

УДК 577.151

ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ И ИХ ФУНКЦИИ В КЛЕТКЕ

© 2012 г. Д. А. Гиляров¹, И. С. Шкундина^{1,2*}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334

²Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, 123182

Поступила в редакцию 04.07.2011 г.

Принята к печати 04.08.2011 г.

ДНК-топоизомеразы – сложно организованные ферменты, управляющие топологическим состоянием ДНК в клетке. В последние годы появилось множество новых данных об особенностях структуры и функционирования этих ферментов. В обзоре дается характеристика топоизомераз различных классов и рассматриваются особенности механизмов катализа. Обсуждается роль топоизомераз в процессах репликации, транскрипции и рекомбинации ДНК, в поддержании структуры интерфазного хроматина и конденсированных хромосом, а также в обеспечении расхождения хромосом при делении клетки.

Ключевые слова: ДНК-топоизомеразы, структура, механизм действия, транскрипция, репликация, хроматин, прокариоты, эукариоты.

DNA-TOPOISOMERASES AND THEIR FUNCTIONS IN CELL, by D. A. Ghilarov¹, I. S. Shkundina^{1,2*} (¹Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; ²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; *e-mail: irina_shkundina@mail.ru). DNA-topoisomerases are sophisticated enzymes controlling DNA topology in cells. A lot of new data concerning the structure and functions of topoisomerases was published recently. In this review authors discuss basic features of the different types of topoisomerases with respect to catalytic mechanism and focus at the involvement of topoisomerases in various DNA-related cellular processes, such as replication, transcription, recombination, chromatin condensation and daughter chromatids partitioning.

Keywords: DNA-topoisomerases, structure, function, transcription, replication, chromatin, prokaryotes, eukaryotes.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-топоизомеразы представляют собой сложно организованные ферменты, управляющие топологическим состоянием ДНК в клетке. Они способны релаксировать топологическое напряжение молекулы ДНК, поддерживаемое положительными и отрицательными сверхвитками. Топоизомеразы способны направленно вводить отрицательные (ДНК-гираза) или положительные (обратная гираза) сверхвитки, а также отвечают за катенацию и декатенацию кольцевых молекул ДНК. Без их участия были бы невозможны процессы репликации, транскрипции, гомологичной рекомбинации и деления клеток [1].

Топологическое напряжение устраняется топоизомеразами за счет внесения одно- или двухцепочечных разрывов в молекулу ДНК. При разрыве ДНК временно образуется фосфодиэфир-

ная ковалентная связь фрагмента расщепленной цепи (цепей) с ферментом (таким образом, потери энергии связи не происходит). Топология ДНК изменяется при переносе неповрежденной ДНК через этот разрыв. Различают топоизомеразы I-го и II-го типов. В процессе работы топоизомераз типа I одна цепь ДНК проходит через разрыв, вносимый ферментами в комплементарную цепь (при этом число сверхвитков меняется на единицу). На основании строения и механизма действия топоизомеразы типа I подразделяются на подтипы IA и IB. Топоизомеразы типа II, связываясь с двумя 5'-фосфатами на противоположных цепях, вносят двухцепочечный разрыв в один сегмент ДНК, продергивая через разрыв другой сегмент. При этом число сверхвитков меняется на два. Топоизомеразы типа II также делят на подти-

Принятые сокращения: TFIIID (Transcription Factor II D) – фактор транскрипции II D; TFIIA (Transcription Factor II A) – фактор транскрипции II A; ADPNP (5'-adenylyl- β , γ -midodiphosphate) – 5'-аденилил- β , γ -имидодифосфат; CTD (C- Terminal Domain) – C-концевой домен.

* Эл. почта: irina_shkundina@mail.ru

пы А и В на основании структурных особенностей ферментов.

Рассмотрим вкратце основные структурные и функциональные особенности различных типов топоизомераз, а затем физиологические процессы в клетке, участниками которых являются топоизомеразы.

СТРУКТУРА И ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТОПОИЗОМЕРАЗ ТИПОВ I И II

ДНК-топоизомеразы типа IA

ДНК-топоизомеразы типа IA катализируют релаксацию отрицательно сверхспирализованной ДНК. За счет энергии связывания фермента происходит локальное расплавление дуплекса, и в одну из цепей вносится разрыв. В большинстве случаев топоизомеразы IA связываются с уже существующими одноцепочечными участками ДНК [2, 3]. Так как расплавление облегчается отрицательной сверхспирализацией, то по мере релаксации фермент работает все менее и менее эффективно. Топоизомеразы типа IA также способны катализировать реакцию катенации-декатенации двухцепочечных молекул, если в одной из них имеется ник [4]. Предполагается, что при этом фермент вносит в другую цепь временный разрыв напротив уже имеющегося. Расщепление ДНК топоизомеразами типа IA сопровождается присоединением одного конца цепи ДНК к тирозину в активном сайте фермента через 5'-фосфодиэфирную связь. К ДНК-топоизомеразам типа IA относятся бактериальные ДНК-топоизомеразы I и III, эукариотическая ДНК-топоизомераза III и один из доменов обратной гиразы термофильных прокариот [5].

На основе анализа кристаллической структуры N-концевого фрагмента фермента был предложен механизм релаксации или катенации/декатенации с помощью ДНК-топоизомеразы IA [6] (рис. 1а), впоследствии подтвержденный биохимическими и биофизическими экспериментами [7–9]. Фермент связывает ДНК и расщепляет одну из цепей. При этом тирозин активного центра ковалентно связывается с 5'-фосфатом, в то время как 3'-конец разорванной цепи взаимодействует с ферментом нековалентно [10]. Необходимые для катализа ионы Mg^{2+} помогают удерживать 3'-конец расщепленной цепи в нужном положении в каталитическом центре [10, 11]. После этого комплементарная цепь протаскивается в образовавшуюся щель, что приводит к релаксации одного сверхвитка, затем полость фермента закрывается и разорванная цепь зашивается. Для высвобождения ДНК полость фермента снова должна открыться. Топоизомераза способна быстро совершать несколько актов переноса цепей, видимо, без высвобождения

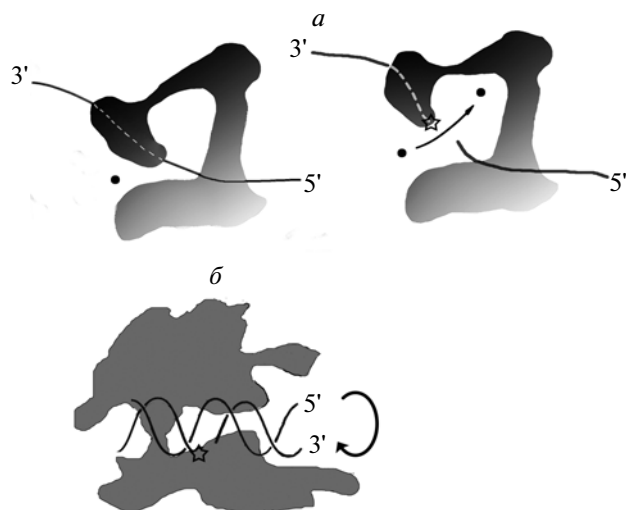


Рис. 1. Схема механизма действия топоизомераз I: а – топоизомераз типа IA – перемещение цепи ДНК через временный разрыв в другой цепи; б – топоизомераз типа IB – вращение свободного 5'-конца молекулы ДНК. В обоих случаях звездочкой обозначено место ковалентного присоединения молекулы ДНК к тирозину активного центра фермента.

