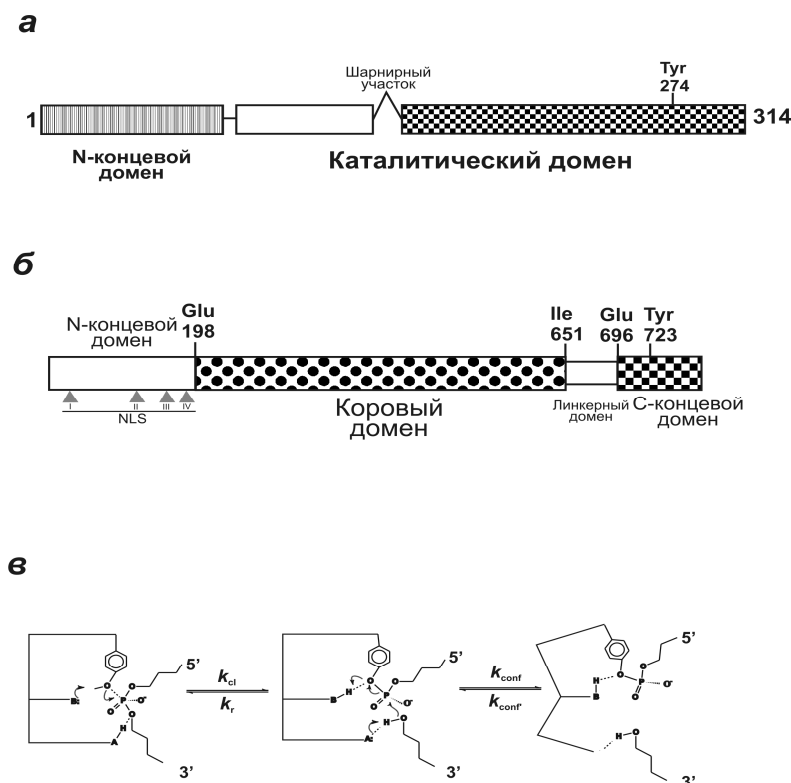


Рис. 1. Доменная организация ДНК-топоизомераз I вируса оспы (*а*) [33] и человека (*б*) [80]; *в* – схематическое изображение механизма реакции расщепления / религирования, катализируемой топо I вируса оспы.

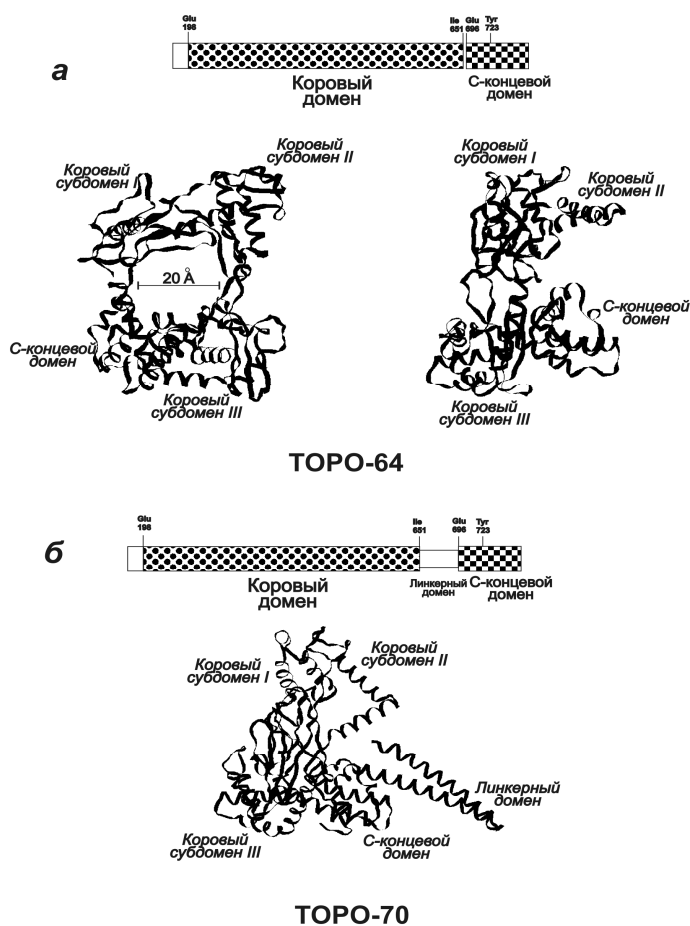


Рис. 2. Доменная организация и структура делеционных мутантов топо I человека: *а* – мутантный белок топо-64, лишенный линкерного домена, в закрытой (слева) и открытой конформации (справа); *б* – мутантный белок топо-70, содержащий линкерный домен.

