



УДК 577.152.599*12.02

МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ СУПЕРСКРУЧЕННОЙ ДНК ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ ТОПОИЗОМЕРАЗАМИ ПЕРВОГО ТИПА II. СРАВНЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

© 2003 г. Д. В. Бугреев*, О. И. Синицина**, В. Н. Бунева*, Г. А. Невинский*#

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

**Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 17.09.2001 г. Принята к печати 09.08.2002 г.

Обобщены результаты исследования взаимодействия ДНК-топоизомераз первого типа из клеток мыши и плаценты человека со специфическими олигонуклеотидами различной структуры и длины. Проведена оценка относительного вклада различных контактов между ферментом и ДНК, обнаруженных с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) и описанных ранее в литературе, в общее сродство фермента к субстрату. Выявлены факторы, определяющие различие во взаимодействии ферментов со специфическими и неспецифическими одно- и двухцепочечными ДНК. Результаты РСА комплекса ДНК с топоизомеразой I интерпретированы с учетом данных по детальному термодинамическому и кинетическому анализу взаимодействия фермента со специфическими и неспецифическими ДНК.

Ключевые слова: ДНК-топоизомераза I мыши и плаценты человека, механизм взаимодействия со специфической ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Эукариотическая ДНК-топоизомераза I (КФ 5.99.1.2; topoI) изменяет топологическое состояние как положительно, так и отрицательно суперскрученной ДНК (ссДНК). Она играет важную роль в ключевых биологических процессах клетки [2], а также является мишенью для большого числа антираковых препаратов [3, 4].

Один из наиболее информативных подходов к исследованию ДНК-узнающих ферментов – метод рентгеноструктурного анализа (РСА), который, однако, не позволяет количественно оценить относительную эффективность выявляемых с помощью этого метода контактов и поэтому не дает возможности учесть относительный вклад отдельных специфических и неспецифических взаимодействий в общее сродство ДНК к ферментам.

В течение последних лет нами были разработаны новые подходы к анализу закономерностей белково-нуклеиновых взаимодействий, позволяющие на количественном уровне оценивать относи-

тельный вклад практически каждого нуклеотидного звена в общее сродство ферментов к протяженным ДНК. На примере различных ДНК-зависимых ферментов показано, что их взаимодействие с ДНК на молекулярном уровне может быть успешно проанализировано с помощью поэтапного упрощения или усложнения структуры протяженного ДНК-лиганда (для обзора см. [5, 6]). В предыдущей статье данной серии [1] описано детальное исследование взаимодействия topoI мыши и человека с неспецифическими одно- и двухцепочечными олигонуклеотидами. Несмотря на некоторые различия во взаимодействии этих ферментов с неспецифической ДНК, в целом, полученные данные свидетельствуют о близких закономерностях узнавания ими ДНК [1].

Ранее нами проведен анализ взаимодействия topoI человека и мыши со специфическими oligo(N) [7–9]. В данной работе продолжено исследование этих ферментов с помощью метода постепенного усложнения лиганда. Сделана попытка анализа результатов РСА topoI человека [10, 11] в свете полученных нами данных по изучению взаимодействия topoI мыши и человека со специфическими и неспецифическими oligo(N) с целью оценки относительного вклада различных структурных элементов специфической последовательности ДНК в ее общее сродство к ферменту и специфичности его действия.

Сообщение I см. [1].

Сокращения: topoI – ДНК-топоизомераза первого типа; АК – аминокислота; РСА – рентгеноструктурный анализ; ссДНК, оцДНК и дцДНК – суперскрученная; одно- и двухцепочечная ДНК соответственно. Префикс "d" в аббревиатуре дезоксирибонуклеотидов опущен.

Автор для переписки (тел.: (383-2) 39-62-26; факс: (383-2) 33-36-77; эл. почта: Nevinsky@niboch.nsc.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие топоизомеразы с олигонуклеотидами. Согласно данным РСА [10, 11], топоI человека образует большое число контактов с межнуклеозидными фосфатными группами, а также взаимодействует специфически с Thy(-1)-основанием расщепляемой цепи ДНК (рис. 1). Некоторые из этих групп контактируют с двумя или даже тремя-четырьмя АК-остатками топоI. Качественный характер данных РСА не позволяет понять, какие из этих контактов вносят основной вклад в сродство топоI к специфической последовательности, а также выявить, существуют ли тонкие кооперативные процессы при образовании первичного комплекса фермента с ДНК и последующих стадиях их взаимной конформационной адаптации.

Как показано нами ранее на примере различных ферментов [5, 6], применение метода постепенного усложнения структуры лиганда позволяет оценить относительный вклад различных звеньев специфической ДНК в ее общее сродство к ферменту. Попытки такого рода исследований были сделаны и в случае эукариотических топоI [7–9]. С помощью метода ингибиторного анализа оценено относительное сродство топоI человека и мыши к некоторым неспецифическим [1] и специфическим oligo(N) [7–9], которые являются конкурентными (по отношению к ссДНК) ингибиторами ферментов. Сродство неспецифических oligo(N) было существенно ниже, чем специфических. На-

пример, одноцепочечный (pT)₉, а также дуплекс (pT)₉ · (pA)₉ ингибировали реакцию, катализируемую топоI мыши, примерно в 40–600 раз хуже, чем специфический нонануклеотид и соответствующий ему дуплекс [7]. Концентрации ингибитора, при которых достигалось ингибирование реакции на 50% (*I*₅₀) в использованных нами условиях, были близки величинам *K*_i, а значения *I*₅₀ для специфических oligo(N) практически не отличались в случае ферментов мыши и человека [7–9]. Oligo(N), соответствующие расщепляемой цепи, имеют большее сродство к ферментам, чем соответствующие нерасщепляемой цепи [7, 9]. В данной работе продолжено исследование взаимодействия топоI со специфическими oligo(N). Совокупность полученных данных представляется полезной для оценки относительной эффективности различных контактов между ДНК и топоI, выявленных РСА [10, 11].

ТопоI узнает в составе ДНК специфическую последовательность (см. [1]). При этом скорость реакции расщепления на 3–4 порядка выше, чем для других последовательностей ДНК, расщепляемых ферментом.

Сначала было проведено сравнение сродства топоI к ортофосфату (*I*₅₀ 0.38 M), NMP и динуклеотидам в зависимости от их положения в расщепляемой цепи:

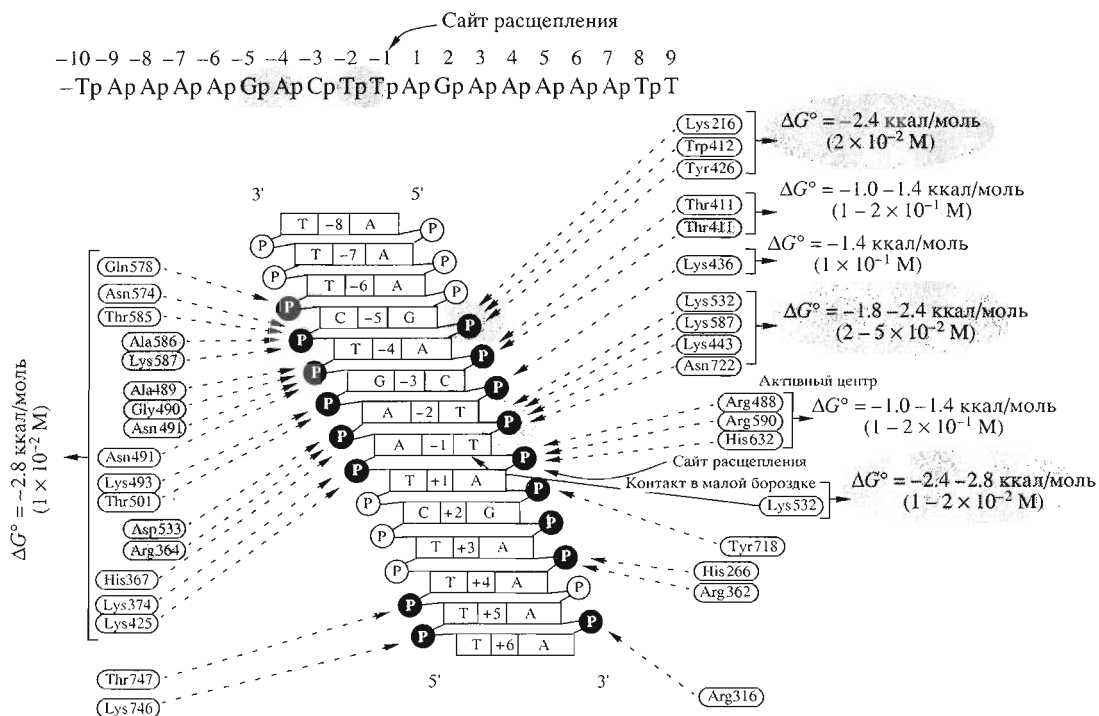
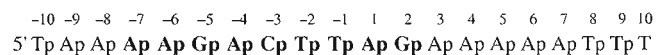


Рис. 1. Схематическое изображение выявленных РСА [10] контактов, образуемых АК-остатками топоI человека с межнуклеозидными фосфатными группами и Т-основанием специфической последовательности. Справа и слева приведены данные приблизительной оценки (методом постепенного усложнения структуры лиганда) относительного вклада этих контактов в общее сродство топоI к ДНК.

