

- revisiae* into mammalian cells // V. Pachnis, L. Pevny, R. Rothstein, F. Costantini // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1990.— 87, N 13.— P. 5109—5113.
3. Pavan W. I., Hieter Ph., Reeves R. H. Modification and transfer into an embryonal carcinoma cell line of a 360-kilobase human-derived yeast artificial chromosome // Mol. and Cell. Biol.— 1990.— 10, N 8.— P. 4163—4169.
4. Ganai M. W., Tanksley S. D. Analysis of tomato DNA by pulsed field gel electrophoresis // Plant Mol. and Biol. Rep.— 1989.— 7, N 1.— P. 17—27

Ин-т клеточ. биологии и генет. пиженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 577.152.5

Л. А. Ситайло

ХЛОРОПЛАСТНАЯ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗА I ТИПА ИЗ ЛИСТЬЕВ ГОРОХА

Из полученных на ступенчатом градиенте изоосмотического перколла хлоропластов из листьев гороха выделена фракционированием в двухфазной системе сульфат аммония / полиэтиленгликоль-6000 с дальнейшей очисткой хроматографией на колонках хлоропластная ДНК-топоизомераза. Зависимость релаксирующей активности фермента от ионов Mg^{2+} , блокирование ее бромистым этидием, отсутствие стимуляции релаксирующей активности полиамминами: спермидином, спермином, кадаверином, а также характер распределения топоизомеров в геле позволяют охарактеризовать топоизомеразу как прокариотическую I типа. Исследовано действие различных кофакторов на релаксирующую активность фермента.

Введение. Суперспирализация ДНК в клетках вызывает много топологических проблем, которые должны разрешаться клеткой для обеспечения протекания нормальных процессов репликации, транскрипции, рекомбинации и в конечном итоге экспрессии генетической информации [1, 2]. Ферменты, контролирующие топологические состояния ДНК,— ДНК-топоизомеразы,— играют ключевую роль в выполнении физиологических функций ДНК. В эу- и прокариотических клетках топологические состояния ДНК регулируют два класса ферментов: ДНК-топоизомеразы I и II типов; топоизомеразы I типа — с помощью механизма, включающего введение одноцепочечного разрыва в одну из цепей ДНК, проведение нативной цепи через разрыв и восстановление нативности разорванной цепи [3, 4]. Хотя ДНК-топоизомеразы I типа не строго необходимы для жизнеспособности эукариотических клеток [5], они, тем не менее, существенно важны для организации хроматина [6], митоза [7], репликации ДНК [8], рекомбинации [9], транскрипции [10].

ДНК-топоизомеразы II типа изменяют топологию ДНК с помощью механизма, обеспечивающего введение двухцепочечного разрыва в ДНК, проведение сегмента ДНК через разрыв и восстановление разрыва [3]. В отличие от топоизомераз I типа они необходимы для жизнеспособности эукариотической клетки [11]. Исследования, проведенные за последние несколько лет, показали, что оба типа ферментов являются первичными клеточными мишенями для действия различных антибиотиков, обладающих противоопухолевой активностью [12]. Топоизомеразы I типа — для цитотоксического алкалоида камптотецина [13]; топоизомеразы II типа — для широкого круга химиотерапевтических антибиотиков, включающего адриамицин, эллиптицин, амсакрин, этопозид и тенипозид, а также их различные производные [14, 15].

ДНК-топоизомеразы из растительных организмов изучены слабо. На сегодняшний день имеется несколько работ по выделению и физико-химическим характеристикам этого класса ферментов [16—18]. Совсем мало среди них исследований, посвященных изучению ДНК-топоизомераз из хлоропластов [19, 20].

© Л. А. Ситайло, 1991.

Растительная клетка объединяет в себе три различные генетические системы: ядро, хлоропласты и митохондрии, тесно взаимодействующие между собой. Каждая такая система обладает собственным ферментативным аппаратом, обеспечивающим его функционирование. ДНК-топоизомераза — один из основных ферментов этого аппарата.

