



УДК 577.152.599*12.02

МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ СУПЕРСКРУЧЕННОЙ ДНК ЭУКАРИОТИЧЕСКИМИ ТОПОИЗОМЕРАЗАМИ ПЕРВОГО ТИПА I. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ

© 2003 г. Д. В. Бугреев*, В. Н. Булева*, О. И. Синицина**, 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 данные по взаимодействию ДНК-топоизомераз первого типа из клеток мыши и плаценты человека с неспецифическими олигонуклеотидами различной структуры и длины. Оценен вклад сильных и слабых неспецифических электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей в комплексообразование этих ферментов с одноцепочечными и двухцепочечными ДНК. Выявлены факторы, определяющие приоритетное связывание топологически напряженной ДНК. Результаты интерпретированы в свете данных рентгеноструктурного анализа ДНК-топоизомеразы I человека.

Ключевые слова: ДНК-топоизомераза мыши и плаценты человека; ДНК, одно- и двухцепочечные; механизм взаимодействия с нуклеотидами.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-зависимые ферменты играют важную роль во всех ключевых биологических процессах клетки, и многие из них служат мишенями для антираковых и противовирусных препаратов. В связи с этим детальное изучение молекулярных механизмов действия таких ферментов является важным как с теоретической, так и с практической точки зрения.

В настоящее время известно много различных методов исследования ферментов (для обзора см. [1, 2]). Однако среди них нет каких-либо количественных подходов к изучению ДНК-зависимых ферментов, которые по своей информативности могли бы быть сравнимыми с рентгеноструктурным анализом (РСА). В то же время количественная оценка наиболее важных факторов, имеющих первостепенное значение при узнавании ДНК различными ферментами, имеет принципиальное значение для понимания общих физико-химических закономерностей белково-нуклеино-

вых взаимодействий. Учитывая это, мы разработали новые подходы к анализу закономерностей белково-нуклеиновых взаимодействий, позволяющие оценивать относительный вклад в сродство ферментов к протяженным ДНК практически каждого нуклеотидного звена ДНК, включая различные структурные элементы отдельных звеньев [1, 2]. Показано, что механизм белково-нуклеиновых взаимодействий может быть проанализирован на молекулярном уровне с использованием методов синтеза и анализа: путем постадийного усложнения или упрощения структуры исследуемого лиганда. Этот подход был применен нами в отношении ряда ДНК-зависимых ферментов, различных классов: (а) неспецифических к нуклеотидной последовательности ДНК-полимераз прокариот, эукариот, вирусов и архебактерий [1–7]; (б) ферментов репарации: урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) [8], 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (o^8GDG) [9], апури/апириимидин-ДНК-эндонуклеазы [10], и (в) сиквенс-специфической эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* [11]. Некоторые данные, полученные с помощью метода постадийного усложнения структуры лиганда, проанализированы нами в обзоре [1, 2].

Известно, что при взаимодействии лиганда с биополимером за счет образования нескольких связей изменение свободной энергии Гиббса ΔG° , характеризующее образование комплекса, может быть равно сумме величин ΔG° , относящихся к от-

Сокращения: topoI – ДНК-топоизомераза первого типа; o^8GDG – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; UDG – урацил-ДНК-гликозилаза; oligo(N) – дезоксирибоолигонуклеотид; АК – аминокислота; РСА – рентгеноструктурный анализ; ссДНК – суперскрученная ДНК; одДНК и диДНК – одно- и двухцепочечная ДНК. 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).

дельным типам взаимодействий ($\Delta G^\circ = \Delta G_1^\circ + \Delta G_2^\circ + \dots + \Delta G_n^\circ$) [1]. Из аддитивности величин свободных энергий Гиббса для отдельных контактов лиганда с ферментом следует, что величина константы диссоциации комплекса K_d , отражающая общее сродство субстрата к полимеру, равна произведению величин K_d , относящихся к отдельным контактам ($K_d = K_d(1)K_d(2)\dots K_d(n)$). Именно такая ситуация наблюдается при взаимодействии исследованных ферментов с ДНК: аддитивность взаимодействий часто сохраняется на всех уровнях – от NMP до ДНК [1, 2]. Показано, что взаимодействие ферментов с каждым из нуклеотидных звеньев олигонуклеотида (oligo(N)) является суперпозицией слабых электростатических и гидрофобных и/или ван-дер-ваальсовых взаимодействий с отдельными структурными элементами. Все исследованные ферменты узнают неспецифические ДНК исключительно за счет большого числа аддитивных контактов со всеми мононуклеотидными звеньями ДНК, находящимися в пределах белковых глобул ($n = 7-20$ в зависимости от фермента) [1, 2]. Изменение величины K_d при увеличении длины (n) нуклеотида $(pN)_n$ описывается общим алгоритмом -- убывающей геометрической прогрессией:

$$K_d[(pN)_n] = K_d[(P_i)](e)^{1-n} \times (h_C)^{-l}(h_T)^{-m}(h_G)^{-k}(h_A)^{-g}, \quad (1)$$

где $K_d[(P_i)]$ – это K_d для минимального лиганда ортофосфата. Значения h_C, h_T, h_G и h_A соответствуют гидрофобным факторам h , отражающим увеличение эффективности взаимодействия фермента за счет введения в олигонуклеотид одного из звеньев (С, Т, G или А), число которых в составе $(pN)_n$ соответственно равно l, m, k и g . Электростатический фактор e отражает возрастание сродства фермента за счет взаимодействия с одной межнуклеозидной фосфатной группой [2]. Это уравнение описывает взаимодействие любой одно- или двухцепочечной ДНК с любым сиквенс-независимым ферментом, а также неспецифических ДНК с любыми из исследованных сиквенс-зависимых ферментов. При переходе от фермента к ферменту и от оцДНК к дцДНК происходит изменение только числовых значений факторов e и h_N [1, 2].

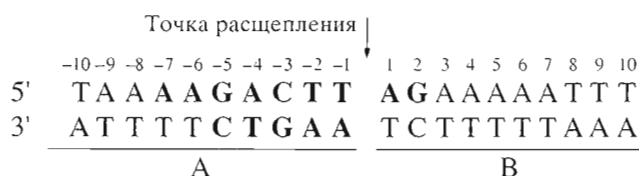
Такие неспецифические аддитивные взаимодействия обычно обеспечивают изменение общего сродства ДНК к ферментам на 5–8 порядков [1, 2]. При переходе к специфическим ДНК эти взаимодействия в основном сохраняются, а образование дополнительных специфических связей приводит к увеличению сродства субстратов только на 1–2 порядка. Показано, что комплексообразование, включающее формирование контактов фер-

ментов со специфическими звеньями ДНК, не может обеспечить ни их высокого сродства к ДНК, ни специфичности действия. Основой специфичности действия ферментов являются стадии ферментзависимой конформационной адаптации ДНК (приобретение оптимальной конформации) и непосредственно катализа: при переходе от неспецифических к специфическим ДНК величина k_{cat} возрастает на 4–8 порядков [2, 3].

Объект данного исследования – ДНК-топоизомераза I (КФ 5.99.1.2; topoI) клеток мыши и плаценты человека. Этот фермент изменяет топологическое состояние как положительно, так и отрицательно суперскрученной ДНК и играет важную роль в таких ключевых биологических процессах клетки, как репликация, транскрипция, репарация, рекомбинация [12]. Фармакологический интерес к данному ферменту обусловлен тем, что он служит мишенью для большого числа антираковых препаратов [13, 14].