Интересно, что при концентрации 1–3 мМ заметного ингибирования ферментов дезоксирибонуклеозидмонофосфатами СМР, АМР, GMP и ТМР не достигается. В то же время большая часть динуклеотидов обладает высоким сродством к тороI мыши и человека (табл. 1 и 2). ТороI образует специфические контакты только с Thy(-1)-основанием последовательности. Кроме того, при правильном связывании фосфатная группа TrT должна образовывать контакты с тремя остатками Lys и одним Asp (рис. 1) [10]. Следовательно, дитимидилаты должны иметь повышенное сродство к ферменту. Фосфорилирование динуклеотида TrT (I_{50} 300 мкМ) по 5'- (pTrT; I_{50} 34 мкМ) или 3'-концу (TrTr; I_{50} 56 мкМ) приводит к возрастанию сродства примерно в 10 и 6 раз соответственно. Таким образом, ТТ-звенья последовательности в положениях (-2, -1) могут вносить заметный вклад в сродство этой цепи к ферменту. Концевые 5'- и 3'-фосфатные группы дитимидилата образуют несколько контактов с ферментом (рис. 1), но их вклад в сродство в составе соответствующих дитимидилатов может быть несколько завышен, поскольку эти фосфатные группы имеют больший отрицательный заряд по сравнению с таковым в случае межнуклеозидных фосфатных групп ДНК. Однако, если учесть, что сродство этилированных аналогов мало отличалось от сродства обычных оли-

го(N) [1], а узнавание ДНК происходит за счет более выраженных, в данном случае диполь-дипольных, взаимодействий по сравнению с контактами, реализующимися за счет притяжения разноименно заряженных групп [1], то вклад концевого фосфата должен быть сравним с вкладом межнуклеозидных групп в составе ДНК (см. также ниже).

Интересные изменения сродства наблюдались при варьировании состава динуклеотидов. Так, величина I_{50} 24 мкМ для pArT сравнима с таковой для pTrT, но примерно на два порядка меньше, чем для pTrA (I_{50} 2600 мкМ). Похожая ситуация наблюдалась и для пары динуклеотидов pCrT (I_{50} 94 мкМ) и pTrC (I_{50} 2100 мкМ); pCrC-лиганд также проявлял относительно низкое сродство (I_{50} 820 мкМ). Поскольку тороI образует один специфический контакт с T(-1), можно предположить, что именно наличие или отсутствие Thy-основания на 3'-конце динуклеотидов является определяющим при их узнавании, тем более что Thy(-1) – единственное основание, образующее специфический контакт с ферментом в малой бороздке ДНК [10]. Однако необходимо учитывать тот факт, что конформация фосфодиэфирных связей может существенно меняться в зависимости от последовательности, и это в свою очередь может влиять на взаимодействие фосфатных групп с АК-

Таблица 1. Величины I_{50} , характеризующие сродство к тороI мыши некоторых дезоксиолигонуклеотидов, соответствующих специфической последовательности ДНК

Олигонуклеотид 5' → 3'	I_{50} , мкМ (без предынкубации) (1)	I_{50} , мкМ (с предынкубацией) (2)	Отношение $I_{50}(1)/I_{50}(2)$
GACTT (C5)	2.0	0.4	5.0
AAGTC (NC5)	110.0	10.0	11.0
AAGACTTAG (C9)	2.0	0.4	5.0
СТАAGTCTT (NC9)	2.5	0.2	12.5
C5 + NC5	9.0	1.2	7.5
C9 + NC5	0.8	0.2	4.0
C5 + NC9	35.0	2.0	17.5
C9 + NC9	0.8	0.1	8.0
C27 · NC27*	0.07	0.01	7.0
TAG	360.0	–	–
CTTAG	130.0	–	–
AAGACTTAG	2.0	–	–
ACTT	90.0	–	–
CTT	910.0	–	–
GACT	170.0	–	–
ACT	720.0	–	–
AGAC	25.0	–	–
GAC	80.0	–	–
AAGA	9.0	–	–
AGA	14.0	–	–
GA	80.0	–	–
AAG	130.0	–	–
pAG	50.0	–	–
pGG	90.0	–	–

* C27 – 5' АААААGACTTAGАААААТТТТТААAG; NC27 – 5' СТТТАААААТТТТТСТАAGTCTTTTT.

Таблица 2. Величины I_{50} характеризующие сродство к тороу человека некогорых дезоксирибонуклеотидов, включая лиганды, соответствующие специфической последовательности

Oligo(N) 5' → 3'	I_{50} , мкМ (1)	I_{50} , мкМ (2)	Отношение $I_{50}(1)/I_{50}(2)$	Oligo(N) 5' → 3'	I_{50} , M	Oligo(N)	I_{50} , M	Oligo(N)	I_{50} , M
AAGTC (NC5)	92.0	8.3	11.0	pApA	5.2×10^{-5}	AAGACCTTAGT	1.6×10^{-6}	AAGACCTTAGT	1.6×10^{-6}
GACTT (C5)	2.0	0.40	5.0	pTpT	3.4×10^{-5}	TAG	4.0×10^{-4}	ACTT	1.0×10^{-4}
СТААГСТТ (NC9)	2.1	0.17	12.3	pTpA	2.6×10^{-3}	CTT	1.0×10^{-3}	pACTT	2.0×10^{-6}
AAGACCTTAG (C9)	1.6	0.32	5.0	pApT	2.4×10^{-5}	pCTT	1.5×10^{-4}	GACT	2.0×10^{-4}
NC27*	166.0	8.3	20.0	pCpT	9.4×10^{-5}	ACT	8.0×10^{-4}	pGACT	2.1×10^{-4}
C27*	83.0	4.2	19.8	pTpC	2.1×10^{-3}	GAC	1.0×10^{-4}	AGAC	3.0×10^{-5}
C5 · NC5	7.5	1.0	7.5	pCpC	8.2×10^{-4}	AGA	1.5×10^{-5}	pAGAC	3.2×10^{-5}
C9 · NC5	0.65	0.16	4.0	pGpG	1.0×10^{-4}	AAG	1.5×10^{-4}	AAGA	1.0×10^{-5}
C9 · C5	25.0	0.6	42.0	pGpA	9.0×10^{-5}	-	-	-	-
C5 · NC9	29.0	2.0	14.5	pApG	6.0×10^{-5}	-	-	-	-
C9 · NC9	0.65	0.085	7.6	TpT	3.0×10^{-4}	-	-	-	-
NC27 · C27	0.07	0.01	7.0	TpTp	5.6×10^{-5}	-	-	-	-
AAGAAATAG	2.2	-	-	ApA	6.4×10^{-4}	-	-	-	-
AAGACTTAGp	1.6	-	-	-	-	-	-	-	-
AAGACTT	20.0	-	-	-	-	-	-	-	-
AAGACTTp	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-

* См. примечание к табл. 1.