Материалы и методы. Выделение и очистка хлоропластной (хл) ДНК-топоизомеразы I типа из листьев гороха. Хлоропласты гороха выделяли согласно работе [21] с некоторыми модификациями. Лизис их осуществляли в гомогенизаторе («Daupse», США) в буфере состава: 30 мМ трис-НСl, рН 8,0, 2 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ бензамидин, 5 мМ ε-аминокапроновая кислота, 10 % глицерина в течение 20 мин. Лизат центрифугировали со скоростью 20 тыс. об/мин, 30 мин. Осадок отбрасывали, к супернатанту (фракция I) при слабом помешивании добавляли сухой полиэтиленгликоль-6000 (ПЭГ-6000) до конечной концентрации 10 % и раствор перемешивали в течение 20 мин. Нуклеиновые кислоты хлоропластов осаждали при 15 тыс. об/мин 20 мин. К супернатанту (фракция II) при помешивании добавляли порошок сульфата аммония до конечной концентрации 55 % и в течение 1 ч высаливали белки. После центрифугирования (20 тыс. об/мин, 20 мин) образовывалась двухфазная система ПЭГ/сульфат аммония, на границе которой находилась пленка белка. Эту пленку осторожно собирали и суспендировали в минимальном количестве буфера А: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 30 мМ KCl, 0,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДДТ, 1 мМ ФМСФ, 1 мМ бензамидин, 5 мМ ε-аминокапроновая кислота, 10 %-ный глицерин, быстро диализовали против этого буфера и вносили на колонку (7×1 см) с ДЭАЭ-52 (фракция III). Белки с колонки элюировали линейным градиентом концентрации KCl (30 мМ — 0,5 М) в буфере А. Фракции, содержащие топоизомеразную активность, объединяли и отдиализовывали против буфера А. Диализат (фракция IV) вносили на колонку с КМ-сефадексом Ц-25 (9×1 см). Белки с колонки элюировали линейным градиентом концентрации KCl (30 мМ — 1,5 М) в буфере А. Фракции, содержащие топоизомеразную активность, объединяли, отдиализовывали против буфера Г (буфер А, включающий 0,1 М KCl) — фракция V и вносили на колонку с гепарин-сефарозой (6×1 см). Элюцию белков с колонки осуществляли линейным градиентом концентрации KCl (0,1—1,5 М) в буфере Г. Фракции, содержащие топоизомеразную активность, объединяли и отдиализовывали против буфера П: 20 мМ калий-фосфат, рН 7,5, 0,1 М NaCl, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ, 5 мМ ε-аминокапроновая кислота, 10 %-ный глицерин (фракция VI) и вносили на колонку (4×1 см) с гидроксилпатитом (ГАП). Белки элюировали линейным градиентом концентрации (20 мМ — 0,5 М) калий-фосфата в буфере П. Фракции, содержащие топоизомеразную активность, объединяли, доводили концентрацию калий-фосфата до 0,2 М и вносили на колонку с гидроксилпатитом (2×0,5 см). Белки с колонки элюировали 0,32 М калий-фосфатом в буфере П. Пул фракций, содержащий топоизомеразную активность, объединяли и отдиализовывали против буфера состава: 50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 30 мМ KCl, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 мМ ФМСФ, 20 %-ный глицерин, распределяли на аликвоты и сохраняли при —20 °С.

Определение релаксирующей активности ДНК-топоизомераз I типа из хлоропластов листьев гороха. Релаксирующую активность ДНК-топоизомеразы I из хлоропластов листьев гороха определяли в объеме 20 мкл стандартной инкубационной смеси, содержащей 20 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl, 1 мМ ДДТ, 60 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,2 мкг отрицательно суперспирализованной ДНК с добавлением 10—40 нг фермента, и инкубировали смесь при 37 °С в течение 1 ч. Реакцию релаксации останавливали добавлением DS-Na до конечной концентрации 0,5 %, затем ЭДТА — до 30 мМ. После этого добав-

ляли 1 мкл протеиназы К (1 мг/мл) и инкубировали смесь еще в течение 30 мин.

Результаты и обсуждение. Выделение и очистка хлДНК-топоизомеразы I типа из листьев гороха. Свойства ДНК-топоизомеразы.

Данные по выделению и очистке хлДНК-топоизомеразы представлены в таблице.