Односубъединичная topoI (765 а.о.) состоит из N-концевого домена, корового домена, линкерного участка и С-концевого домена [15]. N-Концевой домен (~210 а.о.) сильно заряжен и содержит небольшое число гидрофобных АК-остатков [15] и ряд сигнальных пептидов [16]; он ответственен за локализацию фермента в ядре [17], но в целом не важен для проявления активности topoI [15]. С-Концевой участок (фрагмент 713–765 а.о.) содержит фосфоэфирную связь с 3'-концевым фосфатом расщепляемой цепи [18] и вместе с коровым доменом (субдомены I, II и III, фрагмент 200–635 а.о.), содержащим АК-остатки, формирующие ДНК-связывающий и активный центры, обеспечивает ферментативную активность topoI [18]. Линкерный участок (фрагмент 636–712 а.о.), соединяющий коровый и С-концевой домены, непосредственно не нужен для проявления активности topoI [18], но, тем не менее, считается, что он принимает участие в процессе релаксации ссДНК [19].

TopoI не абсолютно специфична по отношению к узнаваемому участку ДНК, однако существует наиболее предпочтительная последовательность (выделена жирным шрифтом):



Скорость расщепления для нее на 3–4 порядка выше, чем для других последовательностей ДНК, расщепляемых ферментом [20, 21]. Фермент защищает от расщепления ДНКазой 20 п.о., а точка расщепления ДНК расположена в центре 20-звенного дуплекса [22]. Минимальный участок

Таблица 1. Величины I_{50} , характеризующие сродство ортофосфата и неспецифических дезоксирибонуклеотидов к топоI мышши

Лиганд	I_{50} , М	Лиганд	I_{50} , М	Лиганд	I_{50} , М
P_i	0.38	(pG) ₄	2.2×10^{-2}	(pA) ₄ × (pT) ₄	6.3×10^{-3}
(pC) ₄	5.3×10^{-2}	(pG) ₅	8.7×10^{-3}	(pA) ₅ × (pT) ₅	2.2×10^{-3}
(pC) ₆	1.8×10^{-2}	(pG) ₇	1.6×10^{-3}	(pA) ₆ × (pT) ₆	7.1×10^{-4}
(pC) ₈	5.5×10^{-3}	(pA) ₄	1.5×10^{-2}	(pA) ₈ × (pT) ₈	8.0×10^{-5}
(pC) ₁₀	1.6×10^{-3}	(pA) ₅	5.9×10^{-3}	(pA) ₁₀ × (pT) ₁₀	1.0×10^{-5}
(pT) ₄	3.2×10^{-2}	(pA) ₆	2.0×10^{-3}	(pA) ₁₂ × (pT) ₁₂	1.3×10^{-5}
(pT) ₅	1.7×10^{-2}	(pA) ₇	9.2×10^{-4}	(pA) ₁₄ × (pT) ₁₄	2.3×10^{-5}
(pT) ₆	7.8×10^{-3}	(pA) ₈	4.8×10^{-4}		
(pT) ₇	4.0×10^{-3}	(pA) ₁₀	8.5×10^{-5}		
(pT) ₉	1.0×10^{-3}	(pA) ₁₂	2.4×10^{-4}		
(pT) ₁₀	5.5×10^{-4}	(pA) ₁₄	6.9×10^{-4}		
(pT) ₁₂	1.0×10^{-3}	(pA) ₁₆	1.5×10^{-3}		
(pT) ₁₄	1.7×10^{-3}				

ссДНК, необходимый для узнавания, состоит из 9 и 5 нт на расщепляемой и нерасщепляемой цепях соответственно [23].

Известно, что для расщепления ДНК необходимо взаимодействие топоI с двумя участками дуплекса. Первый расположен в 5'-концевой части расщепляемой ссДНК (участок А), второй (3'-концевой) предназначен для связывания цепи, содержащей 5'-гидроксильный конец ДНК после ее расщепления (участок В) [24]. Узнавание и превращение субстрата топоI включает следующие стадии: (а) узнавание и связывание ссДНК, (б) расщепление одной цепи ссДНК, (в) сбрасывание супервитков, (г) лигирование расщепленной цепи ДНК, (д) изменение конформации белка для осуществления следующих стадий релаксации, (е) диссоциация топоI с релаксированной ДНК [24].

В данной работе исследовано взаимодействие топоI клеток мышши и плаценты человека с неспецифическими oligo(N) с помощью метода постепенного усложнения лиганда. Это позволило оценить относительный вклад различных структурных элементов неспецифической ДНК в ее общее сродство к ферменту и интерпретировать данные РСА [19, 25] в свете полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью метода ингибиторного анализа оценено сродство топоI человека и мышши к отдельным специфическим и неспецифическим oligo(N) и показано, что они являются конкурентными по отношению к ссДНК ингибиторами данных ферментов [26–28]. Это свидетельствовало о возможности корректной оценки сродства различных oligo(N) к топоI с помощью метода инги-

биторного анализа. В данной работе постепенное усложнение структуры лиганда проводили в ряду: ортофосфат (как минимальный лиганд ферментов) → одноцепочечные неспецифические (pN)_n → двухцепочечные неспецифические (pN)_n.

Взаимодействие топоI мышши с неспецифическими олигонуклеотидами. В качестве характеристики сродства топоI к oligo(N) использована величина I_{50} , равная концентрации ингибитора, при котором достигается ингибирование реакции релаксации на 50%. В наших условиях величина I_{50} близка величине K_i [26, 28]. Показано, что ортофосфат ингибирует топоI мышши (величина I_{50} 0.38 М). Данные по сродству фермента к различным oligo(N) суммированы в табл. 1.

При переходе от P_i к (pN)_n происходит постепенное увеличение сродства oligo(N) таким образом, что зависимости логарифмов величин I_{50} от числа мононуклеотидных звеньев (n) являются линейными до $n \leq 10$ (рис. 1а). Несмотря на то что в пределах белковой глобулы фермента может находиться 20 п.о. ДНК, топоI эффективно взаимодействует только с 10 звеньями одноцепочечных oligo(N) или 10 парами нуклеотидов двухцепочечных лигандов. Линейность этих зависимостей свидетельствует об аддитивном вкладе в сродство каждого из нуклеотидных звеньев (pN)_n при $n \leq 10$. Изменение сродства oligo(N) описывается геометрической прогрессией: $K_d[(pN)_n] = K_d[(P_i)](1/f)^n$, где f – фактор увеличения сродства при удлинении oligo(N) на одно звено, легко вычисляемый из значений углов наклона логарифмических кривых (рис. 1а). Факторы f найдены равными: 1.71 – для (pC)_n, 1.93 – для (pT)_n, 2.12 – для (pG)_n, 2.33 – для (pA)_n, 2.89 – для дуплекса

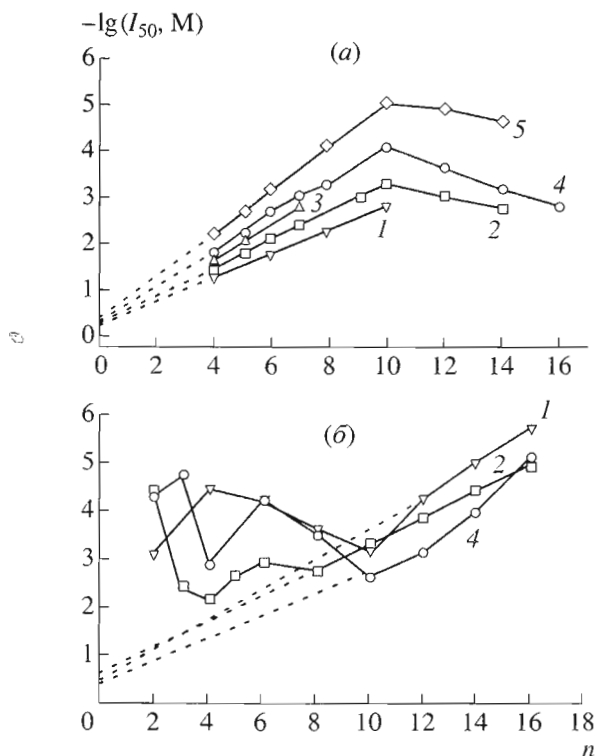


Рис. 1. Зависимость сродства topol мыши (а) и человека (б) к олигонуклеотидам: $(pC)_n$ (1); $(pT)_n$ (2); $(pG)_n$ (3); $(pA)_n$ (4); $(pT)_n(pA)_n$ (5) от их длины (n).