остатками белка. Так, согласно имеющимся данным, в молекуле рАТАТ конформации сахаров чередуются: у аденозинов – С3'-эндо, у тимидинов – С2'-эндо, что отражается на величинах углов вращения вокруг Р-О-связей: $\alpha = \zeta = -60^\circ$ для АрТ-фрагментов и $\alpha = -50^\circ$, $\zeta = -120^\circ$ для ТрА-фрагментов [12]. Эти результаты подтверждены данными ЯМР для динуклеотидов рАрТ и рТрА.

Таким образом, конформация фосфатных групп ДНК в случае topoI может быть важным фактором, обеспечивающим прочное связывание с (-2, -1)-участком, а также со всей специфической последовательностью ДНК. В то же время конформация фосфатной группы динуклеотида ТрТ ближе к ТрА, чем к АрТ [12]. Таким образом, существенное различие в сродстве между близкими по структуре ТрТ и ТрА может говорить о важности образования именно специфического контакта фермента с Thy(-1), который в свою очередь может способствовать усилению контактов фермента с близко расположенными фосфатными группами.

Известно, что приведенная выше последовательность расщепляемой цепи не является абсолютной. TopoI способна расщеплять ДНК и при связывании с другими последовательностями, но при этом практически все они неизменно содержат Thy(-1)-основание [13]. По-видимому, с этим связано то, что последовательности, наиболее эффективно расщепляемые topoI, содержат в положениях (-2, -1) динуклеотиды рТрТ, рАрТ и рСрТ, обладающие наибольшим сродством к ферменту. Вероятность эффективности расщепления таких последовательностей была оценена нами из данных работ [13, 14], как 40, 26 и 15% соответственно, что в сумме составляет более 80%.

Как видно из рис. 1, еще одна из межнуклеозидных фосфатных групп расщепляемой последовательности, образующих несколько контактов с ферментом, соответствует участку [G(-5), A(-4)]. Динуклеотид рGrA (I_{50} 90 мкМ) имеет высокое сродство к topoI, но оно сравнимо с таковым для других пуриновых динуклеотидов: рArA (I_{50} 52 мкМ), рArG (I_{50} 60 мкМ) и рGrG (I_{50} 100 мкМ). Такой результат в определенной степени предсказуем, поскольку, в отличие от взаимодействия фермента с [T(-2), T(-1)]-участком, взаимодействие с [G(-5), A(-4)]-звеньями не имеет специфического характера. Эти данные в совокупности с резким увеличением сродства при переходе от АСТТ (I_{50} 100 мкМ) к GACTT (I_{50} 2 мкМ) свидетельствуют в пользу того, что пуриновые динуклеотиды, скорее всего, взаимодействуют со вторым высокоаффинным [G(-5), A(-4)]-подцентром фермента. (Здесь и далее под подцентрами подразумеваются участки ДНК-связывающего центра topoI, взаимодействующие с соответствующими основаниями специфической ДНК.) В пользу этого вывода указывает также высокое сродство фермента к три- и тетра-нуклеотидам, содержащим GrA-последовательность (табл. 1, 2). Таким образом, фермент,

скорее всего, образует наиболее прочные контакты с двумя [T(-2), T(-1)] и [G(-5), A(-4)]-участками специфической последовательности ДНК.

Учитывая это, можно предположить, что связывание коротких лигандов, содержащих Т-основание на 3'-конце, начинается с их взаимодействия с [T(-2), T(-1)]-подцентром topoI, а по мере увеличения длины во взаимодействие вовлекаются подцентры, расположенные левее [C(-3), A(-4), и т.д.]. Другие короткие oligo(N) эффективнее связываются с [G(-5), A(-4)]-подцентром и при увеличении длины должны взаимодействовать с [A(-4)...T(-1)]-подцентрами topoI. Таким образом, специфические oligo(N), соответствующие различным участкам последовательности, могут взаимодействовать в случае коротких и более длинных oligo(N) с различными подцентрами фермента. Так, олигонуклеотид АСТ (положения -4, -3, -2) при связывании должен стремиться занять первый высокоаффинный подцентр (положения -3, -2, -1), то есть сместиться на одно нуклеотидное звено относительно своего положения в составе специфической последовательности. В связи с этим сродство СТТ (I_{50} 1000 мкМ) и АСТ (I_{50} 800 мкМ) мало отличается от сродства неспецифического (рТ)₃ (I_{50} 3700 мкМ). С другой стороны, для коротких GAC (I_{50} 100 мкМ), AGA (I_{50} 15 мкМ) и AAG (I_{50} 150 мкМ) более выгодное связывание должно осуществляться во втором высокоаффинном участке (-5, -4), поэтому их сродство лежит в диапазоне, близком к таковому для (рА)₃ (I_{50} 21 мкМ). Примерно такая же ситуация наблюдается и для тетра-нуклеотидов (табл. 1 и 2). И только в случае пентануклеотида, когда узнавание происходит с участием обоих высокоаффинных центров, можно говорить о связывании каждого отдельного звена oligo(N) со своим подцентром узнавания.

Для оценки относительного вклада различных звеньев расщепляемой цепи в ее сродство к ферменту также представляется полезным сравнение величин I_{50} для oligo(N) в зависимости от их длины в ряду: ТТ → СТТ → АСТТ → GACTT → AAGACTT → AAGACTTAG. Как указано выше, ТрТ (I_{50} 300 мкМ) взаимодействует с первым высокоаффинным подцентром [T(-2), T(-1)], образуя четыре контакта с фосфатной группой и специфическую связь с Thy-основанием. Добавление концевой фосфатной группы, которая по данным РСА образует один контакт с ферментом, привело к увеличению сродства рТрТ (I_{50} 34 мкМ).

В то же время эффективность связывания три-нуклеотида СТТ (I_{50} 1000 мкМ) существенно ниже. В случае перехода от рGrA (I_{50} 90 мкМ) к три-нуклеотидам AGA (I_{50} 15 мкМ), AAG (I_{50} 150 мкМ) или GAC (I_{50} 100 мкМ), которые, по-видимому, связываются во втором высокоаффинном подцентре [G(-5), A(-4)], такого резкого падения сродства не происходит. Как уже обсуждалось в сообщении I [1], это может быть связано с максималь-

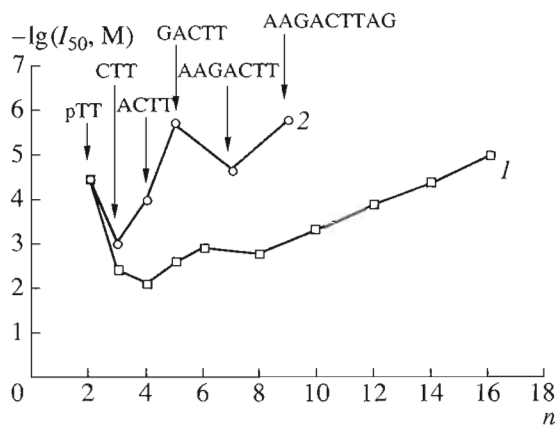


Рис. 2. Сродство неспецифических (рТ)_n (1) и специфических (2) олигонуклеотидов к topoI человека в зависимости от числа звеньев (n) в их составе.

ной изогнутостью [T(-2), T(-1)]-участка активного центра topoI, взаимодействующего с TT-частью специфической последовательности. Уменьшение степени изогнутости ДНК-узнающего центра фермента происходит при удалении от сайта расщепления как схематично показано на рис. 3а статьи [1]. Следует отметить, что эффективность взаимодействия фермента с короткими (pN)₁₋₂ не должна существенным образом зависеть от степени изогнутости конкретного участка узнающего центра, с которым они взаимодействуют (рис. 3г, е статьи [1]). В то же время, чем длиннее oligo(N), тем должна быть больше выражена зависимость эффективности его взаимодействия от возможности лиганда быть правильным образом изогнутым (рис. 3б, в, г статьи [1]) и от степени изогнутости непосредственно участка (рис. 3д, ж статьи [1]), с которым он взаимодействует. Учитывая это, следует полагать, что одним из факторов, влияющих на эффективность взаимодействия topoI с oligo(N), является их исходная конформация в растворе и возможность ее подстройки к оптимально изогнутой конформации специфической последовательности в составе ссДНК, которая необходима для эффективного взаимодействия с topoI. В пользу существенных изменений конформации oligo(N) в комплексе с topoI свидетельствует возрастание сродства этих лигандов к ферменту после предынкубации их смеси (см. ниже). При этом наблюдается более существенное возрастание сродства специфических (в ~5–42 раза) по сравнению с неспецифическими oligo(N) (в ~3 раза).