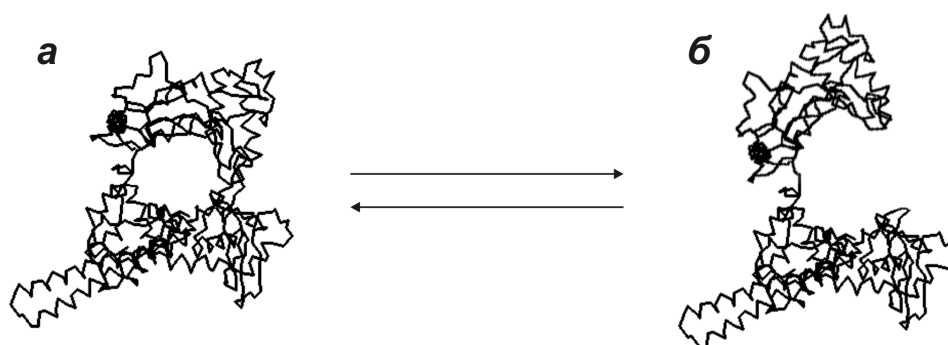


Рис. 3. Закрытая (а) и открытая (б) конформации торо I человека, обеспечивающие связывание и закрепление ДНК во внутренней полости фермента.

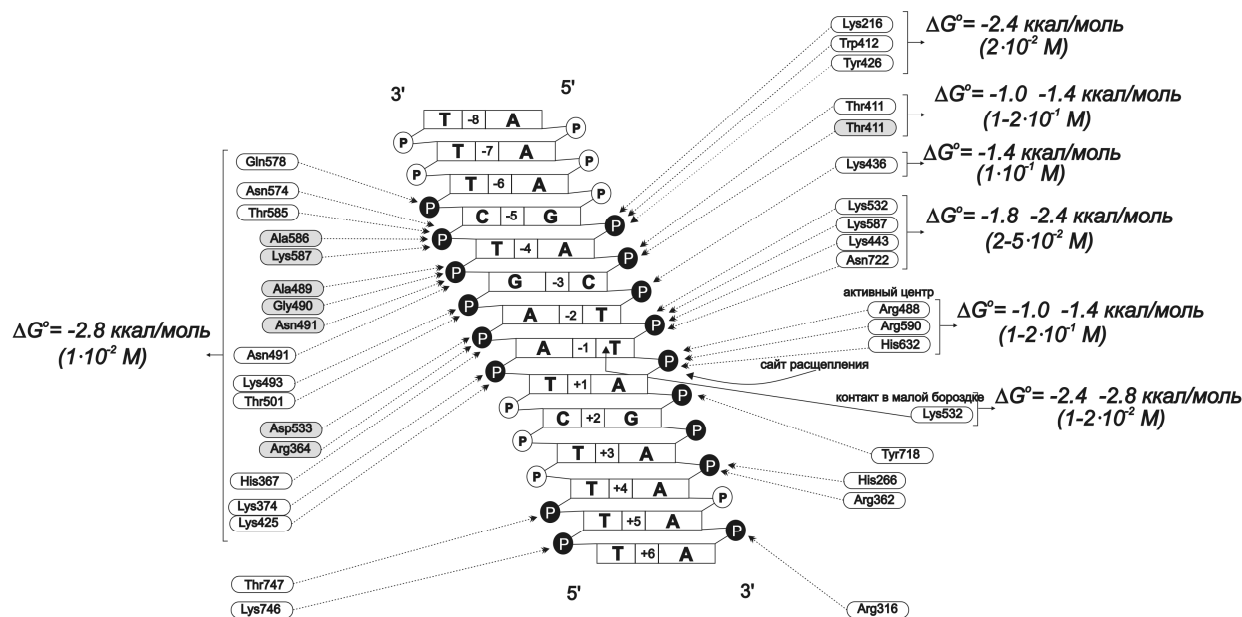


Рис. 4. Схематическое изображение неспецифических контактов, образуемых АК-остатками торо I человека с межнуклеозидными фосфатными группами и специфических контактов с остатками Thy специфической последовательности, выявленных РСА [26, 89]. Справа и слева приведены данные приблизительной оценки (методом постепенного усложнения структуры лиганда) относительного вклада этих контактов в общее сродство торо к ДНК [96, 97].