$(pT)_n(pA)_n$ и коррелируют с относительной гидрофобностью оснований: $C < T < G < A$.

Учитывая полианионный характер ДНК, легко представить, что слабые аддитивные взаимодействия topol с каждым из 10 нт могут реализовываться за счет электростатических контактов фермента с межнуклеозидными фосфатными группами ДНК, что обнаружено в случае o^8GDG [9] и $EcoRI$ [11]. Однако в случае ДНК-полимераз [1–7] и UDG [1, 2, 8] узнавание ДНК происходит как за счет контактов с межнуклеозидными фосфатными группами, так и гидрофобных и/или ван-дер-ваальсовых контактов с основаниями ДНК. Тем не менее для topol, как и в случае этих ферментов [1, 2], отсутствует строгая корреляция относительной гидрофобности оснований и относительного сродства к различным homo(pN)_n.

Для оценки вклада одной межнуклеозидной фосфатной группы в сродство topol к oligo(N) была использована зависимость величины $\lg f$ от относительной гидрофобности оснований, определенной по задержке нуклеозидов на обращенно-фазовом сорбенте [29], имеющей характер, близкий к линейному (рис. 2). Экстраполяция этой зависимости к нулевому времени задержки, соответствующему выходу с сорбента отрицательно заряженного P_i , дает величину $\lg(e)$, при

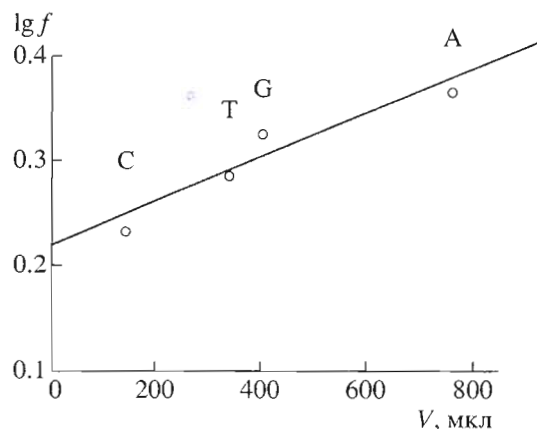


Рис. 2. Зависимость величин $\lg f$ для различных homo(pN)_n от степени удерживания соответствующих им нуклеозидов при изократической хроматографии на обращенно-фазовом сорбенте согласно [29]. Степень удерживания характеризует относительную гидрофобность оснований.

этом величина фактора e составляет 1.67. Этот фактор, как было показано ранее на примере других ферментов [1, 2], отражает повышение сродства $(pN)_n$ при их удлинении на одно звено, за счет образования слабых аддитивных электростатических и/или водородных связей фермента с отрицательно заряженной межнуклеозидной фосфатной группой oligo(N). Для упрощения описания результатов условно назовем эти взаимодействия “электростатическими”, а слабые гидрофобные и/или ван-дер-ваальсовые взаимодействия фермента с основаниями – “гидрофобными”. Таким образом, коэффициенты возрастания сродства topol за счет гидрофобных взаимодействий с одним из оснований (факторы h) равны $h = fle$ (1.02; 1.16; 1.27 и 1.40 для $(pC)_n$, $(pT)_n$, $(pG)_n$ и $(pA)_n$ соответственно). Следовательно, взаимодействие topol мыши с 10 звеньями оцДНК описывается общим для всех исследованных ферментов алгоритмом (см. уравнение (1)).

Очевидно, что относительный вклад аддитивных “электростатических” взаимодействий превышает вклад “гидрофобных” контактов и только в случае $(pA)_n$ эти величины становятся сопоставимыми. Изменение сродства в 1.71–2.33 раза при удлинении одноцепочечных oligo(N) на одно звено соответствует изменению свободной энергии Гиббса на $-0.32 \dots -0.50$ ккал/моль. Это существенно меньше, чем обычно наблюдается при образовании сильных электростатических контактов (-1 ккал/моль) или водородных связей ($-2 \dots -6$ ккал/моль) между ферментами и лигандами, и сравнимо с соответствующими величинами для слабых гидрофобных, ион-дипольных и диполь-дипольных взаимодействий [1, 2]. Многие сиквенс-зависимые ферменты имеют относи-

Таблица 2. Величины I_{50} , характеризующие сродство ортофосфата и неспецифических дезоксиолигонуклеотидов к topoI человека

Лиганд	I_{50} , М	Лиганд	I_{50} , М	Лиганд	I_{50} , М
P_i	0.38	(pT) ₂	3.4×10^{-5}	(pA) ₂	5.2×10^{-5}
(pC) ₂	8.2×10^{-4}	(pT) ₃	3.7×10^{-3}	(pA) ₃	2.1×10^{-5}
(pC) ₄	3.8×10^{-5}	(pT) ₄	7.9×10^{-3}	(pA) ₄	1.2×10^{-3}
(pC) ₆	6.7×10^{-5}	(pT) ₅	2.6×10^{-3}	(pA) ₆	6.1×10^{-5}
(pC) ₈	2.3×10^{-4}	(pT) ₆	1.2×10^{-3}	(pA) ₈	3.3×10^{-4}
(pC) ₁₀	7.3×10^{-4}	(pT) ₈	1.7×10^{-3}	(pA) ₁₀	2.3×10^{-3}
(pC) ₁₂	5.8×10^{-5}	(pT) ₁₀	5.0×10^{-4}	(pA) ₁₂	7.5×10^{-4}
(pC) ₁₄	1.0×10^{-5}	(pT) ₁₂	1.3×10^{-4}	(pA) ₁₄	1.1×10^{-4}
(pC) ₁₆	2.1×10^{-6}	(pT) ₁₄	4.0×10^{-5}	(pA) ₁₆	8.3×10^{-6}
		(pT) ₁₆	1.1×10^{-5}		

тельно высокое сродство к неспецифическим ДНК [1, 2]. Принято считать, что в основе образования такого рода неспецифических комплексов лежит взаимодействие отрицательно заряженных межнуклеозидных фосфатных групп с положительно заряженной поверхностью ДНК-узнающих центров ферментов, которое может происходить по типу взаимодействия не непосредственно контактирующих групп, а противоположно заряженных поверхностей биополимеров. Слабые аддитивные взаимодействия этих групп ДНК с topoI мыши, скорее всего, также относятся к такого рода взаимодействиям.