Схема очистки хлДНК-топоизомеразы I типа из листьев гороха

Фракция	Белок, мг	Активность фермента, ед. акт*	Специфическая активность, ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Лизат хлоропластов	692**	34600	50	—	100
Лизат 10 %-ного ПЭГ	37	34000	919	19	98
ДЭАЭ-целлюлоза	32	33500	1047	22	97
КМ-сефадекс-Ц-25	14	30000	2143	50	86,6
Гепарин-сефароза	8	20000	2500	88	57,7
ГАП-I	1	10000	10000	704	28,9
ГАП-II (нанесение на колонку)	0,15	8000	53333	4696	23,1
ГАП-II (выход с колонки)	0,050	6000	120000	14090	17,4

* За единицу активности фермента принято такое его количество, которое способно релаксировать 0,5 мкг суперспиральной плазмидной ДНК за 1 ч в стандартном реакционном буфере; ** количество хлорофилла (a+b) в 1 мл лизата.

Нами замечено, что в исходном (2 М NaCl) лизате хлоропластов релаксирующая активность фермента детектировалась слабо из-за высокой активности нуклеаз. Однако от значительной части нуклеазной активности удавалось освободиться после хроматографии хлоропластного лизата на колонке с ДЭАЭ-52-целлюлозой. После второй хроматографии на колонке с КМ-сефадексом Ц-25 релаксирующая активность топоизомеразы детектировалась довольно хорошо. Концентрация соли (KCl) в этих фракциях составляла 0,2—0,23 М. Фракции с КМ-сефадекса Ц-25 также анализировали для выявления релаксирующей активности топоизомераз в присутствии АТФ. При этом не обнаружили дополнительной АТФ-зависимой релаксирующей активности и не заметили изменений активности уже локализованных фракций АТФ-независимой ДНК-топоизомеразы. Результаты такого анализа свидетельствуют об отсутствии АТФ-зависимой релаксирующей активности, то есть об отсутствии активности эукариотической топоизомеразы II типа. Имеются косвенные данные о наличии в экстрактах из хлоропластов ДНК-гиразной активности [19]. Однако выделить данный фермент в чистом виде пока никому не удалось. Мы тоже исследовали фракции с КС-сефадекса Ц-25, пытаясь выявить гиразную (суперспирализующую) активность. Для этого использовали в качестве субстрата релаксированную плазмидную ДНК, но обнаружить данную активность не удалось. Поскольку имеются сообщения об АМФ-зависимой релаксирующей активности некоторых лигаз [22], то эти же фракции тестировали и с целью обнаружения такой активности. Результат был отрицательным.

Определение релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы во фракциях с колонки с гепарин-сефарозой затруднялось тем, что в них частично попадал гепарин, который как известно, сам является ингибитором прокариотических топоизомераз. В связи с этим данные фракции перед реакцией релаксации разбавляли буфером, чтобы уменьшить ингибирующее действие гепарина. С гидроксилпатита хлоропластная топоизомераза элюировалась в интервале концентраций 260—300 мМ калий-фосфата, рН 7,5, что аналогично элюции хлоропластной топоизомеразы из листьев шпината [20]. Окончательная очистка фермента и одновременно его концентрирование достигались при повторной хроматографии на ГАП. Препарат фермента после этой хроматографии и анализа его электрофорезом в 10 %-ном полиакриламидном

геле (ПААГ) с DS-Na представлен одной полосой, молекулярная масса которой составляла 110 000 (рис. 1: электрофорез препарата очищенной хлДНК-топоизомеразы I типа в 10 %-ном ПААГ с DS-Na (фракция с ГАП-II колонки): 1, 2 — фракции с ГАП-II, содержащие очищенную хлДНК-топоизомеразу I типа; M — маркеры молекулярной массы (сверху вниз — фосфорилаза Б — 94 000, БСА — 67 000, овальбумин — 43 000, карбоангидраза — 30 000, трипсиновый ингибитор — 20 100, α -лактальбумин — 14 400)).