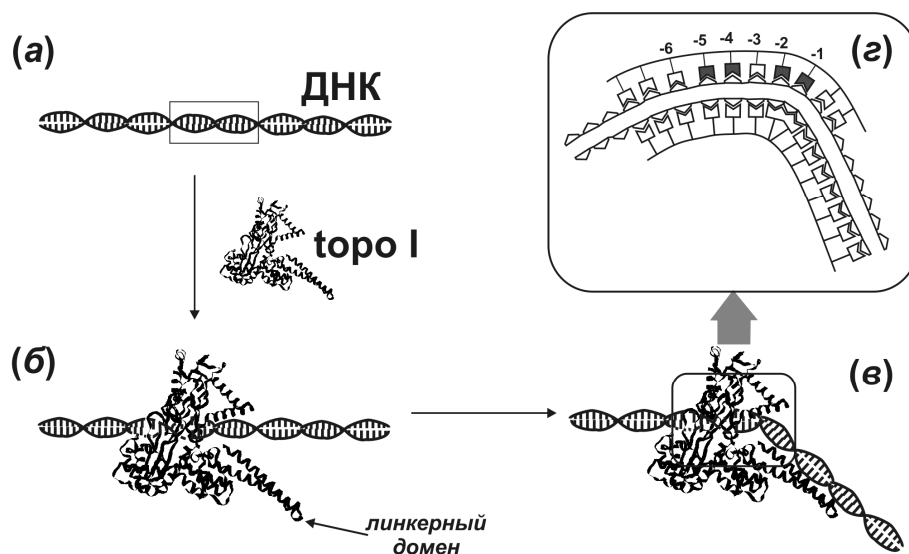


Рис. 5. Конформационные изменения в ДНК при образовании ее комплекса с топо I: *а* – ДНК, содержащая специфическую для топо I последовательность; *б* и *в* – образование излома в ДНК при взаимодействии в ДНК-узнающем центре и образование контактов ДНК с линкерным доменом фермента; *г* – специфическое строение ДНК-узнающего центра топо I, предназначенного для эффективного связывания изогнутых участков ссДНК. Флажками в ДНК-узнающем центре топо I обозначены АК-остатки белка, контактирующие с соответствующими межнуклеозидными фосфатными группами ДНК, которые обозначены треугольниками. После образования излома в ДНК меняется конформация расщепляемой межнуклеозидной фосфатной группы, что обеспечивает правильное расположение реагирующих групп в активном центре и увеличивает скорость реакции. Направление излома определяется большей изогнутостью ДНК-узнающего центра в районе сайта расщепления.

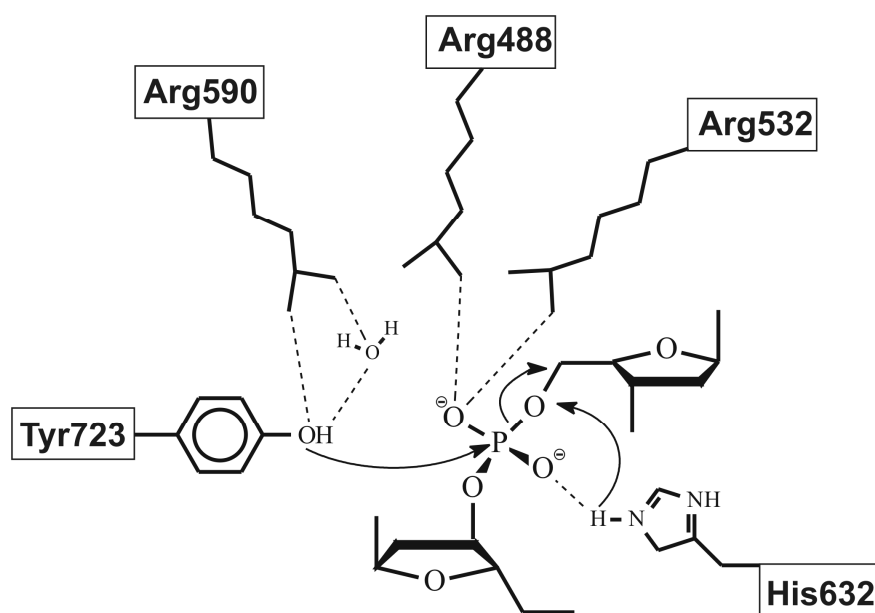


Рис. 6. Взаимодействие АК-остатков активного центра топо I человека с расщепляемой фосфодиэфирной группой ДНК.