Взаимодействие topoI человека с неспецифическими олигонуклеотидами. Как и в случае topoI мыши, минимальным лигандом для topoI человека являлся ортофосфат. Сродство P_i к topoI человека (I_{50} 0.38 М) (табл. 2) и мыши (табл. 1) практически не различается. Как видно, зависимости отрицательного логарифма величин I_{50} от длины $(pN)_n$ в случае topoI человека и мыши имеют разный характер (ср. рис. 1а, б). Следует отметить, что наблюдаемые для topoI человека аномальные зависимости не характерны также для других ранее исследованных ферментов [1, 2]. Обычно сродство лигандов постепенно увеличивается при переходе от P_i к NMP и более длинным $(pN)_n$. Только в случае topoI человека короткие олигонуклеотиды ($n = 2-4$) проявляют аномально высокое сродство к ферменту, которое в некоторых случаях даже больше, чем для специфических oligo(N) той же длины [28]. Дальнейшее увеличение длины $(pA)_n$ и $(pC)_n$ приводит к уменьшению их сродства вплоть до $n = 10$ (рис. 1б). Интересно, что в случае $(pT)_n$ логарифмические зависимости для topoI человека и мыши при $4 < n < 10$ имеют сопоставимый характер. Анализ логарифмических зависимостей для topoI человека (рис. 1б) свидетельствует о том, что короткие $(pT)_2$, $(pC)_{2-8}$ и $(pA)_{2-8}$ на уровне свободных oligo(N) и такие же

фрагменты в составе более длинных олигонуклеотидов взаимодействуют с ферментом совершенно по-разному.

Следует отметить, что эффективность взаимодействия topoI человека с 2–8-звенными фрагментами $(pC)_n$ и $(pA)_n$, входящими в состав более длинных оцДНК, отражают не экспериментальные значения I_{50} , найденные для коротких oligo(N), а значения I_{50} , соответствующие участкам кривых, полученных экстраполяцией к $n = 0$ фрагментов логарифмических зависимостей, соответствующих $10 < n < 16$ (см. рис. 1б). Следует полагать, что в составе длинных $(pN)_n$ отдельные короткие фрагменты и нуклеотидные звенья ДНК, скорее всего, взаимодействуют с topoI человека аддитивным образом, как и в случае topoI мыши.

При анализе возможных причин аномально высокого сродства topoI человека к некоторым коротким олигонуклеотидам следует принимать во внимание следующее. Известно, что topoI способна с высокой эффективностью расщеплять только топологически напряженную ДНК и не является ферментом абсолютно специфичным по отношению к узнаваемой последовательности. Ее специфичность, скорее всего, обеспечивается как за счет образования специфических контактов с нуклеотидами ДНК, так и за счет оптимальной для связывания конформации топологически напряженной ДНК. Следует полагать, что различия в конформации релаксированной и топологически напряженной ДНК являются одним из основных факторов, определяющих термодинамическое и кинетическое преимущество ссДНК. Так, в случае topoI *E. coli*, релаксирующей только отрицательно суперскрученную ДНК ("–"ссДНК), фактором, определяющим повышенное сродство фермента к ДНК, может быть плавление дуплекса, поскольку введение минус-супервитков в ДНК облегчает расплетание цепей и образование одноцепочечных участков. Поскольку цепи поло-

жительно суперскрученной ДНК (“+”сДНК) сильно перекручены, она не является субстратом для *topoI* *E. coli*. *TopoI* человека релаксирует как “-”, так и “+”сДНК, в связи с чем, этот фермент должен использовать для повышения сродства к сДНК факторы, не зависящие от знака суперспирализации.

Специфическая последовательность для *topoI* содержит фланкирующие участки повторяющихся А-Т-треков, которые придадут всей последовательности определенную изогнутость. Изогнутость участков ДНК, связываемых ферментом, может являться одним из важных факторов в узнавании ферментом сДНК, поскольку она становится более ярко выраженной при наличии топологического стресса и не зависит от знака суперспирализации. *TopoI* человека, скорее всего, имеет повышенное сродство к изогнутым участкам, так как способна с определенной эффективностью расщеплять ДНК в таких участках даже при отсутствии в них специфической последовательности [30]. Учитывая это, можно предположить, что ДНК-связывающий участок *topoI* также обладает определенной изогнутостью, соответствующей изогнутости ДНК-субстрата (рис. 3). Наше предположение об изогнутости ДНК-узнающего центра фермента позволяет объяснить аномальное сродство *topoI* человека к коротким олигонуклеотидам ($n = 2-3$). Очевидно, что такие лиганды могут эффективно взаимодействовать с ферментом, поскольку изогнутость ДНК-узнающего центра на таком коротком участке незначительная (рис. 3г, е). Узнавание более длинных неспецифических *oligo(N)*, не обладающих изогнутостью, должно быть сопряжено с существенным изменением их конформации, поэтому они имеют более низкое сродство (рис. 3б). При этом, чем длиннее *oligo(N)*, тем меньше возможность придания ему изогнутой конформации, необходимой для эффективного связывания.

Результаты РСА [19, 25] напрямую не подтверждают наше предположение об изогнутости ДНК-связывающего центра *topoI*. Однако нужно учитывать, что подобные особенности структуры фермента должны быть достаточно хорошо заметны лишь в комплексе с сДНК или при термодинамическом анализе процесса узнавания, когда любые невыгодные конформационные преобразования проявляются в виде падения сродства лигандов. Отметим, что новые данные РСА [31] вы-

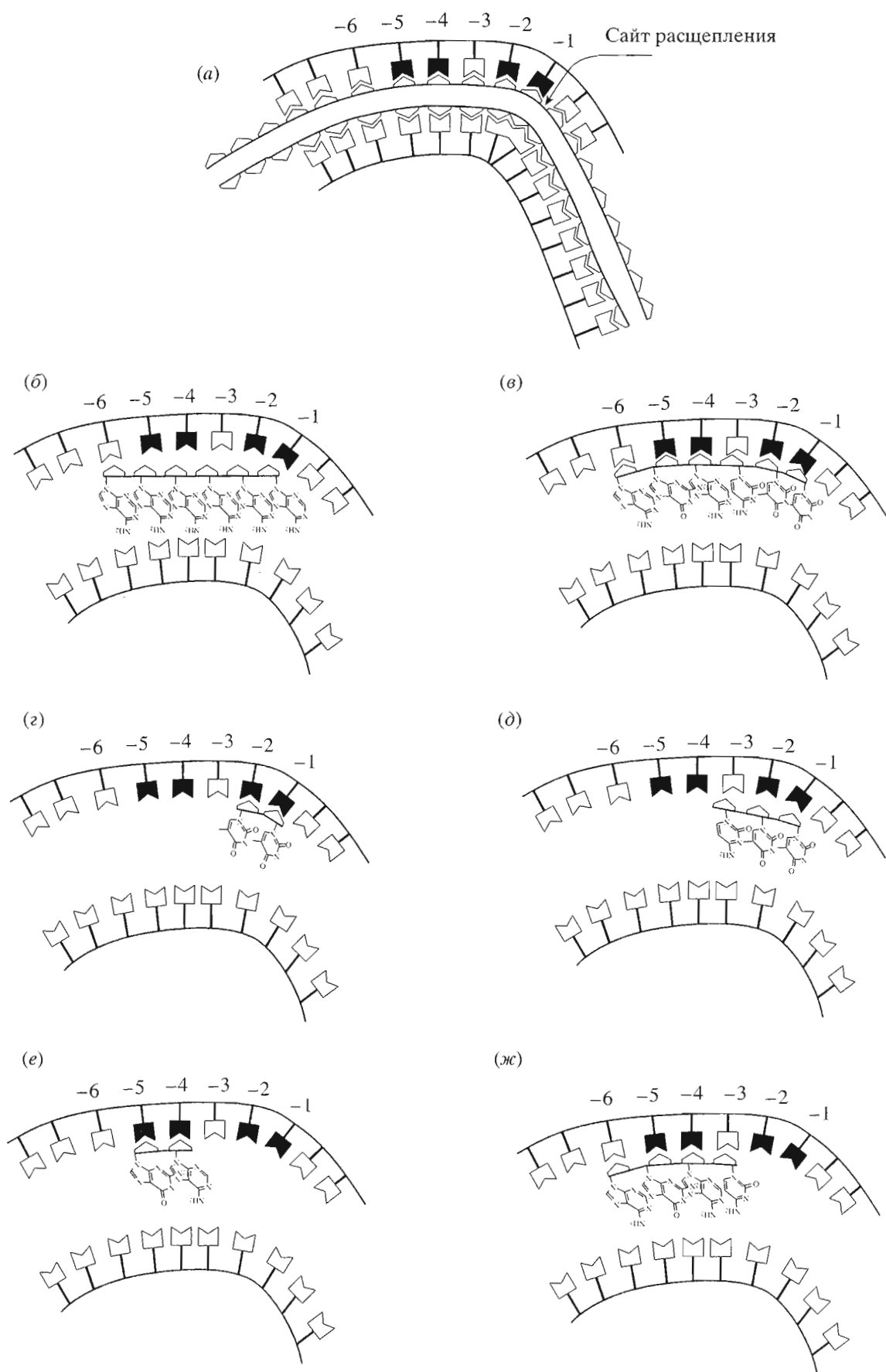
явили конформационные изменения ДНК-дуплекса: концы *oligo(N)*, находящегося в комплексе с ферментом, сдвигаются на 5.4 Å в направлении перпендикулярной оси ДНК, следовательно, дуплекс может образовывать некоторый изгиб.