ДНК; тем не менее, за один акт число зацепления (linking number) ДНК меняется ровно на единицу [8]. Полный цикл протекает без участия АТФ, т.е. энергия, необходимая для циклического изменения конформации фермента, обеспечивается энергией механического напряжения сверхспирализованной ДНК.

Обратная гириза

Обратная гириза – уникальный фермент термофильных прокариот, в котором объединены домены хеликазы суперсемейства 2 и топоизомеразы IA. Обратная гириза способна направленно вносить положительные сверхвитки в ДНК при участии АТФ. Фактически, она функционирует как ДНК-шаперон, предотвращая нежелательное плавление ДНК и образование протяженных одноцепочечных участков при высоких температурах. Изолированный хеликазный домен обратной гиразы обладает АТФазной и ДНК-связывающей активностью, однако не является хеликазой, т.е. не способен активно перемещаться вдоль ДНК и разделять цепи ДНК. Изолированный топоизомеразный домен обладает активностью топоизомеразы IA, т.е. может только релаксировать отрицательно сверхспирализованную ДНК. Тем не менее, у полного двухдоменного фермента ДНК-релаксирующая активность управляется АТФ-связывающим доменом и полностью подавлена при отсутствии АТФ [12]. Такие же результаты получены при исследовании недавно обнаруженной у археи *Nanoarchaeum equitans* двусубъединичной

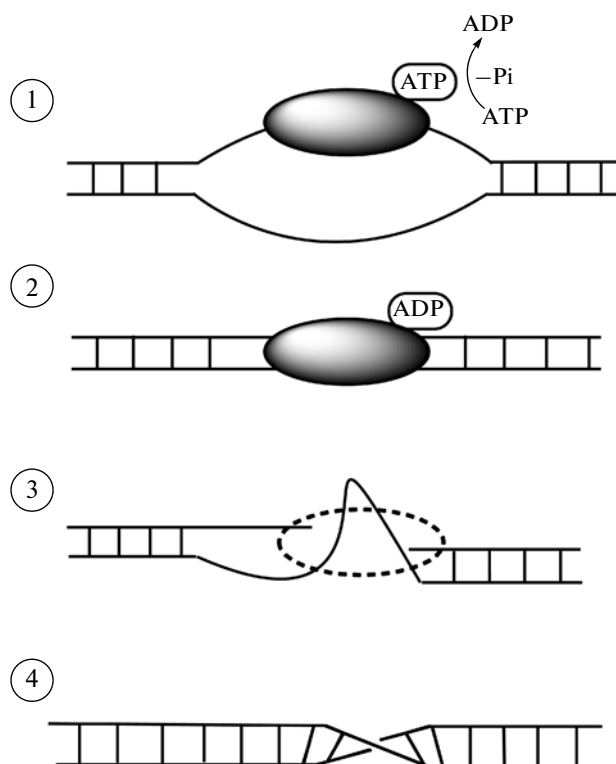


Рис. 2. Схема предполагаемого механизма действия обратной гиразы. 1 – Фермент в комплексе с АТФ связывается с одноцепочечной ДНК; 2 – гидролиз АТФ приводит к образованию дуплекса ДНК; 3 – активность топоизомеразы IА приводит к внесению (+)-сверхвитка, способствуя стабилизации двухцепочечного состояния.

обратной гиразы, в которой топоизомеразный и хеликазный домены представляют собой разные полипептиды. При их объединении образуется фермент с активностью обратной гиразы [13]. Согласно имеющимся биохимическим данным, хеликаза в составе обратной гиразы функционирует как АТФ-зависимый переключатель (рис. 2): хеликаза в комплексе с АТФ имеет высокую аффинность к одноцепочечной ДНК, после гидролиза АТФ сродство к одноцепочечной ДНК уменьшается, а к двухцепочечной увеличивается, что приводит к образованию дуплекса ДНК [13, 14]. Строго координированное действие топоизомеразы I приводит к стабилизации двухцепочечного состояния за счет внесения (+)-сверхвитка. При использовании негидролизуемых аналогов АТФ фермент может вносить как (+)-, так и (–)-сверхвитки [12, 15]. Детальный механизм работы АТФ-переключателя и координации работы двух доменов обратной гиразы пока неясен.

ДНК-топоизомеразы типа IВ

К ДНК-топоизомеразам этого типа относятся эукариотическая ДНК-топоизомераза I, ДНК-

топоизомераза I вируса осповакцины и ДНК-топоизомераза V бактерии *Methanopyrus kandleri* (из-за отсутствия гомологии с другими топоизомеразами, последнюю также выделяют в отдельный тип IC, хотя механизм действия этого фермента сходен с описанным ниже механизмом [5]). ДНК-топоизомеразы IВ могут релаксировать как отрицательные, так и положительные сверхвитки, внося разрыв в участок двухцепочечной ДНК.

Механизмы релаксации ДНК-топоизомеразми IВ и IА различаются (рис. 1б). Фермент плотно охватывает молекулу ДНК, контактируя с ее сахарофосфатным остовом на протяжении 14 п.н. При расщеплении цепи тирозин активного сайта ковалентно присоединяется к 3'-ОН-концу. После этого 5'-конец цепи может свободно вращаться, так как связан с ферментом только неспецифическими ионными взаимодействиями [16]. Каждый поворот уменьшает число сверхвитков на единицу; тем не менее, за время между событиями расщепления и соединения цепи (т.е. за один каталитический акт) молекула ДНК может повернуться несколько раз, поэтому, в отличие от механизма, характерного для топоизомераз IА, число зацепления на каждом шаге меняется случайным образом на несколько единиц. Чем сильнее скручена ДНК, т.е. чем выше ее энергия, тем быстрее происходит релаксация [17]. На данный момент точно не известны конформационные превращения фермента, обеспечивающие вращение ДНК. Предполагают, что, если фермент находится в “закрытой” конформации, его домены должны сдерживать вращение. Поэтому – после расщепления одной из цепей ДНК – фермент снова переходит в “открытую” конформацию, в которой устраняется торсионное напряжение; затем фермент снова “закрывается”, и разорванная цепь зашивается. Действительно, можно нарушить вращение ДНК, если искусственно “закрыть” фермент, введя вблизи активного центра дисульфидные мостики [18]. Однако, если ввести их несколько дальше от активного центра, так, чтобы имитировать закрытую конформацию нативного белка, вращение почти не нарушается [19]. Таким образом, существенного раскрытия фермента во время вращения ДНК не происходит. Несмотря на наличие большого количества структурных и биохимических данных, мы еще очень далеки от детального понимания механизма работы ДНК-топоизомеразы IВ [5].

ДНК-топоизомеразы типа II

ДНК-топоизомеразы типа II представляют собой димеры или тетрамеры, которые в процессе релаксации/суперскручивания расщепляют одновременно две цепи ДНК [3, 16]. Когда ДНК находится в расщепленном состоянии, каждая субъединица димера связана с 5'-фосфатом ДНК, при этом точки разрывов на комплементарных цепях,

как правило, находятся на расстоянии четырех пар оснований друг от друга. Сегмент ДНК, подвергающийся расщеплению, называется воротным, или G-сегментом (Gate segment), а сегмент ДНК, протаскиваемый через разрыв, — транспортируемым, или T-сегментом (Transported segment). В результате последовательных изменений конформаций фермента пространство между двумя субъединицами димеров расширяется до такой степени, что транспортируемый сегмент может пройти между ними. Реакции, катализируемые ДНК-топоизомеразами типа II, требуют присутствия ионов Mg^{2+} и АТР. Они могут катализировать как реакции релаксации/суперскручивания, так и катенации/декатенации дуплексов ДНК.