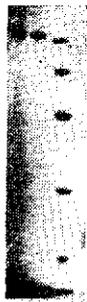


Рис. 1

Были изучены некоторые ферментативные свойства хлоропластной топоизомеразы, доказывающие ее прокариотическую природу. Известно, что основным отличием прокариотических топоизомераз I типа от эукариотических, является зависимость активности первых от ионов Mg^{2+} . Нами был проведен всесторонний анализ зависимости релаксирующей активности фермента от различных катионов одно- и двухвалентных металлов. На рис. 2 приведены данные по зависимости релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от присутствия $MgCl_2$ (мМ): 1 — 1; 2 — 3; 3 — 5; 4 — 10; 5 — 15; 6 — 20; 7 — 25; 8 — 40; 9 — 10 мМ ЭГТА + 10 мМ $MgCl_2$; 10 — контрольный препарат плазмиды *pUC19*. Релаксирующая активность хлДНК-топоизомеразы при отсутствии в буфере ионов Mg^{2+} не обнаруживалась. Это является веским аргументом в пользу прокариотической природы фермента. Релаксирующая активность фермента не выявлялась и при замене ионов Mg^{2+} на ионы Mn^{2+} или Ca^{2+} . Однако в работе [23] наблюдали 20 %-ную от оптимума релаксирующую активность в отсутствие ионов Mg^{2+} . Нам

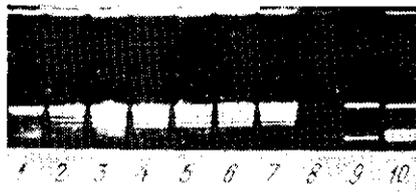


Рис. 2

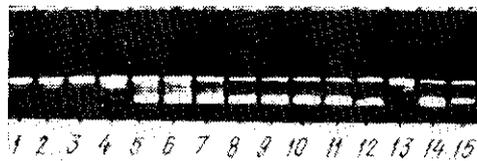


Рис. 3

кажется, что в этом случае авторам просто не удалось исключить весь Mg^{2+} из реакционной смеси из-за сильного связывания его молекулами фермента. Нами было обнаружено, что релаксирующая активность ДНК-топоизомеразы лучше проявляется при наличии в буфере релаксации ионов KCl, чем ионов NaCl. С другой стороны, ингибирующая концентрация активности ДНК-топоизомеразы для ионов NaCl составляла 100 мМ, а для ионов KCl — 120 мМ (рис. 3: зависимость релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от присутствия KCl (мМ): 1 — 10; 2 — 30; 3 — 50; 4 — 70; 5 — 90; 6 — 110; 7 — 120; 8 — 150; 9 — 170; 10 — 190; 11 — 210; 12 — контрольный препарат ДНК плазмиды *pBR322*; 13 — контрольная релаксация плазмидной ДНК топоизомеразой; 14 — релаксирующая активность в присутствии 10 мМ ЭДТА и 15 — 20 мМ ЭДТА; рис. 4: зависимость релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от одно- и двухвалентных катионов: 1 — 50, 100, 150 мМ NaCl; 2 — 50, 100, 150 мМ CsCl; 3 — 50, 100, 150 мМ RbCl; 4 — 50, 100, 150 мМ LiCl; 5 — 5, 10, 20 мМ $CaCl_2$; 6 — 5, 10, 20 мМ $MnCl_2$; 7 — релаксация плазмидной ДНК топоизомеразой в отсутствие ионов $MgCl_2$; 8 — контрольная релаксация плазмидной ДНК топоизомеразой; 9 — контрольная ДНК плазмиды *pUC19*). Фермент в интервале концентраций NaCl от 30 до 80 мМ действовал по процессивному механизму, с повышением ионной силы буфера — по дистрибутивному механизму (рис. 5: кинетика релаксации плазмидной ДНК хлДНК-топоизомеразой в буфере, содержащем 30 (а) и 80 (б) мМ NaCl: 1 — 0; 2 — 1; 3 — 3; 4 — 5; 5 — 10; 6 — 15; 7 — 30 мин; 8 — 1 ч). Изменение механизма дей-