Эти данные свидетельствуют о возможности существенных различий ферментзависимых изменений конформации oligo(N) в зависимости от их структуры и длины. На рис. 2 приведены зависимости, демонстрирующие изменение относительного сродства topoI человека к специфическим oligo(N) и неспецифическим (pT)_n в зависимости от их длины. Все эти oligo(N) содержат 3'-концевые TT-динуклеотиды и, согласно рассмотренным выше данным, должны взаимодействовать с

одними и теми же подцентрами активного центра, включая (-1, -2)-участок. Несмотря на то что характер кривых для этих oligo(N) сопоставим (рис. 2), сродство неспецифических (pT)_n при каждом значении n примерно на 1–2 порядка ниже. Следовательно, специфичность взаимодействия topoI с последовательностью обеспечивается на уровне конформации ДНК, а неспецифические (pT)_n, в отличие от специфических oligo(N), не могут оптимально изменять структуру под действием фермента, и их связи с ферментом существенно ослаблены (рис. 3б статьи [1]) по сравнению с таковыми для специфических oligo(N) (рис. 3в статьи [1]).

Учитывая рассмотренные выше результаты, следует полагать, что специфическое узнавание ферментом ссДНК, скорее всего, “запускается” взаимодействием topoI с [T(-2), T(-1)]-звеньями специфической последовательности. Последующее усиление связывания, по-видимому, происходит за счет образования контактов фермента с [G(-5), A(-4)]-звеньями расщепляемой цепи. Отсутствие эффективных контактов topoI с [A(-4), C(-3)]-звеньями на уровне oligo(N) в случае СТТ и АСТТ и резкое возрастание сродства в случае GACTT, может указывать в пользу того, что обнаруженные с помощью РСА (рис. 1) взаимодействия межнуклеозидных фосфатных групп динуклеотидных фрагментов ApC (2 контакта) и CpT (1 контакт) в случае протяженной последовательности являются кооперативнозависимыми от контактов фермента с фосфатной группой Gp(-5)-звена. Исходя из данных для различных коротких ди- и тринуклеотидов, суммарная эффективность всех взятых по отдельности контактов (в терминах I₅₀), образуемых специфическими пента- или нонануклеотидами с topoI, должна быть примерно на 1–2 порядка больше, чем экспериментально измеренное сродство для данных лигандов. Это может быть следствием ряда причин, указанных выше.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что взаимозависимые конформационные изменения фермента и расщепляемой цепи ДНК могут иметь кооперативно-разнонаправленный характер. Так, согласно данным РСА, [A(-7), A(-6)]-звенья не взаимодействуют с ферментом, однако переход от GACTT (I₅₀ 2.0 мкМ) к AAGACTT (I₅₀ 20 мкМ) приводит к понижению сродства oligo(N). В то время как переход от TrT к TrTr увеличивает сродство лиганда в 6 раз, слабое изменение сродства наблюдается при переходе от GACTT к AAGACTTAG (I₅₀ 1.6 мкМ), но в то же время величина I₅₀ уменьшается в 12 раз при добавлении [A(+1), G(+2)]-звеньев к олигонуклеотиду AAGACTT.

Следует отметить, что определенные дополнительные эффекты усиления и/или ослабления контактов, образованных ферментом со специфической последовательностью расщепляемой цепи, могут происходить как под влиянием участков ДНК, фланкирующих эту последователь-

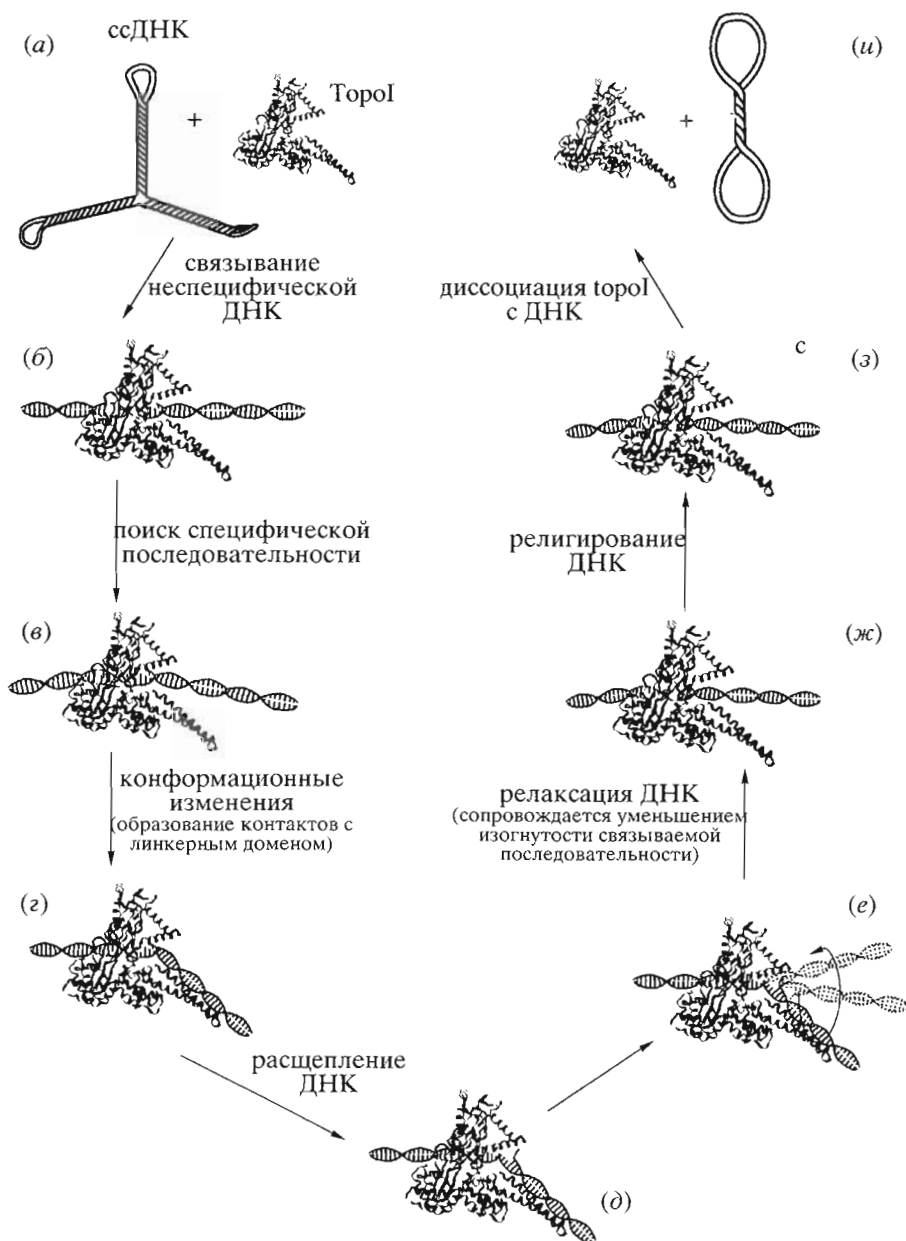


Рис. 3. Схематическое изображение различных этапов узнавания ссДНК эукариотической topoI, ее разрезания и последующей релаксации.

При создании рисунка использованы данные PCA [10] в виде 1A36.pdb (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

ность, так и комплементарной ей цепи (см. ниже). Тем не менее на основе совокупности полученных нами данных для oligo(N) различной структуры и длины можно провести приблизительную оценку относительного вклада различных нуклеотидных звеньев специфической последовательности расщепляемой цепи в эффективность ее взаимодействия с ферментом. Величина I_{50} для AAGACTTAG равна 1.6×10^{-6} М, что, вероятно, может характеризовать взаимодействие фермента с этой последовательностью в составе релаксированной ДНК. В суперскрученном состоянии конформация специфической последовательности ДНК изменяется, что приводит к усилению образовавшихся контактов

(см. ниже). В то же время, используя короткие фрагменты последовательности, взаимодействие которых с ферментом не должно сильно отличаться от соответствующих участков в ссДНК, согласно предложенной нами схеме узнающего центра (рис. 3 статьи [1]), можно приблизительно оценить вклад в средство к ферменту отдельных звеньев специфической последовательности в составе ссДНК.