К топоизомеразам типа IIA относятся эукариотические ДНК-топоизомеразы II, бактериальная ДНК-топоизомераза IV и ДНК-гираза бактерий. В каталитическом цикле топоизомераз типа IIA задействованы три участка димеризации фермента, называемые воротами [20, 21]: T-сегмент ДНК входит внутрь фермента через ворота, образуемые за счет димеризации АТР-разных доменов с одной стороны комплекса (N-концевые ворота), а выходит с другой стороны комплекса через C-концевые ворота. Перемещение T-сегмента через G-сегмент регулируется третьими ДНК-воротами, в которых располагаются тирозины активных центров фермента. Осуществляя катализ, топоизомераза сначала связывает G-сегмент ДНК, затем АТР, что и приводит к димеризации АТР-разных доменов и захвату T-сегмента (при этом N-концевые ворота работают как “зажим”, запирая захваченный T-сегмент внутри комплекса). В свою очередь, конформационные изменения, вызванные закрытием N-ворот, гидролизом АТР и попаданием отрицательно заряженной молекулы ДНК внутрь комплекса, стимулируют временное расщепление G-сегмента ДНК, при этом возможен транспорт T-сегмента через разрыв. Только после соединения G-сегмента становится возможным открытие C-концевых ворот для высвобождения T-сегмента (см. рис. 3а).

На протяжении долгого времени в литературе идет дискуссия о том, зачем эукариотические ДНК-топоизомеразы II используют энергию АТР, осуществляя термодинамически выгодную реакцию релаксации. Было показано, что топоизомеразы II способны сдвигать термодинамическое равновесие в реакции релаксации или декатенации ДНК, создавая более узкое распределение топоизомеров, чем, например, топоизомераза I [22]. Предполагалось, что этот процесс физиологически необходим, например, для полного разделения дочерних хроматид после репликации, и что для него требуется энергия АТР. Способность осуществлять такой неравновесный процесс, по-видимому, связана со способностью топоизомераз сильно изгибать ДНК при связывании и спо-

собностью предпочтительно связывать T-сегмент с определенной геометрией [23, 24]. Однако подсчитано, что необходимая для этого энергия чрезвычайно мала: энергия релаксированной ДНК в присутствии топоизомеразы II и АТР отличается от равновесной меньше, чем на kT [25]. Физиологическая значимость неравновесного упрощения топологии тоже находится под вопросом [21]. В частности, полное разделение дочерних хроматид, как сейчас известно [26], достигается за счет положительной сверхспирализации, вносимой конденсинами.

Бейтс (Bates) и соавт. [21] предположили, что энергия АТР необходима для сохранения прочных контактов между субъединицами фермента в комплексе с разорванной ДНК. Действительно, хотя ДНК-топоизомеразы IIA могут расщеплять ДНК и в отсутствие АТР, связывание АТР значительно стимулирует реакцию. На основании анализа кристаллической структуры топоизомеразы II дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [27] предлагается следующее объяснение того, как смещается равновесие в присутствии АТР. При связывании ДНК происходят конформационные изменения фермента, приводящие к тому, что тирозины активных сайтов оказываются вблизи фосфодиэфирных связей, однако на расстоянии, недостаточном для нуклеофильной атаки. Происходящая при связывании АТР димеризация N-концевого домена приводит к структурным изменениям, перемещающим тирозины в позицию, необходимую для катализа. C-концевые ворота фермента в комплексе с разорванной ДНК закрыты, а в комплексе с цельной ДНК — открыты. Информация об изменении положения каталитического тирозина Y782 при расщеплении ДНК передается к C-воротам, находящимся на расстоянии 50 Å от активного сайта фермента, через сеть солевых мостиков. Таким образом, АТР-зависимое закрытие N-концевых и C-концевых ворот фермента при расщеплении ДНК представляет собой защитный механизм, предотвращающий диссоциацию двух субъединиц фермента в то время, как ДНК находится в разорванном состоянии. Этот механизм обеспечивает защиту клетки от опасности возникновения двухцепочечных разрывов ДНК и незаконной рекомбинации [21].

ДНК-топоизомеразе II для катализа необходимы также ионы Mg^{2+} . Анализ кристаллической структуры показал, что в активном сайте фермента находятся два иона металла: один принимает непосредственное участие в нуклеофильной атаке, стабилизируя уходящую группу, а другой фиксирует ДНК [11, 27]. По-видимому, механизм расщепления ДНК с участием ионов Mg^{2+} у топоизомераз IA и IIA сходен [10, 11].

У *E. coli* есть два фермента, относящиеся к типу IIA — ДНК-гираза и топоизомераза IV. ДНК-