ствия фермента при изменении концентрации соли в буфере релаксации указывает на то, что при взаимодействии фермент-ДНК важную роль играют ионные силы. Релаксирующая активность хлоропластной топоизомеразы наблюдалась при наличии в буфере релаксации ионов Cs^+ , Rb^+ , Li^+ (см. рис. 4). Их оптимальная концентрация составляла 50 мМ. При наличии в буфере релаксации ионов Mg^{2+} с концентрацией выше 25 мМ релаксирующая активность хлоропластной топоизомеразы ингибировалась (см. рис. 2). Оптимум концентрации ионов Mg^{2+} — 10–20 мМ. Определен интервал термоустойчивости фермента (рис. 6: кинетика релаксации плазмидной ДНК хлДНК-топоизомеразой при температуре буфера релаксации 40 °С: 1—0; 2—1; 3—2; 4—5; 5—10; 6—15; 7—20; 8—30; 9—40 мин). Релаксирующая активность топоизомеразы наблюдалась в течение 30 мин при 40 °С.

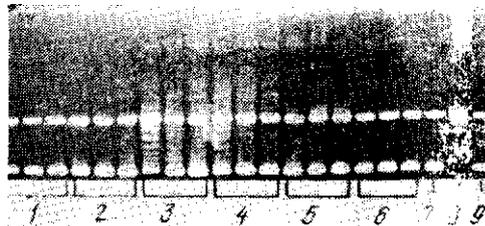


Рис. 4

ХлДНК-топоизомераза имела довольно широкий диапазон величины рН буфера, в котором проявлялась ее активность (рис. 7: зависимость релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от величины рН буфера релаксации: 1—рН 6,2; 2—6,8; 3—7,4; 4—8,0; 5—9,0;

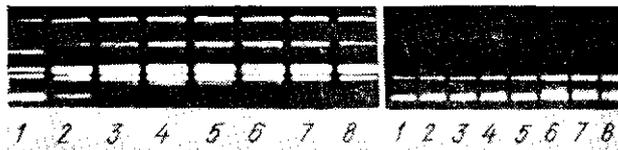


Рис. 5



Рис. 6

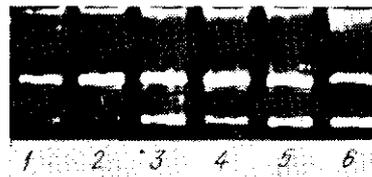


Рис. 7

6 — контрольный препарат плазмиды *pUC19*). Релаксирующую активность фермента выявляли в интервале рН буфера от 6,2 до 9,0.

Известно, что активность эукариотических топоизомераз в несколько раз стимулируется поликатионами (в частности, полиаминами: спермином, спермидином, кадаверином) [24]. Хлоропластная же топоизомераза оказалась нечувствительной к действию полиаминов спермидина и спермина (0,5–3 мМ), кадаверин (1–3 мМ) оказывал даже некоторое ингибирующее действие (рис. 8: зависимость релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от —SH-реагента N-этилмалеимида (I: I—0,5; II—1; III—2; IV—5 мМ) и полиаминов спермидина (2: I—0,5; II—1; III—3 мМ); спермина (3: I—0,5; II—1; III—3 мМ); кадаверина (4: I—0,5; II—1; III—3 мМ); 5 — контрольная релаксация плазмидной ДНК; 6 — контрольный препарат ДНК плазмиды *pUC19*).

Действие на активность хлоропластной топоизомеразы —SH-реагента N-этилмалеимида неоднозначно. В работе [23] отмечено ингибирование им (2 мМ) активности фермента. Мы же такого ингибирования не наблюдали в интервале концентраций N-этилмалеимида от 0,5 до 5 мМ (см. рис. 8). В этой связи можно отметить, что прокариотиче-

ская топоизомераза I типа из *Escherichia coli* также нечувствительна к действию N-этилмалеимида.