Существенное различие в узнавании $(pC)_n$, $(pA)_n$ и $(pT)_n$ ферментом может быть результатом предпочтения *topoI* определенной структуры лигандов. Действительно, конформация рассматриваемых $(pN)_n$ сильно различается [32]. Однако наиболее вероятным объяснением различий в узнавании $(pN)_n$ является возможность связывания разных лигандов в разных участках ДНК-узнающей полости, которые в свою очередь имеют разную степень изогнутости (рис. 3). При изучении взаимодействия *topoI* со специфическими *oligo(N)* показано, что ДНК-связывающий центр фермента содержит два высокоаффинных участка связывания, узнающих с повышенным сродством [T(-2), T(-1)]- и [G(-5), A(-4)]-звенья специфической последовательности [33]. Первый из этих участков взаимодействует со специфическим *oligo(N)* около сайта расщепления (положения -2, -1), а второй со звеньями, расположенными несколько далее (положения -5, -4). Согласно предложенной нами схеме, изогнутость первого участка гораздо выше, чем второго. Короткие неспецифические $(pT)_n$ преимущественно взаимодействуют с первым более изогнутым участком узнающего центра фермента, поскольку *topoI* образует в этом месте специфический контакт с Thy-основанием в (-1)-положении. Поэтому в случае $(pT)_n$ -лигандов происходит резкое падение сродства при переходе от ди- к тринуклеотиду (рис. 3г, д). Неспецифические $(pC)_n$ и $(pA)_n$ преимущественно взаимодействуют со вторым менее изогнутым участком, поэтому при их удлинении происходит не резкое, а постепенное уменьшение сродства (рис. 3е, ж), а увеличение длины лигандов ведет к взаимодействию $(pN)_{5-10}$ с более изогнутым участком *topoI*, расположенным между [A(-4), T(-1)]-подцентрами фермента (здесь и далее под подцентрами подразумеваются участки ДНК-связывающего центра *topoI*, взаимодействующие с соответствующими основаниями специфической ДНК).

Следует полагать, что протяженные *oligo(N)* могут быть правильно уложены в ДНК-связывающем центре *topoI* только после изменения их конформации в сторону изогнутости, что должно

Рис. 3. Схематическое изображение изогнутости ДНК-узнающего центра *topoI* и его взаимодействие с различными лигандами: (а) оптимальное взаимодействие фермента с сДНК; (б) малоэффективное узнавание длинных неспецифических *oligo(N)*, не обладающих изогнутой структурой; (в) специфические *oligo(N)* связываются с ферментом с большим сродством; (г) и (д) связывание коротких *oligo(N)* в более изогнутом участке: эффективное узнавание динуклеотида и падение сродства при его удлинении; (е) и (ж) связывание коротких *oligo(N)* во втором менее изогнутом подцентре: оптимальное узнавание динуклеотида и постепенное уменьшение эффективности связывания при увеличении его длины.

Флажками в ДНК-узнающем центре *topoI* обозначены АК-остатки белка, контактирующие с соответствующими фосфатными группами ДНК, которые обозначены треугольниками.



быть связано с большими энергетическими затратами. При увеличении длины лигандов $(pA)_n$ и $(pC)_n$ падение сродства происходит вплоть до $n = 10$, что, вероятно, отражает размеры ДНК-связывающего центра фермента, который, как и в случае *topoI* мыши, предназначен для связывания 10 пар нуклеотидов. Увеличение сродства лигандов с $n > 10$, по нашему мнению, происходит вследствие образования дополнительных контактов вне ДНК-узнающего центра фермента между протяженной ДНК и линкерным доменом *topoI*, который, по данным РСА, выступает из основной глобулы белка и на своей поверхности, обращенной к дуплексу, содержит большое число положительно заряженных АК-остатков, способных образовывать связи с ДНК [19].

Как показано выше, *topoI* мыши взаимодействует как с основаниями, так и сахарофосфатным остовом одноцепочечных $oligo(N)$. При этом вклад сахарофосфатного остова в сродство является преимущественным. Сродство ортофосфата к *topoI* человека и мыши практически одинаковое (0.36–0.38 М), а введение 5'- и 3'-концевых фосфатных групп приводит к увеличению сродства специфических и неспецифических $oligo(N)$ к обоим ферментам [27, 28], что может свидетельствовать в пользу существенного вклада межнуклеозидных фосфатных групп в узнавание ДНК этими ферментами. Эффективность взаимодействия *topoI* человека с $(pR)_{12}(pT)_2$ -олигомером (где R – химически стабильный аналог дезоксирибозы – 1,2-дидезокси-D-рибофураноза), лишенным 12 гетероциклических оснований ($I_{50} = 1.4 \times 10^{-4}$ М), всего лишь в 3 раза ниже, чем с $(pT)_{14}$ ($I_{50} = 4.6 \times 10^{-5}$ М). Это свидетельствует о том, что *topoI* человека, как и фермент мыши, преимущественно взаимодействует с сахарофосфатным остовом оцДНК. Если предположить, что уменьшение сродства $(pR)_{12}(pT)_2$ происходит за счет отсутствия взаимодействий *topoI* с основаниями $oligo(N)$, то гидрофобный фактор, характеризующий взаимодействие *topoI* человека с одним Thy-основанием, можно оценить равным 1.09 ($h_T = 1.09$), что сопоставимо с $h_T = 1.16$ для *topoI* мыши. Углы наклонов линейных зависимостей (рис. 1) в случае $(pT)_n$ для *topoI* мыши и человека в целом сопоставимы, что также говорит о примерно одинаковом вкладе каждого звена в сродство $(pT)_n$ к этим ферментам.