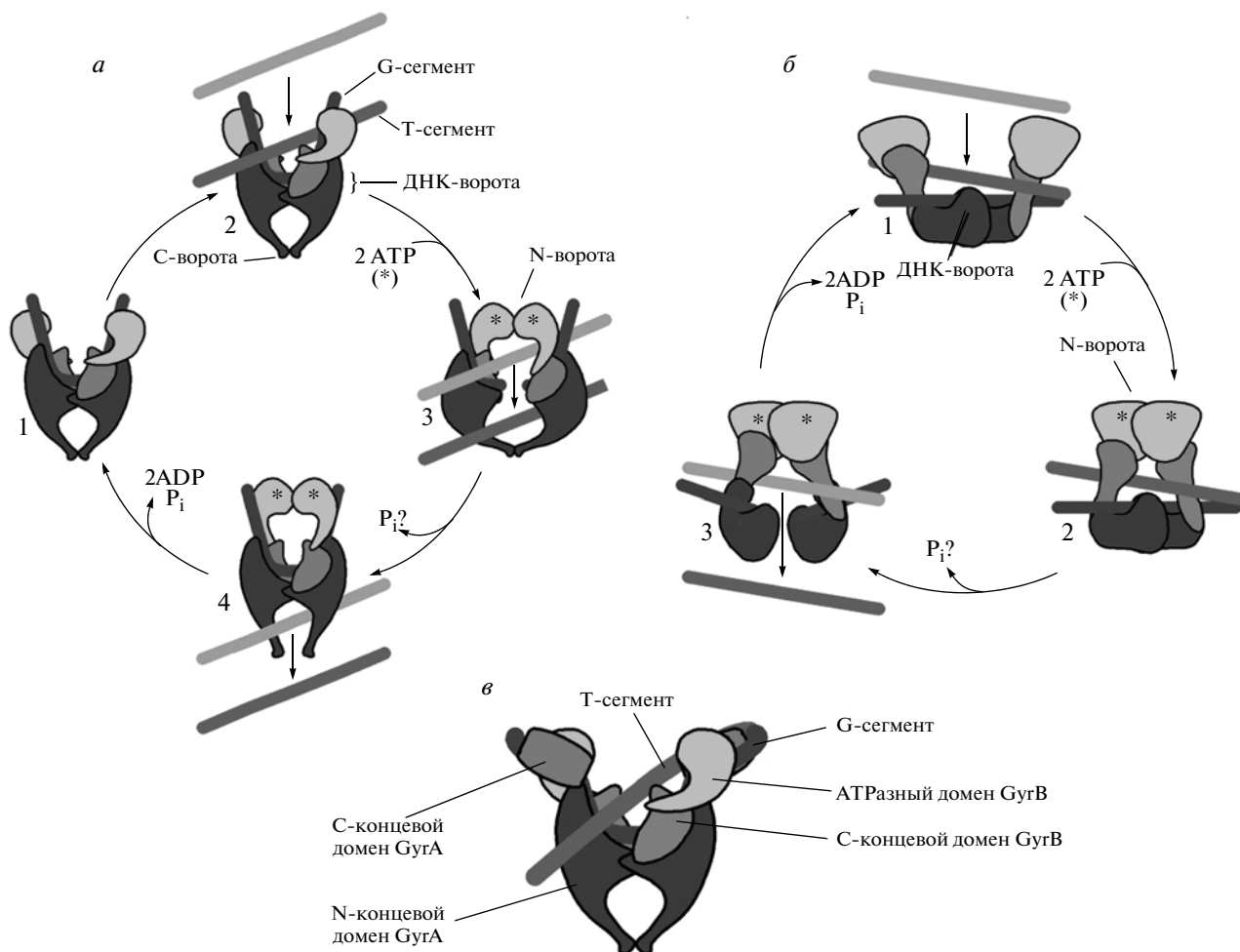


Рис. 3. Схема механизма действия топоизомераз типа II (по [21] с разрешения издателя). *а* – Механизм работы топоизомераз типа IIA (см. текст). Отмечены G-(воротный) и T-(транспортный) сегменты ДНК. Также отмечены N-концевые и C-концевые ворота и ДНК-ворота. *б* – Механизм топоизомераз типа IIB (топоизомеразы VI). Отмечены N-концевые и ДНК-ворота. *в* – Структура ДНК-гиразы с ДНК, закрученной вокруг С-концевого домена субъединицы А с образованием правого перекреста. Отмечены различные домены фермента: АТФазный домен (N-концевой домен субъединицы В), С-концевой домен субъединицы В, N-концевой домен субъединицы А, отвечающий за расщепление и соединение цепей, С-концевой домен субъединицы А, отвечающий за образование (+)-сверхвитка.

гираза использует энергию гидролиза АТФ для введения отрицательных сверхвитков в молекулу ДНК, а также способна к релаксации положительных и отрицательных сверхвитков (для этих процессов АТФ не нужен [23]). Как и все топоизомеразы типа II, ДНК-гираза вносит двухцепочечный разрыв в один сегмент ДНК и продергивает через него другой. Уникальность этого фермента состоит в том, что он закручивает участок ДНК длиной около 130 п.н. вокруг себя [28, 29], образуя, таким образом, положительный сверхвиток, который после продергивания цепи превращается в отрицательный (см. рис. 3в и рис. 4). В случае, когда два сегмента ДНК (G и T) принадлежат разным молекулам, происходит образование/разрешение катенанов, однако ДНК-гираза осуществляет декатенацию сравнительно неэффективно. Если G и T сегменты являются частью одной мо-

лекулы ДНК, продергивание цепи приводит к изменению числа зацеплений на два. ДНК-гираза представляет собой тетрамер А₂В₂. Субъединица В (gyrB) состоит из двух доменов: N-концевого – АТФазного и С-концевого, взаимодействующего с субъединицей А и ДНК. В свою очередь, субъединица А (gyrA) составляет активный центр фермента, а ее С-концевой домен необходим для закручивания ДНК вокруг фермента. Делеция С-концевого домена субъединицы А делает ДНК-гиразу неспособной к внесению (–)-сверхвитков, однако такой мутантный фермент может по-прежнему осуществлять релаксацию и декатенацию [30].

Многие особенности механизма действия ДНК-гиразы, отличающие ее от эукариотической ДНК-топоизомеразы II, остаются неясными. Связывание негидролизованного аналога АТФ –

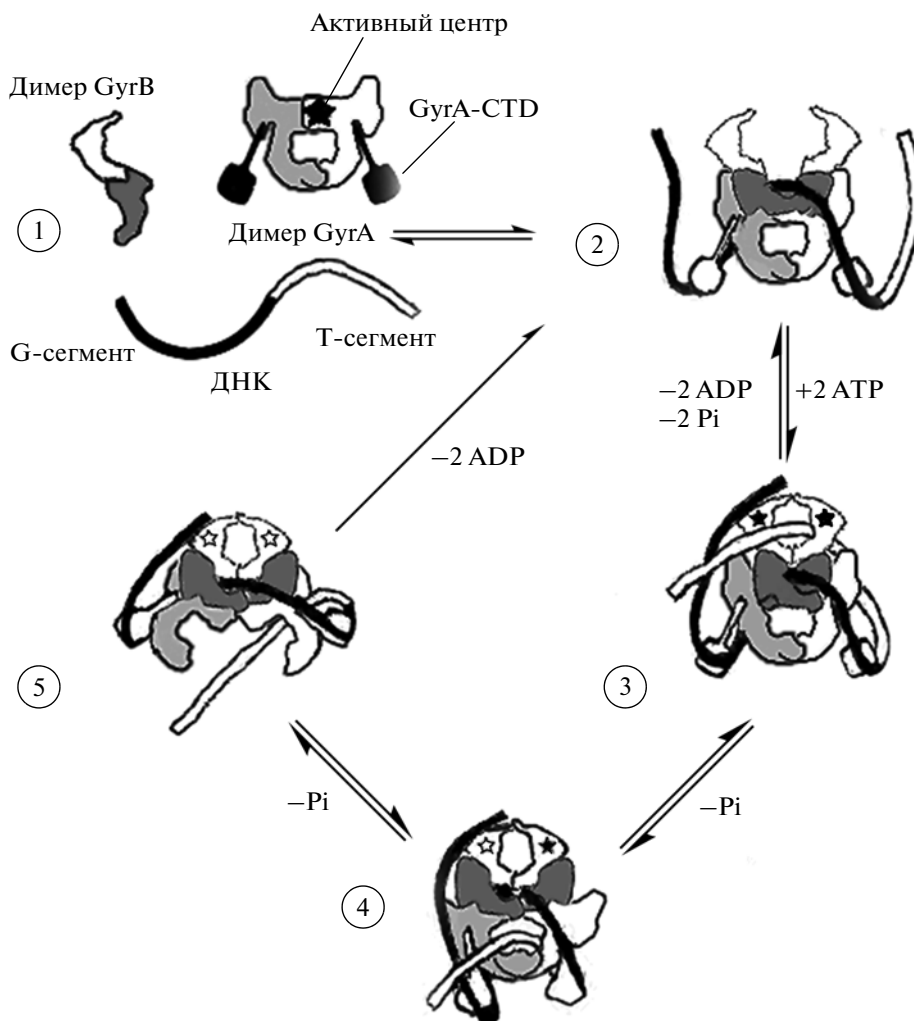


Рис. 4. Схема механизма действия ДНК-гиразы. 1 – Димеры GyrA и GyrB в растворе до образования комплекса с ДНК. Звездочкой отмечен активный центр в составе димера GyrA. Отмечен С-концевой домен GyrA (GyrA-CTD), необходимый для осуществления реакции сверхспирализации. Молекула ДНК схематично разделена на транспортный и воротный (Т и G) сегменты. 2 – Гириза образует комплекс с ДНК, которая закручивается вокруг фермента. 3 – Связывание АТР приводит к димеризации N-концевого домена GyrB, что приводит к захвату Т-сегмента. 4 – Гидролиз молекулы АТР сопряжен с расщеплением воротного сегмента и перемещением Т-сегмента через него. 5 – Гидролиз второй молекулы АТР приводит к высвобождению Т-сегмента через С-концевые ворота.

ADPNP – приводит к необратимому закрытию входных ворот фермента (N-gate). В таком комплексе возможен лишь единичный акт перемещения Т-сегмента через разрыв в G-сегменте. Эффективность перемещения зависит от топологии ДНК: она составляет 100% для положительно сверхспирализованной, 25% – для релаксированной и стремится к нулю для отрицательно сверхспирализованной [23]. Предполагалось, что вероятность переноса Т-сегмента через разрыв определяется вероятностью захвата Т-сегмента N-воротами, а также тем, что захват Т-сегмента стимулирует гидролиз АТР. Согласно этой гипотезе, скорость гидролиза АТР должна зависеть от топологии ДНК.