На взаимодействие фермента с TrT-участком приходится около 4 порядков ($I_{50} 3.0 \times 10^{-4}$ М), что соответствует образованию связей фермента с фосфатной группой и специфического контакта с остатком тимидина. Средство СТТ-лиганда должно увеличиваться за счет дополнительного контакта с фо-

сфатной группой, однако в итоге приводит к падению эффективности связывания. Вероятно, данный участок связывания на ферменте наиболее чувствителен к изменению изогнутости субстрата (рис. 3г, д статьи [1]), что и препятствует правильному комплексообразованию. В то же время, используя лиганды, содержащие концевые фосфатные группы, можно более правильно оценить средство соответствующих звеньев, поскольку концевой фосфат обладает повышенной конформационной лабильностью. Следовательно, вклад фосфатной группы между С(-3) и Т(-2)-звеньями можно оценить по разнице средства для рТрТ ($I_{50} 3.4 \times 10^{-5}$ М) и ТрТ ($I_{50} 3.0 \times 10^{-4}$ М), что составляет $\sim 1.1 \times 10^{-1}$ М. Необходимо отметить, что вклад концевой фосфатной группы может быть несколько завышен по сравнению с межнуклеозидной группой за счет увеличенного отрицательного заряда. Однако в случае topoI этилирование фосфатных групп не приводит к значительному изменению средства oligo(N) [1]. Следовательно, количество отрицательно заряженных групп, по-видимому, не является критическим фактором, а связывание достигается в основном за счет образования слабых водородных связей. Данное предположение согласуется с данными по сравнению эффективности ингибирования фермента рСТТ ($I_{50} 1.5 \times 10^{-4}$ М) и АСТТ ($I_{50} 1.0 \times 10^{-4}$ М), а также рАСТТ ($I_{50} 2.0 \times 10^{-6}$ М) и ГАСТТ ($I_{50} 2.0 \times 10^{-6}$ М).

Поскольку переход от рТрТ к различным рТрN ведет к падению средства примерно в 60–75 раз, вклад специфического псевдо-уотсонкривского контакта фермента с Т(-1)-звеном может быть оценен близким к $1-2 \times 10^{-2}$ М, а на 4 контакта фосфатной группы ТрТ с АК-остатками фермента приходится около $2-5 \times 10^{-2}$ М. Вклад фосфатных групп в фрагментах [A(-4)рC(-3)] и [G(-5)рA(-4)] может быть оценен из разницы средства в парах лигандов СТТ и АСТТ, АСТТ и ГАСТТ или по различию в средстве oligo(N), содержащих и не содержащих концевую фосфатную группу. Рассчитанные таким образом величины составили $\sim 1-2 \times 10^{-1}$ М для [A(-4)рC(-3)] и $\sim 2 \times 10^{-2}$ М для [G(-5)рA(-4)]. Вклад фосфатной группы в фрагменте [T(-1)рA(+1)] может быть близок к 0.1–0.2 М, что следует из сравнения соответствующих величин для пар ТТ и ТТр или ААГАСТТ и ААГАСТТр. Вклад остальных контактов расщепляемой цепи трудно оценить, исходя из имеющихся данных, но представляется, что он не должен быть существенным, исходя из предложенного ранее [10] механизма топоизомеризации, который обеспечивается свободным вращением расщепляемой цепи ДНК вокруг нерасщепляемой цепи. Вклад нерасщепляемой цепи сравним с таковым для неспецифической ДНК и составляет $\sim 10^{-2}$ М (см. ниже). Рассмотренные выше данные по относительному вкладу различных структурных элементов последовательности в общее средство специфической ДНК суммированы на рис. 1. Произведение всех величин I_{50} , характеризующих

рассмотренные контакты, составляет $\sim 10^{-9}$ М, что, вероятно, может приближенно характеризовать суммарную эффективность этих контактов на уровне ссДНК. В целом, проведенные нами относительные количественные оценки эффективности контактов коррелируют с числом контактов фермента с определенными структурными элементами нуклеотидных звеньев расщепляемой последовательности, обнаруженных РСА [10].

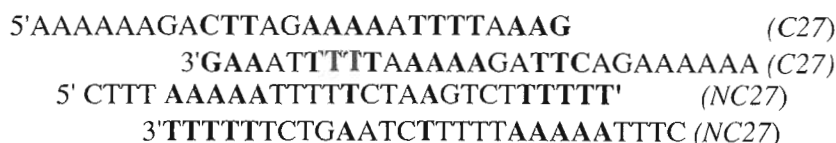
Взаимодействие topoI с двухцепочечными олигонуклеотидами. Как видно из данных табл. 1 и 2, в целом, средство дуплексов возрастает при увеличении их длины и достигает максимальной величины в случае C27 · NC27* ($I_{50} 0.07$ мкМ). В то же время для некоторых одно- и двухцепочечных oligo(N) значения I_{50} на первый взгляд выглядят трудно интерпретируемыми. Например, средство к topoI длинных одноцепочечных лигандов C27 · NC27 примерно на два порядка ниже, чем для C5 и C9, а ингибиторные свойства смесей C9 + C5 и C5 + NC9 существенно хуже, чем таковые для соответствующих им одноцепочечных oligo(N).

Для понимания этого феномена необходимо предварительно проанализировать влияние topoI на ингибиторные свойства oligo(N) и их смесей. Как было показано ранее, ингибирующий эффект oligo(N) возрастает с увеличением времени предынкубации и достигает плато примерно после 15 мин предынкубации [7, 9]. Интересно, что этот эффект не связан ни с инактивацией фермента, ни с образованием его ковалентных аддуктов с oligo(N). Как видно из табл. 1 и 2, несмотря на то, что температура плавления коротких дуплексов (C9 + NC5 и C9 + NC9) ниже температуры проведения реакции (30°C), их средство к ферменту в 4–20 раз выше, чем для соответствующих одноцепочечных oligo(N). Заметное повышение средства после предынкубации происходит даже в случае смесей коротких неспецифических oligo(N) [1]. Следует отметить, что эффект возрастания средства наблюдается и для специфических (табл. 1 и 2) и для неспецифических одноцепочечных лигандов (в 2–3 раза) [1], но он существенно меньше, чем в случае смесей комплементарных oligo(N). Иначе говоря, смеси коротких oligo(N) ведут себя не как одноцепочечные олигонуклеотиды, а как преформированные комплексы. Это говорит в пользу того, что фермент способен “собирать” комплементарные одноцепочечные oligo(N) в виде дуплексов, а затем стабилизировать эти дуплексы. Стабилизация дуплексов ферментом, скорее всего, усиливается в результате изменения их конформации под действием фермента.

Как было отмечено выше, одноцепочечные лиганды C27 и NC27 и смесь олигонуклеотидов C5 + C9 имеют низкое средство к topoI по сравне-

* Здесь и далее для обозначения расщепляемых и нерасщепляемых цепей дуплексов введены символы C (Cleavage) и NC (Non-Cleavage); цифры при них обозначают длину нуклеотида.

нию с короткими oligo(N). В то же время предынкубация этих oligo(N) приводит к возрастанию их сродства в 20–40 раз и соответствующие им величины I_{50} становятся сопоставимыми с таковыми для коротких oligo(N) (табл. 1 и 2). В связи с этим следует отметить, что одноцепочечные лиганды C27 и NC27 частично самокомплементарные oligo(N) и способны в растворах образовывать как различного рода неправильные дуплексы, содержащие две цепи, так и внутримолекулярные структуры типа



В то же время следует полагать, что отсутствие полной комплементарности цепей в таких дуплексах, скорее всего, является причиной их более низкого сродства к ферменту по сравнению с полностью комплементарным дуплексом C27 · NC27 (даже после предынкубации этих oligo(N) с ферментом, см. табл. 1 и 2). Таким образом, рассмотренные выше данные говорят о том, что topoI является конформационно активным белком, и в процессе комплексообразования фермент и ДНК подвергаются существенным конформационным изменениям. Поскольку оптимальным субстратом для topoI является ссДНК, содержащая изогнутые участки, следует полагать, что в процессе предынкубации происходит изменение структуры одно- и двухцепочечных oligo(N) до конформации, которая характерна для оптимального ссДНК-субстрата.