Таким образом, совокупность рассмотренных данных свидетельствует о том, что нуклеотидные звенья относительно длинных $oligo(N)$ в случае *topoI* человека, а также и длинных и коротких $oligo(N)$ в случае *topoI* мыши, взаимодействуют с ферментом аддитивным образом преимущественно за счет межнуклеозидных фосфатных групп. Величины ΔS° , характеризующие эти взаимодей-

ствия, достаточно малы и сравнимы с таковыми для слабых диполь-дипольных и ион-дипольных взаимодействий. Следует отметить, что межнуклеозидные фосфатные группы вносят основной вклад в сродство ДНК ко всем исследованным нами ранее ферментам [1, 2]. В связи с этим представляется интересным тот факт, что этилирование фосфатных групп, приводящее к элиминации отрицательных зарядов, лишь незначительно понижает сродство *topoI* человека к $[p(Et)T]_{10}$ ($I_{50} = 8.3 \times 10^{-4}$) по сравнению с $(pT)_{10}$ ($I_{50} = 5.0 \times 10^{-4}$ М). Аналогичные результаты получены для большинства ранее исследованных ферментов: максимальное уменьшение сродства при блокировании межнуклеозидных фосфатных групп $(pT)_{10}$ обычно не превышает одного порядка [1, 2]. Необходимо отметить, что в случае чисто электростатических контактов между ДНК и ферментом потерю заряда фосфатных групп должна приводить к более существенному изменению сродства. В то же время данная модификация не должна оказывать существенного влияния на эффективность образования водородных связей. Следовательно, в случае *topoI* узнавание ДНК происходит за счет более выраженных в данном случае диполь-дипольных взаимодействий по сравнению с контактами, реализующимися за счет притяжения разноименно заряженных групп.

Согласно данным РСА [19, 25], 9–10 нуклеотидных пар ДНК образуют контакты с ДНК-узнающим центром *topoI* человека, сформированным в основном коровым доменом фермента, внутренняя область которого содержит большое число АК-остатков, в том числе 15 остатков лизина и 8 остатков аргинина, способных образовывать водородные связи и электростатические контакты с ДНК и создающих большой положительный электростатический потенциал этого участка. Таким образом, слабые аддитивные взаимодействия фосфатных групп оцДНК с *topoI* могут осуществляться через взаимодействие с заряженными группами фермента, а гидрофобные и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия основаны через взаимодействие как с неполярными АК, так и с неполярной частью заряженных АК-остатков. Однако, говоря о гидрофобных взаимодействиях, нужно отметить, что узнавание ДНК в случае с *topoI* происходит во внутренней полости фермента. При взаимодействии с оцДНК основания, располагаясь в этой полости, оказываются на достаточном удалении от АК-остатков фермента, что исключает возможность образования прямых гидрофобных контактов. Следовательно, наблюдаемый в случае *topoI* выигрыш в энергии при узнавании лигандов с более гидрофобными основаниями может происходить за счет энтропийного фактора при переносе $oligo(N)$ из воды в более гидрофобный ДНК-узнающий центр

фермента, где основания экранированы от взаимодействия с молекулами растворителя. В случае с дуплексами такого рода взаимодействия, по-видимому, могут вообще не реализовываться, поскольку азотистые основания находятся внутри тела ДНК и оказываются недоступными как для растворителя, так и для контактов с ферментом.

Наблюдаемые различия в узнавании неспецифической ДНК topoI мыши и человека вряд ли можно отнести за счет вовлечения во взаимодействие разных для двух случаев контактирующих групп ферментов и ДНК. Высокая гомология этих ферментов, особенно АК-остатков, контактирующих с ДНК, а также тот факт, что topoI мыши и человека практически не отличаются по взаимодействию со специфическими одно- и двухцепочечными oligo(N) [26–28] говорят о том, что наблюдаемая разница может быть вызвана различиями во внутриклеточной модификации и регуляции topoI , выделенной из различных источников, что может оказывать влияние на узнавание ДНК ферментом на уровне небольших структурных преобразований, затрагивающих топологические аспекты взаимодействия.

Взаимодействие топоизомераз с неспецифическими дуплексами. Как следует из данных РСА [19, 25], topoI образует контакты с обеими цепями ДНК. Следовательно, добавление второй комплементарной цепи oligo(N) должно приводить к образованию контактов фермента с обеими цепями ДНК. Для topoI мыши переход от $(\text{pA})_{10}$ к $(\text{pT})_{10}(\text{pA})_{10}$ приводит к увеличению сродства лиганда в 8.5 раз. Как видно из рис. 1, логарифмическая зависимость величины I_{50} от длины дуплекса линейна, и его взаимодействие с ферментом формально описывается тем же алгоритмом, что и в случае одноцепочечных oligo(N) (см. выше); фактор f для дуплекса $(\text{pT})_n(\text{pA})_n$ найден равным 2.89. Такое небольшое возрастание сродства при переходе от одно- к двухцепочечной ДНК, в принципе, может быть следствием отсутствия эффективного взаимодействия между цепями после образования комплекса ДНК с ферментом. Однако необходимо учитывать, что в отличие от одноцепочечных лигандов, в дуплексе основания недоступны для гидрофобных взаимодействий с ферментом, а сродство дцДНК должно определяться эффективностью взаимодействия ферментов с сахарофосфатным остовом, которую можно оценить исходя из аддитивности электростатических взаимодействий фермента с каждой из цепей. Величина $ee = (1.67)^2 = 2.80$ мало отличалась от фактора f для дуплекса $(\text{pT})_n(\text{pA})_n$ ($f = 2.89$). Это говорит в пользу сопоставимого вклада каждой из цепей неспецифической ДНК в сродство фермента к дуплексу, что согласуется с данными РСА о сопоставимом числе контактов topoI с этими цепями

ДНК. Таким образом, изменение сродства topoI к дцДНК описывается алгоритмом:

$$K_d[(\text{pN})_n(\text{pN})_n] = K_d[(P_i)](e)^{1-2n} = K_d[(P_i)](1.67)^{1-2n}, \quad (2)$$

где n – число пар оснований в составе дуплекса.

В случае topoI человека, переход от $(\text{pN})_n$ ($n < 10$) к смеси комплементарных коротких неспецифических oligo(N) приводит лишь к незначительному повышению ингибирующей способности $(\text{pT})_2(\text{pA})_2$ ($I_{50} = 0.8 \times 10^{-5}$ М), $(\text{pT})_3(\text{pA})_3$ ($I_{50} = 2.6 \times 10^{-5}$ М). Такие лиганды в используемых условиях не образуют двухцепочечных структур, а стабилизировать дуплексы неспецифического oligo(N) ферментом, скорее всего, не велика. В то же время сродство $(\text{pT})_n(\text{pA})_n$ ($n > 10$) было существенно ниже, чем сродство каждой из цепей по отдельности $(\text{pT})_{10}(\text{pA})_{10}$ ($I_{50} > 10^{-3}$ М), $(\text{pT})_{16}(\text{pA})_{16}$ ($I_{50} > 10^{-4}$ М). Интересно, что сродство topoI мыши к $(\text{pT})_n(\text{pA})_n$ при $n > 10$ также понижается (рис. 1а).