Позднее стали появляться данные, противоречащие этой концепции, в частности, оказалось, что скорость гидролиза АТР не зависит от топологии ДНК. На основании этих и других данных [31] предложена модель, которая состоит в следующем. Независимо от топологии субстрата при связывании АТР высоко вероятен захват Т-сегмента, что стимулирует гидролиз АТР и расщепление G-сегмента. После переноса Т-сегмента через разрыв он не обязательно высвобождается через С-ворота фермента; напротив, он находится в состоянии равновесия между положением до и после ДНК-ворот. Сдвиг этого равновесия зависит от топологии субстрата: Т-сегмент положительно сверхспирализованной ДНК находится преимущественно за ДНК-воротами, а отрица-

тельно сверхспирализованной — перед ними. Гидролиз АТР, согласно этой модели, нужен для высвобождения Т-сегмента.

Вторая бактериальная ДНК-топоизомераза типа ПА — топоизомераза IV — родственна ДНК-гиразе. Тем не менее, она способна к АТР-зависимому введению отрицательных сверхвитков, но обладает повышенным сродством к положительно сверхспирализованной и катенированной ДНК и выполняет в клетке функции декатеназы [32]. Топоизомераза IV — гетеротетрамер, состоящий из субъединиц ParC и ParE. Для специфичности связывания определенных форм ДНК необходим С-концевой домен субъединицы ParC, представляющий собой укороченный С-концевой домен А-субъединицы гиразы [33].

К топоизомеразам типа ПВ относится ДНК-топоизомераза VI [34]. Последовательность, кодирующая ее, обнаружена во всех секвенированных геномах архей, а также в геномах некоторых растений (например, *Arabidopsis thaliana*) [35]. ДНК-топоизомераза VI представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух А и двух В субъединиц — А₂В₂. При сравнительном анализе белковых последовательностей ДНК-топоизомеразы VI и ДНК-топоизомеразы ПА выявляется слабая гомология между субъединицей В ДНК-топоизомеразы VI и топоизомеразой ПА, а также другими АТР-связывающими белками [35]. При определении кристаллической структуры ДНК-топоизомеразы VI из археи *Methanosarcina mazei* [36] показано, что фермент похож на шипцы, в которых четыре субъединицы объединяются и формируют одну внутреннюю полость для связывания ДНК. Субъединица А топоизомеразы VI гомологична эукариотическому белку Spo11, который расщепляет ДНК в процессе гомологичной рекомбинации при мейозе [37]. Она содержит в себе домены, характерные для топоизомераз типа ПА: металл-связывающий домен TOPRIM (Topoisomerase-Primase), а также домен WHD (Winged-Helix Domain), который включает активный центр фермента, расщепляющий ДНК. Возможно, при мейозе Spo11 рекрутируется субъединицей В для внесения двухцепочечных разрывов в ДНК или действует в качестве димера, образуя стабильный комплекс расщепленной ДНК, ковалентно связанной с белком [21]. Несмотря на слабое сходство аминокислотных последовательностей ДНК-топоизомеразы VI и других топоизомераз II типа механизмы их действия сходны [36]. В обоих случаях каталитический цикл начинается со связывания белком G-сегмента ДНК. Связывание Т-сегмента ДНК и АТР приводит к димеризации АТР-разных доменов комплекса. Полагают, что гидролиз АТР индуцирует конформационные изменения фермента, приводящие к расщеплению G-сегмента и пропусканию Т-сегмента через разрыв в G-сегменте (см. рис. 3б).

УЧАСТИЕ ТОПОИЗОМЕРАЗ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ КЛЕТКИ

Инициация репликации

Для инициации репликации необходимо локальное расплавление участка ДНК. Репликация плазмид *in vitro* требует отрицательно сверхспирализованной ДНК: появление дополнительных отрицательных сверхвитков при транскрипции облегчает инициацию, а угнетение ДНК-гиразы, вносящей отрицательные сверхвитки в хромосомы бактерий, затрудняет ее. Для инициации в вирусных (SV40, папилломавирус и другие) системах, равно как и во многих эукариотических системах, также требуется присутствие топоизомераз I и II. Предполагается, что у млекопитающих топоизомераза I участвует в выборе точки начала репликации в начале фазы G1, влияя на связывание Orc2, и необходима для инициации процесса репликации, участвуя в разделении цепей и начале движения вилки. В то же время топоизомераза II поддерживает локальную структуру ДНК во время сборки пре-RC-комплекса (возможно, удаляя лишние (-)-сверхвитки, образующиеся при связывании HsORC) [38]

Репликация ДНК

Движение репликационной вилки приводит к накоплению положительных сверхвитков в участке ДНК, в сторону которого движется вилка. Снятие топологического напряжения может, в принципе, осуществляться двумя способами: или релаксацией топоизомеразой II и IV, или с помощью вращения репликационной вилки. В последнем случае сверхвитки превращаются в переплетения двух дочерних хроматид за вилкой. На дрожжевых хромосомах показано, что топоизомераза I работает за вилкой, релаксируя отрицательные сверхвитки, а топоизомераза II работает перед вилкой, устраняя (+)-витки [39]. Процесс вращения репликационной вилки требует участия белков Smc5/6, связывающих катенированные участки ДНК [40]. Для разделения дочерних хромосом клетке необходимы ферменты типа II, способные оперировать двухцепочечными фрагментами ДНК. У бактерий декатенация осуществляется преимущественно топоизомеразой IV при участии бактериальных конденсинов (MukBEF) [41–43]. У эукариот положительная сверхспирализация, возникающая при участии конденсина (Smc2), способствует эффективной декатенации с помощью топоизомеразы II [26, 44].

При столкновении вилок, движущихся навстречу друг другу, репликация продолжается до момента, пока недореплицированный участок ДНК не станет слишком коротким для связывания топоизомеразы, при этом из-за накопления

топологического напряжения репликация останавливается. Предполагается, что с такими интермедиатами связываются комплексы топоизомеразы III и хеликазы семейства RecQ. В частности, недавно показано, что топоизомераза III *E. coli* в комплексе с хеликазой RecQ способна устранять подобные структуры *in vitro* [45].

Транскрипция

В отличие от репликации, при транскрипции разделение цепей ДНК происходит лишь локально. Таким образом, необходимость в участии топоизомераз в этом процессе зависит, главным образом, от того, насколько свободно транскрипционный комплекс может вращаться вокруг ДНК. Среди проблем, которые могут препятствовать этому, надо назвать котранскрипционное встраивание образующихся белков в мембрану, что часто происходит у прокариот [46–48]. При отсутствии возможности свободного вращения транскрипция приводит к созданию (+)-сверхспирального домена перед РНК-полимеразой и (–)-сверхспирального – за ней [49, 50]. Для их устранения бактерии используют соответственно ДНК-гиразу и топоизомеразу I. В штаммах *E. coli*, мутантных по гену топоизомеразы I (*topA*), повышенный уровень отрицательной сверхспирализации за РНК-полимеразой приводит к спариванию ДНК и синтезирующейся РНК (образованию R-петель), что, в свою очередь, приводит к губительному для клетки сверхвысокому уровню отрицательной суперспирализации за счет активности ДНК-гиразы [51]. У эукариот транскрипция также связана с изменением сверхспирализации из-за ассоциации транскрипционных комплексов с ядерными структурами [52–54], а также сплайсосомы, факторами модификации хроматина и другими ядерными белками [55]. В работе, посвященной исследованию транскрипции рибосомных генов в мутантах по топоизомеразе I и II, показано, что каждому из ферментов отведена своя роль: топоизомераза I функционирует, релаксируя (–)-сверхвитки за полимеразой, топоизомераза II снимает (+)-сверхвитки перед полимеразой [56].