Сравнение взаимодействия topoI со специфическими и неспецифическими олигонуклеотидами. Взаимодействие topoI мыши и человека с неспецифическими oligo(N) различной структуры и длины подробно обсуждалось ранее [1]. Показано, что, несмотря на существующие различия в узнавании ферментами неспецифической ДНК, которые могут быть обусловлены конформационными эффектами, основные параметры узнавания, включая эффективность взаимодействия topoI мыши и человека с различными структурными элементами ДНК, а также принцип аддитивности таких взаимодействий при узнавании протяженной ДНК, достаточно схожи.

В конечном итоге, topoI взаимодействует с любой из межнуклеозидных фосфатных групп неспецифических одноцепочечных $(pN)_n$ с одинаковой эффективностью, которая характеризуется электростатическим фактором: $K_d = 1/e = 1/1.67 = 0.6 \text{ M}$ [1]. Взаимодействия topoI мыши с гидрофобными основаниями $(pN)_n$ характеризуются меньшей эффективностью ($h_C 1.02$; $h_T 1.16$; $h_G 1.27$; $h_A 1.40$), а в случае неспецифических дуплексов сродство полностью обеспечивается взаимодействием фер-

ментом. Принимая во внимание рассмотренные выше данные о способности topoI стабилизировать правильные комплементарные комплексы, следует полагать, что во время предынкубации под действием фермента происходит разрушение различного рода неправильных комплексов и сборка максимально комплементарных дуплексов, состоящих из двух частично комплементарных цепей (жирным шрифтом выделены комплементарные зоны):

мента с межнуклеозидными фосфатными группами каждой из цепей ДНК [1].

Разница в сродстве topoI мыши к неспецифическому дуплексу $(pA)_9 \cdot (pT)_9$ ($I_{50} 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) по сравнению со специфическим дуплексом $C9 \cdot NC9$ ($I_{50} 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$) после их предынкубации с ферментом, когда они стабилизируются topoI в виде дуплексов, составляет ~2 порядка. Различие в эффективности узнавания ферментом одноцепочечных лигандов $(pA)_9$ и $C9$ также около 2 порядков. Следовательно, вклад нерасщепляемой цепи специфических и неспецифических дуплексов, скорее всего, сопоставим (10^{-2} M) и, согласно [1], может быть оценен как $(1/e)^n$. Полученная величина, по-видимому, справедлива и для topoI человека, поскольку сродство специфических oligo(N) для этих ферментов практически не отличается.

В целом, взаимодействие topoI с неспецифическими двухцепочечными $(pN)_n$ определяется в основном слабыми и сравнимыми по эффективности аддитивными взаимодействиями с межнуклеозидными фосфатными группами, $K_d 0.6 \text{ M}$ ($\Delta G^\circ -0.3 \text{ ккал/моль}$) [1]. В то же время, как следует из данных PCA [10] и рассмотренных выше результатов, на уровне специфических oligo(N) topoI образует с некоторыми из фосфатных групп лиганда от 1 до 4 водородных связей с эффективностью от 0.1 до 0.02 M (рис. 1). Следовательно, при переходе от неспецифических к специфическим oligo(N) эффективность контактов возрастает в ~6–30 раз. Величина $\Delta G^\circ -0.3 \text{ ккал/моль}$ характерна для слабых ион-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий [5, 6].

Поскольку ДНК-связывающий центр topoI содержит большое число положительно заряженных АК-остатков [10], можно было бы предположить, что в случае неспецифических oligo(N) водородные связи между ферментом и межнуклеозидными фосфатными группами лиганда вообще не образуются, а слабые аддитивные взаимодействия этих групп ДНК с topoI относятся к ион-дипольным и диполь-дипольным взаимодействиям. Взаимодействие отрицательно заряженных фосфат-

ных групп неспецифических ДНК с положительно заряженной поверхностью ДНК-узнающих центров также можно отнести к взаимодействиям не непосредственно контактирующих групп, а противоположно заряженных поверхностей биополимеров. Водородные связи между *topoI* и ДНК, в принципе, могут быть образованы после изменения структуры субстрата и фермента и, как следствие, сближения межнуклеозидных фосфатных групп с соответствующими АК-остатками фермента. В то же время эффективность большей части водородных связей, обнаруженных РСА [10], относительно низкая. Так, например, если предположить, что все 4 водородные связи между АК-остатками фермента и (-1, -2)-фосфатной группой ДНК-субстрата близки по эффективности, то образование каждой из них приведет к возрастанию сродства фермента к лиганду в ~2.1–2.7 раз (K_d 0.37–0.48 М; ΔG° -0.4...-0.6 ккал/моль). Эти величины вполне сопоставимы с таковыми для слабых аддитивных контактов *topoI* с межнуклеозидными фосфатными группами *oligo(N)*. Учитывая это, нельзя исключить, что из нескольких (например, четырех) водородных связей фермента с определенными межнуклеозидными фосфатными группами в случае неспецифических *oligo(N)* образуется лишь только часть слабых водородных связей с отдельными АК-остатками, а остальные связи формируются только на уровне специфических ДНК после изменения их структуры. Следует подчеркнуть, что термодинамический анализ эффективности образования специфических и неспецифических контактов между различными ферментами и специфическими и неспецифическими протяженными ДНК не позволяет однозначно интерпретировать характер таких очень слабых взаимодействий. Тем не менее электростатические факторы e (1.5–2.1), отражающие взаимодействия ферментов с одной фосфатной группой для всех исследованных ферментов [5, 6], включая *topoI* ($e = 1.67$), сопоставимы. Следовательно, можно предположить, что различные ферменты могут взаимодействовать с межнуклеозидными фосфатными группами неспецифических ДНК как за счет сопоставимых по эффективности слабых ион-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий, так и водородных связей. Поскольку ДНК-связывающий центр *topoI* имеет положительный заряд, а некоторые АК-остатки могут образовывать с ДНК водородные связи [10], можно предположить, что слабые аддитивные взаимодействия могут быть суперпозицией слабых ион-дипольных и/или диполь-дипольных групп противоположно заряженных поверхностей фермента и ДНК и очень слабых водородных связей, которые усиливаются в случае специфических ДНК, приобретаая при этом характер в определенной степени специфических взаимодействий.

Следует отметить общую закономерность, выявленную нами. В отличие от образования

сильных электростатических контактов ($K_d \approx 0.1$ – 0.01 М) и водородных связей ($K_d \approx 0.1$ – 1×10^{-5} М) между ферментами и маленькими по размеру лигандами [5, 6], основная часть специфических контактов ферментов, узнающих протяженные ДНК, являются слабыми [5, 6]. При этом одна псевдо-уотсон-криковская водородная связь, образуемая *topoI* с T(-1)-основанием ($K_i \approx 1$ – 2×10^{-2} М), значительно прочнее аналогичного рода связей ферментов репарации и рестрикции со специфическими звеньями соответствующих последовательностей [5, 6].