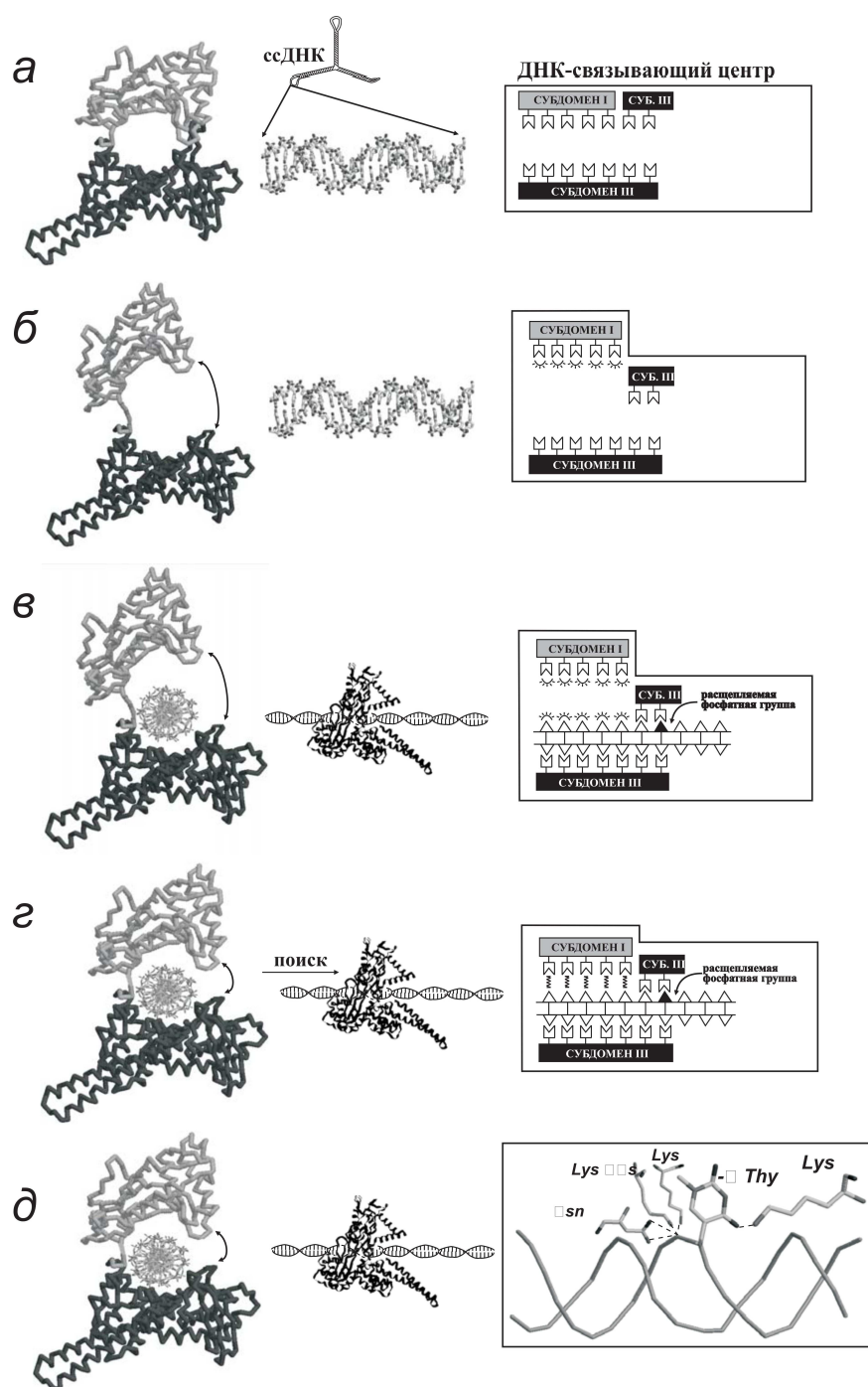


Рис. 7. Схематическое изображение различных этапов узнавания ссДНК эукариотической топо I, ее разрезания и последующей релаксации: *а* – взаимодействие топо с легко доступными петлевыми участками дуплекса; *б* – переход фермента в «открытую» конформацию путем разрушения взаимодействий между субдоменами I и III; *в* – образование первоначальных неспецифических аддитивных контактов ДНК с АК-остатками субдомена III, ведущих к конформационным изменениям фермента; *г* – переход топо из «открытой» в «закрытую» конформацию, когда становится возможным образование большого числа неспецифических контактов ДНК с участками обоих субдоменов ДНК-узнающего центра фермента, а также скольжение фермента по ДНК в поиске специфической последовательности; *д* – нахождение ферментом Т-содержащей специфической последовательности, изменение ее конформации в центральной части дуплекса, «доведение конформации ДНК» до каталитически компетентного состояния и образование ковалентного интермедиата топо-ДНК; *е* – релаксация ДНК; *ж* – уменьшение топологического напряжения ДНК; *з* – религирование–восстановление разрыва в ДНК атакой свободной 5'-ОН-группой фосфата; *и* – переформирование структуры активного центра фермента для осуществления повторных циклов расщепления; *к* – диссоциация топо с ДНК.