Во время интерфазы топоизомераза II дрожжей ассоциирована либо с репликационной вилкой, либо с промоторными участками [39]. Точная роль топоизомеразы II в этом случае не ясна: либо она предотвращает столкновение репликационных и транскрипционных комплексов, либо необходима для начала транскрипции определенных генов [57]. Топоизомераза II человека и дрозофилы ассоциирована с АТФ-зависимыми комплексами перестройки (ремоделинга) хроматина [58, 59]. Есть работы, прямо указывающие на необходимость топоизомеразы II для деконденсации хроматина в процессе регуляции экспрессии генов [60–63].

Так же, как и у прокариот, активность топоизомеразы I в клетках человека предотвращает образование R-петель в процессе транскрипции, при этом она работает в комплексе с факторами сплайсинга ASF/SF2, инактивация генов которых приводит к такому же фенотипу, как и инактивация гена топоизомеразы, а именно – к накоплению застрявших репликационных вилок и разрывов хромосом в богатых генами участках [64].

Полногеномные исследования дрожжей *Saccharomyces pombe* также свидетельствуют о том, что топоизомераза I необходима для разборки нуклеосом при инициации транскрипции. По-видимому, она работает совместно с АТФ-зависимым комплексом ремоделинга Hrp1 [65]. Показано также, что топоизомераза I работает как коактиватор в эукариотической системе транскрипции *in vitro*, облегчая формирование комплекса TFIIID-TFIIA на промоторе [66]. Таким образом, топоизомераза I представляется одним из центральных ферментов, необходимых для координации процессов транскрипции и репликации.

Рекомбинация ДНК

Топологические проблемы разделения хромосом после репликации тесно связаны с проблемами, возникающими при рекомбинации ДНК. Если во время мейоза образование структур Холлидея необходимо для разделения гомологичных хромосом и разрешение этих структур в половине случаев приводит к образованию кроссоверных продуктов, то при митотических делениях разрешение структур Холлидея происходит с образованием минимального количества кроссоверных продуктов без участия белков гомологичной рекомбинации [67]. Судя по всему, топоизомеразы IA в комплексе с хеликазами семейства RecQ являются специальной системой, позволяющей клетке устранять двойные структуры Холлидея без привлечения ферментов гомологичной рекомбинации и без образования кроссоверных продуктов. Отсутствие хеликаз RecQ или топоизомеразы III приводит к повышенной частоте кроссинговеров, к генетической нестабильности и образованию опухолей. Напомним, что такой же комплекс топоизомеразы IA и хеликазы RecQ участвует, по-видимому, в разрешении интермедиатов репликации, состоящих из двух столкнувшихся вилок (см. выше).

Многочисленные генетические и биохимические данные, указывают на взаимодействие топоизомеразы III дрожжей с хеликазой из семейства RecQ Sgs1. Третий партнер топоизомеразы III и Sgs1 – белок Rmi1. Он стимулирует связывание топоизомеразы с одноцепочечной ДНК, одновременно облегчая связывание топоизомеразы с Sgs1 и взаимодействие хеликазы с ДНК [68]. Комплекс Top3 • Sgs • Rmi1 необходим для уста-

новления когезии сестринских хроматид [69]. Топоизомераза III α человека способна катализировать разрешение структур Холлидея *in vitro*, при этом ее активность специфически стимулируется белками BLM [70] (хеликаза семейства RecQ, участвующая в процессах репарации) и RMI1 [71]. Аналогичные результаты получены при изучении топоизомеразы I дрозофилы [72]. Цитогенетические опыты на мышах также свидетельствуют в пользу того, что топоизомераза III β участвует в разрешении образовавшихся после рекомбинации структур Холлидея [73].

Топоизомеразы и организация хроматина

Компактизация хроматина и сегрегация хромосом — связанные между собой процессы. Многочисленные генетические, биохимические и цитологические исследования подтверждают участие топоизомераз типа II в организации хроматина и в процессе конденсации хроматина во время митоза у всех живых организмов. Топоизомераза II человека — основной негистоновый белок в каркасе метафазных хромосом [74]. Участки ДНК, ассоциированные с топо II, совпадают с так называемыми MAR/SAR участками присоединения петель ДНК к ядерному каркасу; в свою очередь эти участки обладают высокой аффинностью к топо II [75–77]. В составе этих участков наблюдаются характерные АТ-богатые последовательности, которые благодаря высокой конформационной подвижности являются предпочтительными местами связывания топоизомеразы II [78]. При обработке ядер ингибиторами топо II, вызывающими образование стабильного двухцепочечного разрыва, такими как этопозид, можно, действительно, наблюдать разрезание ДНК на петли размером 20–300 т.п.н., которые могут представлять собой отдельные топологические домены ядра [79, 80]. При помощи атомной силовой и флуоресцентной микроскопии показано, что *in vitro* топо II действует как зажим, держащий две цепи ДНК вместе [81]. Связывание топоизомеразы II с 30-нм фибриллами, даже в отсутствие АТР (но при обязательном участии гистона H1), приводит к их агрегации и превращении в глобулярную структуру. Тем не менее, изучение флуоресцентно меченных эукариотических топоизомераз III α и β показало, что ни один из белков не есть неподвижный структурный компонент ядерного матрикса и, таким образом, вероятно взаимодействия между топоизомеразой II и компонентами хроматина являются динамическими по своей природе [82].

После низкосолевого экстракционного белков конденсированных эукариотических хромосом можно “увидеть” каркас хромосомы, содержащей, в основном, топоизомеразу II и конденсин. Конденсин-зависимая локализация топоизомеразы II на осевых структурах хромосомы необходима для

нормального разделения хроматид во время митоза [44]. Можно представить себе, что конденсация хромосом происходит в две стадии, первая из которых состоит в образовании топоII-содержащего стержня хромосомы, а вторая — в следующей за этим сверхспирализации, опосредованной конденсином. При этом для правильной сборки содержащих топоизомеразу II структур необходима репликация ДНК [83]. В работах *in vitro* также показано, что выполняющая функции декатеназы топоизомераза IV *E. coli* ассоциируется с бактериальным конденсином MukB и что активность топоизомеразы стимулируется белком MukB [42, 43].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия ДНК-топоизомераз [84] прошло 40 лет, но только в последние 10–15 лет мы смогли, наконец, приблизиться к пониманию механизмов работы этих ферментов на молекулярном уровне. Этому способствовало, с одной стороны, то, что в последние годы накоплено большое количество структурных данных (что, в свою очередь связано с развитием вычислительной техники и методов рентгеноструктурного анализа), а с другой, то, что получили развитие такие биофизические методы, как магнитные и оптические ловушки, позволяющие охарактеризовать кинетические параметры ферментативных реакций на уровне отдельных молекул и оценить влияние механического напряжения на эти параметры [85]. Дальнейшее углубление нашего понимания механизмов работы топоизомераз будет связано, во многом, с исследованием новых структур предполагаемых промежуточных состояний (или, по крайней мере, установлением самого существования этих состояний) с помощью таких методов, как FRET. Вместе с тем, изучение функций топоизомераз в клетке, сопряженное с развитием наших представлений об организации хроматина, привело к новому пониманию роли топоизомераз как важнейших элементов, поддерживающих стабильность и организацию ДНК у всех живых организмов.