Комплексы *topoI* с неспецифическими *oligo(N)*, скорее всего, следует рассматривать как модель первичных комплексов фермента с ДНК, не подвергнутых существенным перестройкам под действием фермента, хотя определенные изменения фермента и *oligo(N)* имеют место уже на уровне неспецифических лигандов. В пользу этого указывает увеличение после предынкубации сродства фермента к ортофосфату в 2.5 раза. Поскольку предынкубация любых неспецифических (pN)_n также увеличивает их сродство примерно в 3 раза [1], можно предположить, что в случае неспецифических *oligo(N)* изменение их конформации под действием фермента приводит к увеличению эффективности взаимодействия *topoI*, в основном, с одной из межнуклеозидных фосфатных групп. Более глубокие изменения фермента и лигандов, по-видимому, происходят при предынкубации коротких специфических *oligo(N)* и их дуплексов, ингибирующее действие которых возрастает в ~5–12, а длинных в 20–40 раз (см. выше). В основе усиления контактов специфических *oligo(N)* могут лежать дополнительные кооперативно-координированные взаимодействия их отдельных нуклеотидных звеньев с ферментом, которые, как показано выше, имеют место уже на уровне коротких специфических (pN)_n. Такие взаимозависимые структурные изменения фермента и ДНК-лигандов могут влиять и на комплексные взаимодействия между цепями. Тем не менее, поскольку короткие специфические *oligo(N)* и их дуплексы не являются субстратами исследованных ферментов, очевидно, что окончательного доведения структуры этих лигандов и достижения правильной ориентации межнуклеозидной фосфатной группы [T(-1), A(+1)]-фрагмента специфической последовательности относительно гидроксильной группы остатка Туг активного центра фермента в случае двухцепочечных *oligo(N)* не происходит. Проведенный нами анализ данных РСА комплекса *topoI* с ДНК, представленных в виде “Protein Data Base Files”, а также расчет геометрии взаимодействия групп фермента и ДНК в активном центре *topoI* с использованием значений пространственных координат атомов (данные РСА) показал, что достижение каталитически компетентного состояния ДНК-субстрата может происходить только после придания субстрату определенной специфической структуры, включающей изогнутость, которая реализуется на уровне ссДНК (будет опубликовано отдельно).

Интересно, что с точки зрения конформационно-кооперативного доведения структуры субстрата под действием фермента до оптимальной конформации *toroI* не похожа на другие ранее исследованные нами ферменты репарации и рестрикции [5, 6]. В то же время взаимодействие *toroI* со специфической ДНК очень похоже на взаимодействие, реализующееся в случае интегразы ВИЧ [15]. Этот фермент узнает с высокой эффективностью 3'-концевые специфические тетра-нуклеотиды *CAGT* ($K_d \approx 10^{-5}$ М), соответствующие расщепляемой цепи провирусной ДНК. Дальнейшее возрастание сродства специфических одно- и двухцепочечных *oligo(N)* ($K_d \approx 10^{-9}$ М) происходит при увеличении их длины до 25 звеньев. Однако при соответствии дополнительных 22 звеньев специфической последовательности ДНК возрастание сродства происходит быстрее, чем для неспецифических *oligo(N)*, поскольку только специфические звенья ДНК увеличивают кооперативным образом сродство фермента к 3'-концевому динуклеотиду *GT*. Тем не менее уже минимальные специфические дуплексы, стабильные при 30°C, являются субстратами интегразы. Таким образом, требование к изогнутости структуры субстрата в случае эукариотических *toroI*, как следует полагать, является основной причиной отсутствия субстратных свойств у относительно коротких дуплексов. Однако, по-видимому, эта особенность характерна только для *toroI* высших организмов, поскольку известно, что аналогичные ферменты прокариот эффективно используют модельные дуплексы в качестве субстратов [16].

Относительный вклад различных структурных элементов ДНК в ее общее сродство к топоизомеразам. Подводя итог рассмотренным выше данным, следует подчеркнуть, что высокоэффективное комплексообразование *toroI* с ДНК обеспечивается с помощью нескольких наиболее важных факторов. Это неспецифические и специфические взаимодействия, фактор конформационных преобразований и специфическая структура ДНК в топологически напряженном состоянии. Неспецифические взаимодействия могут быть важны на первом этапе связывания с ДНК и представляют собой слабые аддитивные контакты, которые при переходе к специфическим участкам должны усиливаться. Сродство ферментов к неспецифическим лигандам достаточно высокое; величины I_{50} , например, для *toroI* мыши $(pA)_{10}$ и дуплекса $(pA)_{10} \cdot (pT)_{10}$, равны 8.5×10^{-5} и 1.0×10^{-5} М соответственно. Таким образом, вклад неспецифических аддитивных контактов *toroI* с 10 парами оснований центральной части дуплекса может быть оценен близким к пяти порядкам ($K_d \sim 10^{-5}$ М). В случае *toroI* человека сродство таких лигандов ниже, особенно для дуплексов, что отражает повышенные требования фермента к определенной конформации ДНК. Усиление этих контактов и/или образование дополнительных контактов фермента в случае 10 пар оснований спе-

цифических *oligo(N)* приводит к возрастанию их сродства примерно на порядок ($K_d \sim 10^{-6}$ М). В случае более протяженного специфического дуплекса (*NC27* × *C27*), сродство выше приблизительно в 10 раз ($K_d \sim 10^{-7}$ М), что может быть связано с большей устойчивостью двойной спирали, а также с образованием дополнительных контактов. Предынкубация, в ходе которой происходит взаимная адаптация фермента и ДНК, приводит к повышению сродства еще на один порядок ($K_d \sim 10^{-8}$ М). Предполагается, что в процессе предынкубации может происходить изменение структуры ДНК до конформации, реализующейся в суперскрученном состоянии. Таким образом, данный порядок можно отнести к проявлению специфичности фермента к ссДНК. Следовательно, разница в сродстве между суперскрученной и релаксированной ДНК должна составлять примерно 100–1000 раз. Таким образом, вклад специфических взаимодействий *toroI* со структурными элементами ссДНК ($K_d \sim 10^{-10}$ М [17]) не превышает 2–3 порядков. Специфичность на данном этапе может обеспечиваться двумя факторами. В первую очередь, это усиление контактов за счет разницы в изогнутости между релаксированной и ссДНК при взаимодействии субстрата с основным ДНК-узнающим центром *toroI*. В этом случае прочность контактов фермента с ДНК может усиливаться при топологическом стрессе с $\sim 10^{-7}$ М до $\sim 10^{-9}$ М. Дополнительный порядок сродства обеспечивается контактами ссДНК с линкерным доменом *toroI* (рис. 3а статьи [1]; рис. 3г).

В целом, высокое сродство *toroI* к ссДНК обеспечивается суммой всех перечисленных выше факторов: 10^{-5} М × 10^{-2} × $(10^{-2} \times 10^{-1}) = 10^{-10}$ М (табл. 3).

Видно, что специфичность действия *toroI*, как и в случае других ферментов, не может быть обеспечена на стадии комплексообразования. При переходе от специфических к частично специфичным субстратам происходит падение скорости реакции на 3–4 порядка, и еще более сильное уменьшение скорости происходит в случае полностью неспецифических последовательностей. Это свидетельствует о том, что, как и в случае других исследованных нами ферментов, специфичность действия *toroI* в основном обеспечивается на стадии катализа, что требует отдельного детального рассмотрения.

Анализ механизма действия топоизомераз. На основании полученных нами данных, а также результатов РСА, можно предложить следующую схему узнавания и релаксации ДНК *toroI* (рис. 3). Скорее всего, *toroI*, как и большое число других ферментов [5, 6], на первом этапе может связываться с любой последовательностью ДНК и затем “скользить” по ней до специфического участка. Однако *toroI* более эффективно связывает и расщепляет последовательности ДНК, содержащие изогнутые участки, которые в составе ссДНК при нормальной степени суперспирализации обычно локализованы в петлевых участках

дуплекса и легко доступны для взаимодействия с ферментом, в то время как другие участки двойной спирали сильно перекручены между собой [18, 19] (рис. 3а). Это может быть важно на этапе образования первичного комплекса *topoI* с ДНК, сокращая число вероятных участков связывания. Известно, что для осуществления первоначально связывания *topoI* с ДНК необходим переход фермента в “открытую” конформацию, что достигается при разрушении взаимодействий между субдоменами I и III и их расхождении, освобождающем доступ к центру связывания [10]. Поскольку АК-остатки, контактирующие с ДНК, расположены на обоих субдоменах, первые контакты с субстратом возможны лишь с одним из них. По-видимому, первоначальные контакты с ДНК образуют АК-остатки субдомена III, включающие слабые аддитивные контакты с фосфатными группами нерасщепляемой и (-1, +1)-участком расщепляемой цепей. Эти контакты менее специфичны и поэтому могут обеспечить достаточно высокое сродство фермента практически к любой ДНК [1]. Один сильный контакт фермента с Thy(-1)-основанием расщепляемой цепи может играть важную роль в первичном отборе ферментом Т-содержащих последовательностей на этой стадии, поскольку все специфические последовательности, расщепляемые *topoI*, содержат Thy-основание в (-1)-положении [13, 14].