Известно, что комплекс $(\text{pT})_n(\text{pA})_n$ имеет конформацию типичной В-ДНК и плохо подвергается структурным изменениям [32]. Его жесткая структура, по-видимому, затрудняет его конформационные изменения после связывания с ферментом, что может приводить к понижению сродства таких дуплексов по сравнению с более конформационно лабильными одноцепочечными oligo(N) .

Как уже говорилось, высокое сродство длинных неспецифических лигандов может быть результатом образования дополнительных контактов между линкерным доменом фермента и ДНК вне основного ДНК-узнающего центра topoI . Согласно данным РСА, взаимодействие ДНК и линкерного домена topoI не реализуется напрямую, а возможно только в процессе релаксации ссДНК при вращении дуплекса вокруг нерасщепляемой цепи [19]. Однако, согласно нашим данным, взаимодействие линкерного домена с ДНК возможно и в процессе связывания и является важным не только на термодинамической стадии, но и на стадии каталитического расщепления (будет опубликовано отдельно). Поскольку переход от одноцепочечных к двухцепочечным неспецифическим oligo(N) приводит к уменьшению их сродства к topoI человека, следует полагать, что контакты, образующиеся на уровне оцДНК, не всегда могут быть реализованы в случае дуплекса. Действительно, образование связей oligo(N) с линкерным доменом, расположенным под углом к оси ДНК, находящейся в узнающем центре, возможно лишь при значительных изменениях в структуре лиганда. В случае с оцДНК это может достигаться при изменении конформации сахарного остатка одного из нуклеотидных звеньев. Для дцДНК перестройки такого рода должны быть связаны со значи-

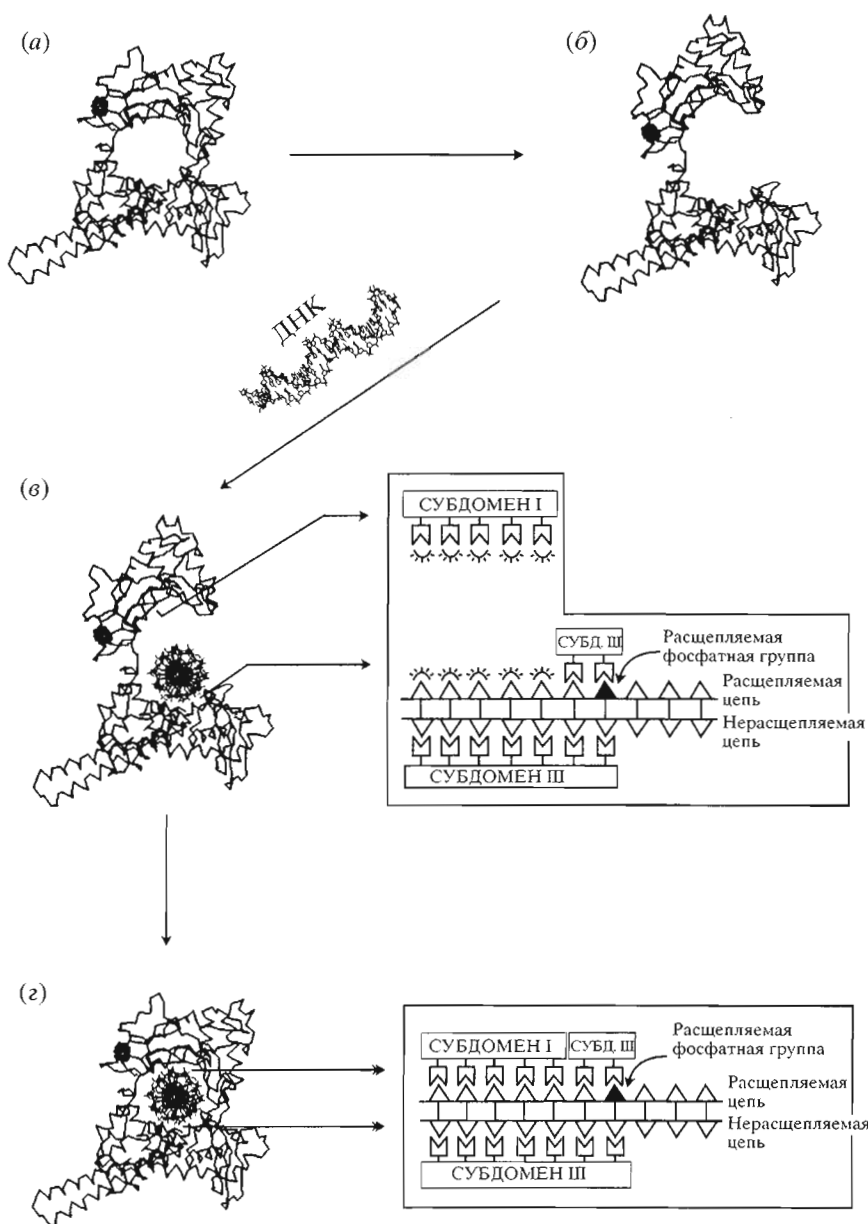


Рис. 4. Схематическое изображение различных этапов взаимодействия топоI с двухцепочечной ДНК: (а) топоI в закрытой конформации; (б) переход фермента в открытую конформацию, необходимую для связывания ДНК; (в) начальный этап связывания ДНК за счет ее взаимодействия с АК-остатками субдомена III, формирующими активный центр топоI (ДНК не может на этом этапе взаимодействовать с субдоменом I из-за его пространственной удаленности); (г) переход топоI в закрытую конформацию, ведущий к образованию контактов ДНК с субдоменом I.

При создании рисунка использованы данные PCA [19, 25] в виде 1A36.pdb (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

тельными энергетическими затратами и, вероятно, могут происходить только на уровне ссДНК.

При анализе результатов PCA интересно также отметить конформационные особенности взаимодействия топоI с ДНК-дуплексами. Согласно имеющимся данным, ДНК-узнающий центр топоI человека формируется субдоменами I и III, входящими в состав корового домена [25]. Фермент существует в двух конформациях: открытой (рис. 4а) и закрытой (рис. 4б), а ДНК-связывающий центр

расположен внутри глобулы фермента. Для связывания необходимо, чтобы топоI перешла в открытую конформацию, когда субдомены I и III расходятся, открывая внутреннюю полость фермента, и узнающий центр становится доступным для связывания [19] (рис. 4в). Таким образом, в начальный момент узнавания ДНК способна образовывать контакты лишь с одним из субдоменов (III) (рис. 4в). АК-остатки субдомена III образуют контакты с нерасщепляемой цепью ДНК, а

также с расщепляемой и близлежащей межнуклеозидной фосфатной группой. Контакты topoI с 5'-концевым (от точки расщепления) участком расщепляемой цепи ДНК осуществляются за счет взаимодействия с субдоменом I. Следует полагать, что контакты ДНК с субдоменом III менее специфичны, поскольку должны обеспечивать достаточно высокое сродство фермента к любой ДНК для начального узнавания и последующего поиска специфической последовательности. Взаимодействие ДНК с субдоменом I происходит на следующей стадии после перехода topoI в закрытую конформацию (рис. 4z) и практически обеспечивает термодинамический контроль реакции расщепления, поскольку лишь правильная реализация образующихся контактов способствует такому переходу, что в итоге делает возможным протекание реакции.