Интерес к топоизомеразам связан и с тем, что многочисленные антибактериальные и противоопухолевые лекарственные препараты воздействуют на них [86, 87]. Впрочем, успехи в применении этих препаратов осложняются проблемой все возрастающей устойчивости бактерий к антибиотикам [88], в первом случае, и проблемой достижения избирательности действия ингибитора на опухоль — во втором. Решение этих проблем, равно как и создание новых перспективных препаратов (таких как ингибиторы топоизомеразы IA [89]), требует дополнительного изучения не только строения и механизмов работы топоизомер-

раз, но и изучения их участия в физиологических процессах.

Работа получила финансовую поддержку Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009–2013” (государственный контракт П11068).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J.C. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 430–440.
2. Kirkegaard K., Wang J.C. 1985. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J. Mol. Biol.* **185**, 625–637.
3. Wang J.C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635–692.
4. Dean F.B., Cozzarelli N.R. 1985. Mechanism of strand passage by *Escherichia coli* topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J. Biol. Chem.* **260**, 4984–4994.
5. Baker N.M., Rajan R., Mondragon A. 2009. Structural studies of type I topoisomerases. *Nucl. Acids Res.* **37**, 693–701.
6. Lima C.D., Wang J.C., Mondragon A. 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature.* **367**, 138–146.
7. Li Z., Mondragon A., DiGate R.J. 2001. The mechanism of type IA topoisomerase-mediated DNA topological transformations. *Mol. Cell.* **7**, 301–307.
8. Dekker N.H., Rybenkov V.V., Duguet M., Crisona N.J., Cozzarelli N.R., Bensimon D., Croquette V. 2002. The mechanism of type IA topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 12126–12131.
9. Dekker N.H., Viard T., de La Tour C.B., Duguet M., Bensimon D., Croquette V. 2003. Thermophilic topoisomerase I on a single DNA molecule. *J. Mol. Biol.* **329**, 271–282.
10. Zhang Z., Cheng B., Tse-Dinh Y.C. 2011. Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 6939–6944.
11. Schmidt B.H., Burgin A.B., Dewese J.E., Osheroff N., Berger J.M. 2010. A novel and unified two-metal mechanism for DNA cleavage by type II and IA topoisomerases. *Nature.* **465**, 641–644.
12. Rodriguez A.C. 2002. Studies of a positive supercoiling machine. Nucleotide hydrolysis and a multifunctional “latch” in the mechanism of reverse gyrase. *J. Biol. Chem.* **277**, 29865–29873.
13. Capp C., Qian Y., Sage H., Huber H., Hsieh T.S. 2010. Separate and combined biochemical activities of the subunits of a naturally split reverse gyrase. *J. Biol. Chem.* **285**, 39637–39645.
14. del Toro Duany Y., Jungblut S.P., Schmidt A.S., Klostermeier D. 2008. The reverse gyrase helicase-like domain is a nucleotide-dependent switch that is attenuated by the topoisomerase domain. *Nucl. Acids Res.* **36**, 5882–5895.
15. Ganguly A., Del Toro Duany Y., Rudolph M.G., Klostermeier D. 2010. The latch modulates nucleotide and DNA binding to the helicase-like domain of *Thermotoga maritima* reverse gyrase and is required for positive DNA supercoiling. *Nucl. Acids Res.* **39**, 1789–1800.
16. Champoux J.J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413.
17. Koster D.A., Croquette V., Dekker C., Shuman S., Dekker N.H. 2005. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. *Nature.* **434**, 671–674.
18. Woo M.H., Losasso C., Guo H., Pattarello L., Benedetti P., Bjornsti M.A. 2003. Locking the DNA topoisomerase I protein clamp inhibits DNA rotation and induces cell lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 13767–13772.
19. Carey J.F., Schultz S.J., Sisson L., Fazio T.G., Champoux J.J. 2003. DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 5640–5645.
20. Berger J.M., Gamblin S.J., Harrison S.C., Wang J.C. 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature.* **379**, 225–232.
21. Bates A.D., Berger J.M., Maxwell A. 2011. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks. *Nucl. Acids Res.* **39**, 6327–6239.
22. Rybenkov V.V., Ullsperger C., Vologodskii A.V., Cozzarelli N.R. 1997. Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science.* **277**, 690–693.
23. Bates A.D., Maxwell A. 2007. Energy coupling in type II topoisomerases: why do they hydrolyze ATP? *Biochemistry.* **46**, 7929–7941.
24. Vologodskii A. 2009. Theoretical models of DNA topology simplification by type IIA DNA topoisomerases. *Nucl. Acids Res.* **37**, 3125–3133.
25. Stuchinskaya T., Mitchenall L.A., Schoeffler A.J., Corbett K.D., Berger J.M., Bates A.D., Maxwell A. 2009. How do type II topoisomerases use ATP hydrolysis to simplify DNA topology beyond equilibrium? Investigating the relaxation reaction of nonsupercoiling type II topoisomerases. *J. Mol. Biol.* **385**, 1397–1408.
26. Baxter J., Sen N., Martinez V.L., De Carandini M.E., Schwartzman J.B., Diffley J.F., Aragon L. 2011. Positive supercoiling of mitotic DNA drives decatenation by topoisomerase II in eukaryotes. *Science.* **331**, 1328–1332.
27. Dong K.C., Berger J.M. 2007. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature.* **450**, 1201–1205.
28. Liu L.F., Wang J.C. 1978. DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell.* **15**, 979–984.
29. Ruthenburg A.J., Graybosch D.M., Huetsch J.C., Verdine G.L. 2005. A superhelical spiral in the *Escherichia coli* DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J. Biol. Chem.* **280**, 26177–26184.
30. Kampranis S.C., Maxwell A. 1996. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 14416–14421.