Переход фермента в закрытую конформацию должен сопровождаться установлением контактов АК-остатков субдомена I с остальными звеньями расщепляемой цепи ДНК, не взаимодействующими с субдоменом III. На данной стадии только наличие изогнутости специфической последовательности, конформация которой являет-

ся оптимальной для связывания, может обеспечить полноценный переход фермента в “закрытую” конформацию и, следовательно, обеспечить протекание каталитической стадии реакции. Поскольку изогнутость спирали ДНК хорошо обеспечивается ее топологическим напряжением, *topoI* должна проявлять высокие требования как к последовательности связываемой ДНК, так и к структуре ДНК, реализуемой при топологическом стрессе. На более позднем этапе, скорее всего, происходит дополнительное усиление связывания ДНК с ферментом за счет образования контактов между В-участком специфической последовательности субстрата и линкерным доменом фермента (рис. 3з). Все перечисленные выше факторы важны для последовательной многостадийной реализации конформационных изменений субстрата и фермента, обеспечивающих сближение реагирующих групп в активном центре и образование ковалентного интермедиата *topoI*-ДНК (рис. 3д). Процесс релаксации (рис. 3е) происходит согласно модели “контролируемого вращения” ДНК [10]. При этом происходит сбрасывание нескольких супервитков. Релаксация ДНК (рис. 3з) приводит к уменьшению топологического напряжения ДНК и снижает степень изогнутости специфической последовательности, что в дальнейшем облегчает реакцию религирирования и диссоциацию фермента с релаксированной ДНК (рис. 3и).

Подводя итог, следует отметить, что специфичность действия *topoI* обеспечивается как дискриминацией ферментом различных последовательностей ДНК на стадии комплексообразования, так и значительным уменьшением скорости реакции при невозможности реализации конформационной адаптации (например, в случае ДНК,

Таблица 3. Приблизительная оценка относительного вклада различных факторов (в терминах сродства, I_{50}), характеризующих специфические и неспецифические взаимодействия топоизомераз мыши и человека с ДНК

TopoI	Контакты ферментов с ДНК		I_{50} , М	Фактор возрастания сродства*
Мышь	Неспецифические	оцДНК	8.5×10^{-5}	8.5
		дцДНК	1.0×10^{-5}	
	Специфические	оцДНК	2.0×10^{-6}	50
		дцДНК	7.0×10^{-8}	29
Человек	Усиление контактов после предынкубации “Топообраз” ссДНК	дцДНК	1.0×10^{-8}	7
		дцДНК	10^{-10}	100
	Неспецифические	оцДНК	5.0×10^{-4}	<0.5
		дцДНК**	$>1.0 \times 10^{-3}$	
	Специфические	оцДНК***	1.6×10^{-6}	312
		дцДНК	7.0×10^{-8}	23
	Усиление контактов после предынкубации “Топообраз” ссДНК	дцДНК	1.0×10^{-8}	7
		дцДНК	10^{-10}	100

* Фактор возрастания сродства на каждом этапе при усложнении структуры лиганда при постепенном переходе от неспецифических лигандов к ссДНК.

** Трудно интерпретируемое уменьшение сродства двухцепочечных oligo(N) по сравнению с одноцепочечными неспецифическими олигонуклеотидами.

*** Увеличение сродства для двухцепочечных специфических лигандов оценено по отношению к неспецифическим одноцепочечным oligo(N).

лишенных топологического стресса), однако вклад второго фактора существенно выше.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, SDS, дитиотреит, глицерин, бромфеноловый синий, бычий сывороточный альбумин ("Sigma"), EDTA ("Serva"), агарозу ("Lachema"), остальные реактивы были квалификации "ос. ч."

Условия определения топоизомеразной активности. Получение и характеристика topoI мыши и человека, олигонуклеотидов и ссДНК описаны в работе [1]. Активность topoI и ингибирующий эффект oligo(N) оценивали по степени перехода ссДНК в релаксированную форму при 30°C согласно работе [1]. Предынкубацию фермента с олигонуклеотидами проводили в стандартной реакционной смеси, не содержащей ссДНК, в течение 15 мин при 20°C. Затем реакцию запускали добавлением ДНК-субстрата, и смесь дополнительно инкубировали 15 мин при 30°C [7]. Оценку количества суперскрученной и релаксированной ДНК проводили после разделения продуктов реакции электрофорезом с последующим сканированием изображения [1].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана научной программой Минобразования РФ "Университеты России – фундаментальные исследования" № 015.07.01.23, грантом Минобразования РФ "Фундаментальные исследования в области естественных наук" № ЕОО-5.0-76, а также грантом для молодых ученых СО РАН и грантом РФФИ № 03-04-49610.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугреев Д.В., Бунева В.Н., Синицина О.И., Невинский Г.А. // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. С. 163–174.
2. Wang J.C. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 635–692.
3. Andoh T., Ikeda H., Aguro M. // Molecular Biology of DNA Topoisomerase and Its Application to Chemotherapy. Boca Raton: CRC Press, 1993.
4. Wang H.K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. // Med. Res. Rev. 1997. V. 17. P. 367–425.
5. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 291–305.
6. Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1995. Т. 29. С. 16–37.
7. Nevinsky G.A., Bugreev D.V., Buneva V.N., Yasui Y., Nishizawa M., Andoh T. // FEBS Lett. 1995. V. 368. P. 97–100.
8. 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.
9. Bugreev D.V., Vasyutina E.L., Kolocheva T.I., Buneva V.N., Andoh T., Nevinsky G.A. // Biochimie. 1998. V. 80. P. 303–308.
10. Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G., Champoux J.J. // Science. 1998. V. 279. P. 1534–1541.
11. Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J.J., Hol W.G. // Science. 1998. V. 279. P. 1504–1513.
12. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер с англ. М.: Мир, 1987.
13. Shen C.C., Shen C.K. // J. Mol. Biol. 1990. V. 212. P. 67–78.
14. Perez-Stable C., Shen C.C., Shen C.-K.J. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 7975–7993.
15. Caumont A., Jamieson G., Richard de Soultrait V., Parissi V., Fournier M., Zakharova O.D., Bayandin R., Litvak S., Tarrago-Litvak L., Nevinsky G.A. // FEBS Lett. 1999. V. 455. P. 154–158.
16. Tse-Dinh Y.C., McCarron B.G., Arentzen R., Chowdhry V. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. P. 8691–8701.
17. Madden K.R., Stewart L., Champoux J.J. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 5399–5409.
18. Yang Y., Westcott T.P., Pedersen S.C., Tobias I., Olson W.K. // Trends Biochem. Sci. 1995. V. 20. P. 313–319.
19. Pfannschmidt C., Langowski J. // J. Mol. Biol. 1998. V. 275. P. 601–611.

The Mechanism of Supercoiled DNA Recognition by Eukaryotic Type I Topoisomerases: II. A Comparison of the Enzyme Interaction with Specific and Nonspecific Oligonucleotides

D. V. Bugreev*, O. I. Sinitsyna**, V. N. Buneva*, and G. A. Nevinsky**

Phone: +7 (383-2) 39-6226, fax: +7 (383-2) 33-3677, e-mail: nevinsky@niboch.nsc.ru

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

Data on the interaction of DNA type I topoisomerases from the murine and human placenta cells with specific and nonspecific oligonucleotides of various structures and lengths are summarized. The relative contributions of various contacts between the enzymes and DNA that have previously been detected by X-ray analysis to the total affinity of the topoisomerases for DNA substrates are estimated. Factors that determine the differences in the enzyme interactions with specific and nonspecific single- and double-stranded DNAs are revealed. The results of the X-ray analysis of human DNA topoisomerase I are interpreted taking into account data on the comprehensive thermodynamic and kinetic analysis of the enzyme interaction with the specific and nonspecific DNAs. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DNA topoisomerase I from murine and human placenta, mechanism of interaction with specific DNA