Таким образом, образование специфических контактов должно приводить не только к более эффективному взаимодействию topoI с ДНК, но и сопровождаться рядом конформационных перестроек. При этом специфичность взаимодействия может обеспечиваться как образованием новых связей, так и усилением уже существующих неспецифических контактов с ДНК. Более широкий круг специфичности, проявляемый topoI по сравнению, например, с рестриктазами свидетельствует в пользу того, что отбор последовательностей происходит на уровне специфической конформации субстрата, а скорость реакции на различных участках в основном зависит от структурных преобразований ДНК перед каталитическим расщеплением. Закономерности, проявляемые topoI при узнавании специфической последовательности, и их сравнение с неспецифическими взаимодействиями фермента с ДНК будут подробно рассмотрены в следующей статье данной серии [33].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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

Препараты гомогенных topoI мыши и человека были получены согласно известным методикам [34, 35]. Синтез, очистку и характеристику oligo(N) проводили как описано ранее [36, 37]. Концентрацию oligo(N) определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения, оцененные согласно работе [38].

Активность topoI оценивали по степени перехода ссДНК в релаксированную форму при 30°C. Все измерения проводили на линейных участках зависимости скорости реакции от концентрации

фермента и субстрата [26–28]. Реакционная смесь (20 мкл) содержала: 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 70 мкг/мл BSA, 0.5 мМ дитиотреит, 0.5 мМ EDTA, 1.5% глицерин, 130 мМ NaCl, 10 мкг/мл ссДНК и 1 ед. акт. фермента. В экспериментах по ингибированию в реакционную смесь добавляли oligo(N) в различных концентрациях. Реакционные смеси инкубировали в течение 15 мин при 30°C, и реакцию останавливали, добавляя 4 мкл смеси, содержащей: 5% SDS, 50% глицерин и 0.1% бромфеноловый синий. Для определения относительного количества суперскрученной и релаксированной ДНК полученные смеси подвергали электрофорезу в 1% агарозе, ДНК окрашивали раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл), затем гели фотографировали. Степень перехода ссДНК в релаксированную форму оценивали по данным сканирования полученных изображений. В качестве меры сродства oligo(N) к ферменту использовали величины I_{50} , соответствующие концентрации ингибитора, при которой достигается ингибирование реакции на 50%. Ошибка определения величин I_{50} не превышала 10–30%.

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. Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1995. Т. 29. С. 16–37.
2. Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 291–305.
3. Nevinsky G.A., Veniaminova A.G., Levina A.S., Podust V.N., Lavrik O.I., Holler E. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 1200–1207.
4. Лаврик О.И., Невинский Г.А. // Биохимия. 1989. Т. 54. С. 757–764.
5. Лаврик О.И., Невинский Г.А. Итоги науки и техники. Сер. Биооргани. химия. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 13. С. 3–172.
6. Knorre D.G., Lavrik O.I., Nevinsky G.A. // Biochimie. 1988. V. 70. P. 655–661.
7. Knorre D.G., Godovikova T.I., Nevinsky G.A. // Evolutionary Biochemistry and Related Areas of Physicochemical Biology. Moscow: Bach Institute of Biochemistry and ANCO, 1995. P. 297–320.
8. Виноградова Н.Л., Булычев Н.В., Максакова Г.А., Джонсон Ф., Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1998. Т. 32. С. 498–508.
9. Ищенко А.А., Булычев Н.В., Максакова Г.А., Джонсон Ф., Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1998. Т. 32. С. 590–599.

10. Белоглазова Н.Г., Петрусева И.О., Булычев Н.В., Максакова Г.А., Джонсон Ф., Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1997. Т. 31. С. 1109–1116.
11. Колочева Т.И., Демидов С.А., Максакова Г.А., Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1998. Т. 32. С. 1005–1019.
12. Wang J.C. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 635–692.
13. Andoh T., Ikeda H., Aguro M. // Molecular Biology of DNA Topoisomerase and Its Application to Chemotherapy. Boca Raton: CRC Press, 1993.
14. Wang H.K., Morris-Natschke S.L., Lee K.H. // Med. Res. Rev. 1997. V. 17. P. 367–425.
15. Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 7602–7608.
16. Alsner J., Svejstrup J.Q., Kjeldsen E., Sorensen B.S., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 12408–12411.
17. Bharti A.K., Olson M.O., Kufe D.W., Rubin E.H. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 1993–1997.
18. Stewart L., Ireton G.C., Champoux J.J. // J. Mol. Biol. 1997. V. 269. P. 355–372.
19. Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G., Champoux J.J. // Science. 1998. V. 279. P. 1534–1541.
20. Thomsen B., Mollerup S., Bonven B.J., Frank R., Blocker H., Nielsen O.F., Westergaard O. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 1817–1823.
21. Busk H., Thomsen B., Bonven B.J., Kjeldsen E., Nielsen O.F., Westergaard O. // Nature. 1987. V. 327. P. 638–640.
22. Stevsner T., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 10110–10113.
23. Svejstrup J.Q., Christiansen K., Andersen A.H., Lund K., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 12529–12535.
24. Christiansen K., Westergaard O. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 1–9.
25. Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J.J., Hol W.G. // Science. 1998. V. 279. P. 1504–1513.
26. Nevinsky G.A., Bugreev D.V., Buneva V.N., Yasui Y., Nishizava M., Andoh T. // FEBS Lett. 1995. V. 368. P. 97–100.
27. Bugreev D.V., Vasyutina E.L., Buneva V.N., Yasui Y., Nishizava M., Andoh T., Nevinsky G.A. // FEBS Lett. 1997. V. 407. P. 18–20.
28. Bugreev D.V., Vasutina E.L., Kolocheva T.I., Buneva V.N., Andoh T., Nevinsky G.A. // Biochimie. 1998. V. 80. P. 303–308.
29. Doronin S.V., Nevinsky G.A., Malygina T.O., Podust V.N., Khomov V.V., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1989. V. 259. P. 83–85.
30. Krogh S., Mortensen U.H., Westergaard O., Bonven B.J. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 1235–1241.
31. Redinbo M.R., Champoux J.J., Hol W.G. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 6832–6840.
32. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: Пер с англ. М.: Мир, 1987.
33. Бугреев Д.В., Синицина О.И., Бунева В.Н., Невинский Г.А. // Биооргани. химия. 2003. Т. 29 (в печати).
34. Ishii K., Hasegawa T., Fujisawa K., Andoh T. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 12728–12732.
35. Бугреев Д.В., Васютина Е.Л., Максакова Г.А., Бунева В.Н., Андо Т., Невинский Г.А. // Молекулярн. биология. 1997. Т. 31. С. 239–251.
36. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. // Nature. 1991. V. 349. P. 431–434.
37. Bodepudi V., Iden C.R., Johnson F. // Nucleotides Nucleosides. 1991. V. 10. P. 755–761.
38. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd ed. / Ed. G.D. Fastman. Cleveland: CRG Press, 1975. V. 1.

The Mechanism of the Supercoiled DNA Recognition by the Eukaryotic Type I Topoisomerases. I. The Enzyme Interaction with Nonspecific Oligonucleotides

D. V. Bugreev*, V. N. Buneva*, O. I. Sinitsina**, 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

Interaction of the DNA type I topoisomerases from the murine and human placenta cells with nonspecific oligonucleotides was analyzed. The contributions of strong and weak nonspecific electrostatic, van der Waals's, and hydrophobic interactions, and hydrogen bonding of the enzymes to the complex formation with the single- and double-stranded DNAs were determined. The factors that determine the top-priority recognition of the topologically stressed DNA were revealed. The results were interpreted in comparison with the X-ray analysis data for human DNA topoisomerase I. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 2; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DNA topoisomerase I from mice and human placenta, mechanism of interaction with nucleotides and single- and double-stranded DNAs