31. Kampranis S.C., Bates A.D., Maxwell A. 1999. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 8414–8419.
32. Ullsperger C., Cozzarelli N.R. 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 31549–31555.
33. Corbett K.D., Schoeffler A.J., Thomsen N.D., Berger J.M. 2005. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J. Mol. Biol.* **351**, 545–561.
34. Bergerat A., de Massy B., Gabelle D., Varoutas P.C., Nicolas A., Forterre P. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*. **386**, 414–417.
35. Forterre P., Gribaldo S., Gabelle D., Serre M.C. 2007. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. **89**, 427–446.
36. Corbett K.D., Benedetti P., Berger J.M. 2007. Holoenzyme assembly and ATP-mediated conformational dynamics of topoisomerase VI. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 611–619.
37. Nichols M.D., DeAngelis K., Keck J.L., Berger J.M. 1999. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J.* **18**, 6177–6188.
38. Rampakakis E., Gkogkas C., Di Paola D., Zannis-Hadjopoulos M. 2010. Replication initiation and DNA topology: The twisted life of the origin. *J. Cell Biochem.* **110**, 35–43.
39. Bermejo R., Doksani Y., Capra T., Katou Y.M., Tanaka H., Shirahige K., Foiani M. 2007. Top1- and Top2-mediated topological transitions at replication forks ensure fork progression and stability and prevent DNA damage checkpoint activation. *Genes Dev.* **21**, 1921–1936.
40. Kegel A., Betts-Lindroos H., Kanno T., Jeppsson K., Strom L., Katou Y., Itoh T., Shirahige K., Sjogren C. 2011. Chromosome length influences replication-induced topological stress. *Nature*. **471**, 392–396.
41. Tadesse S., Mascarenhas J., Kusters B., Hasilik A., Graumann P.L. 2005. Genetic interaction of the SMC complex with topoisomerase IV in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **151**, 3729–3737.
42. Hayama R., Marians K.J. 2010. Physical and functional interaction between the condensin MukB and the decatenase topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 18826–18831.
43. Li Y., Stewart N.K., Berger A.J., Vos S., Schoeffler A.J., Berger J.M., Chait B.T., Oakley M.G. 2010. *Escherichia coli* condensin MukB stimulates topoisomerase IV activity by a direct physical interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 18832–18837.
44. Coelho P.A., Queiroz-Machado J., Sunkel C.E. 2003. Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J. Cell Sci.* **116**, 4763–4776.
45. Suski C., Marians K.J. 2008. Resolution of converging replication forks by RecQ and topoisomerase III. *Mol. Cell*. **30**, 779–789.
46. Lodge J.K., Kazic T., Berg D.E. 1989. Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J. Bacteriol.* **171**, 2181–2187.
47. Cook D.N., Ma D., Pon N.G., Hearst J.E. 1992. Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 10603–10607.
48. Lynch A.S., Wang J.C. 1993. Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **175**, 1645–1655.
49. Liu L.F., Wang J.C. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**, 7024–7027.
50. Wang J.C., Lynch A.S. 1993. Transcription and DNA supercoiling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 764–768.
51. Drolet M. 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol. Microbiol.* **59**, 723–730.
52. Cook P.R. 1999. The organization of replication and transcription. *Science*. **284**, 1790–1795.
53. Vreugde S., Ferrai C., Miluzio A., Hauben E., Marchisio P.C., Crippa M.P., Bussi M., Biffo S. 2006. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol. Cell*. **23**, 749–755.
54. Mitchell J.A., Fraser P. 2008. Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes Dev.* **22**, 20–25.
55. Perales R., Bentley D. 2009. “Cotranscriptionality”: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol. Cell*. **36**, 178–191.
56. French S.L., Sikes M.L., Hontz R.D., Osheim Y.N., Lambert T.E., El Hage A., Smith M.M., Tollervey D., Smith J.S., Beyer A.L. 2010. Distinguishing the roles of topoisomerases I and II in relief of transcription-induced torsional stress in yeast rRNA genes. *Mol. Cell Biol.* **31**, 482–494.
57. Ju B.G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. 2006. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science*. **312**, 1798–1802.
58. Varga-Weisz P.D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P.B. 1997. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*. **388**, 598–602.
59. LeRoy G., Loyola A., Lane W.S., Reinberg D. 2000. Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J. Biol. Chem.* **275**, 14787–14790.
60. Perillo B., Ombra M.N., Bertoni A., Cuozzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E.V. 2008. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. *Science*. **319**, 202–206.
61. Tsutsui K.M., Sano K., Hosoya O., Tsutsui K. 2006. Expression dynamics and functional implications of DNA topoisomerase II beta in the brain. *Anat. Sci. Int.* **81**, 156–163.

62. Tsutsui K., Sano K., Kikuchi A., Tokunaga A. 2001. Involvement of DNA topoisomerase IIbeta in neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 5769–5778.
63. Sano K., Miyaji-Yamaguchi M., Tsutsui K.M., Tsutsui K. 2008. Topoisomerase IIalpha activates a subset of neuronal genes that are repressed in AT-rich genomic environment. *PLoS One.* **3**, e4103.
64. Tuduri S., Crabbe L., Conti C., Tourriere H., Holtgreve-Grez H., Jauch A., Pantescio V., De Vos J., Thomas A., Theillet C., Pommier Y., Tazi J., Coquelle A., Pasero P. 2009. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1315–1324.
65. Durand-Dubief M., Persson J., Norman U., Hartsuiker E., Ekwall K. 2010. Topoisomerase I regulates open chromatin and controls gene expression *in vivo*. *EMBO J.* **29**, 2126–2134.
66. Shykind B.M., Kim J., Stewart L., Champoux J.J., Sharp P.A. 1997. Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription. *Genes Dev.* **11**, 397–407.
67. Dayani Y., Simchen G., Lichten M. 2011. Meiotic Recombination Intermediates Are Resolved with Minimal Crossover Formation during Return-to-Growth, an Analogue of the Mitotic Cell Cycle. *PLoS Genet.* **7**, e1002083.
68. Chen C.F., Bril S.J. 2007. Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. *J. Biol. Chem.* **282**, 28971–28979.
69. Lai M.S., Seki M., Ui A., Enomoto T. 2007. Rmi1, a member of the Sgs1-Top3 complex in budding yeast, contributes to sister chromatid cohesion. *EMBO Rep.* **8**, 685–690.
70. Wu L., Hickson I.D. 2003. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature.* **426**, 870–874.
71. Yang J., Bachrati C.Z., Ou J., Hickson I.D., Brown G.W. 2010. Human topoisomerase IIIalpha is a single-stranded DNA decatenase that is stimulated by BLM and RMI1. *J. Biol. Chem.* **285**, 21426–21436.
72. Plank J.L., Wu J., Hsieh T.S. 2006. Topoisomerase IIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 11118–11123.
73. Kwan K.Y., Moens P.B., Wang J.C. 2003. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase III beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2526–2531.
74. Gasser S.M., Laroche T., Falquet J., Boy de la Tour E., Laemmli U.K. 1986. Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. *J. Mol. Biol.* **188**, 613–629.
75. Gasser S.M., Laemmli U.K. 1986. The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* **5**, 511–518.
76. Adachi Y., Kas E., Laemmli U.K. 1989. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* **8**, 3997–4006.
77. Cockerill P.N., Garrard W.T. 1986. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell.* **44**, 273–282.
78. Masliah G., Rene B., Zargarian L., Fermandjian S., Mauffret O. 2008. Identification of intrinsic dynamics in a DNA sequence preferentially cleaved by topoisomerase II enzyme. *J. Mol. Biol.* **381**, 692–706.
79. Razin S.V., Petrov P., Hancock R. 1991. Precise localization of the alpha-globin gene cluster within one of the 20- to 300-kilobase DNA fragments released by cleavage of chicken chromosomal DNA at topoisomerase II sites *in vivo*: evidence that the fragments are DNA loops or domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 8515–8519.
80. Iarovaia O.V., Bystritskiy A., Ravcheev D., Hancock R., Razin S.V. 2004. Visualization of individual DNA loops and a map of loop domains in the human dystrophin gene. *Nucl. Acids Res.* **32**, 2079–2086.
81. Hizume K., Araki S., Yoshikawa K., Takeyasu K. 2007. Topoisomerase II, scaffold component, promotes chromatin compaction *in vitro* in a linker-histone H1-dependent manner. *Nucl. Acids Res.* **35**, 2787–2799.
82. Christensen M.O., Larsen M.K., Barthelmes H.U., Hock R., Andersen C.L., Kjeldsen E., Knudsen B.R., Westergaard O., Boege F., Mielke C. 2002. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J. Cell Biol.* **157**, 31–44.
83. Gimenez-Abian J.F., Clarke D.J. 2003. Replication-coupled topoisomerase II templates the mitotic chromosome scaffold? *Cell Cycle.* **2**, 230–232.
84. Wang J.C. 1971. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J. Mol. Biol.* **55**, 523–533.
85. Koster D.A., Crut A., Shuman S., Bjornsti M.A., Dekker N.H. 2010. Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective. *Cell.* **142**, 519–530.
86. Maxwell A. 1999. DNA gyrase as a drug target. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 48–53.
87. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **17**, 421–433.
88. Fischbach M.A., Walsh C.T. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science.* **325**, 1089–1093.
89. Tse-Dinh Y.C. 2009. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. *Nucl. Acids Res.* **37**, 731–737.