Хлоропластная топоизомераза оказалась неспособной релаксировать положительно суперспирализованную плазмидную ДНК. Активность ее ингибировалась бромистым этидием в интервале концентраций от 1 до 5 мкг/мл (рис. 9: зависимость релаксирующей активности хлДНК-топоизомеразы от бромистого этидия (I: I—1; II—2,5; III—5 мкг/мл); гепарина (2: I—1; II—2,5; III—5 мкг/мл); диаминодифенилиндола (3: I—5; II—10 мкМ ДАФИ); 4—контрольная релаксация плазмидной ДНК; 5—контрольный препарат плазмиды *pUC19*). В то же время ДАФИ (нейнтеркалирующий в ДНК антибиотик) слабо ингибировал релаксирующую активность топоизомеразы (см. рис. 9). Гепарин, который имеет свойство связываться с одноцепочечными участками в ДНК, ингибировал активность хлоропластной топоизомеразы в концентрации 5 мкг/мл (см. рис. 9).

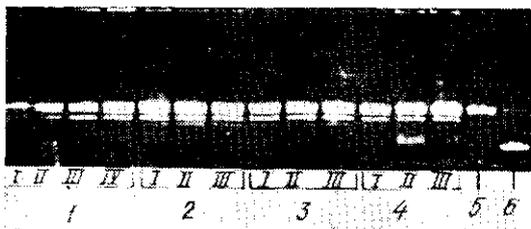


Рис. 8

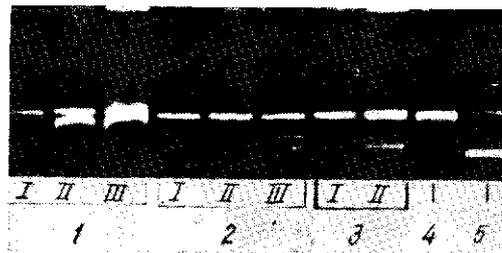


Рис. 9

Анализ продуктов реакции релаксации ДНК, полученных при действии хлДНК-топоизомеразы и ДНК-топоизомеразы I из эритроцитов цыпленка на

одном и том же геле, позволяет заключить, что хлоропластная топоизомераза изменяет порядок зацепления ДНК на величину, кратную единице (результат не приведен).

Таким образом, по изученным свойствам выделенная хлДНК-топоизомераза во многом аналогична прокариотическим топоизомеразам I типа.

Резюме

Із одержаних на ступінчатому градієнті ізоосмотичного перколу хлоропластів листя гороху виділена фракціонуванням у двофазній системі сульфат амонію/поліетиленгліколь-6000 с наступним очищенням хроматографією на колонках хлоропластна (хл) ДНК-топоізомераза. Залежність релаксуючої активності фермента від іонів Mg^{2+} , блокування її бромистим етидієм, відсутність стимуляції релаксуючої активності поліамінами: спермідіном, сперміном, кадаверіном, а також характер розподілу топоізомерів у гелі дозволяють визнати топоізомеразу як прокариотичну I типу. Досліджено дію різних кофакторів на релаксуючу активність фермента.

Summary

Chloroplasts of pea leaves were isolated by step gradient isoosmotic percoll, chloroplast DNA-topoisomerase was isolated from them by fractionation in two-phase system ammonium sulfate/polyethylenglycol-6000 with the following purification by using column chromatography. The some properties of DNA-topoisomerase was searched. The dependence of relax activity of the enzyme from Mg^{2+} ions, its blocking by ethidium bromide, the absence of relax activity stimulation by polyamines: spermidine, spermin, cadaverine and the character of distribution of the topoisomers in the gels allow us to characterise the topoisomerase as prokaryotic type I.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Botchan P., Wang J. C., Echols H. Effect of circularity and superhelicity on transcription from bacteriophage DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1973.—76, N 12.— P. 6110—6114.
2. Champoux J. J., Been M. D. Topoisomerases and the swivel problem // Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination.—New York: Acad. press, 1980.— P. 809—815.
3. Maxwell A., Gellert M. Mechanistic aspects of DNA topoisomerases // Adv. protein chem.—1985.—38.— P. 69—107.
4. Wang J. C. Type I DNA topoisomerases // Enzymes.—1981.—14, N 1.— P. 331—344.
5. Thrash C., Noelke K. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in DNA topoisomerase I activity // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 3.— P. 1375—1377.
6. Uemura T., Yanagida M. Isolation of type I and II DNA topoisomerase mutants from fission yeast; single and double mutants show different phenotypes in cell growth and chromatin organization // EMBO J.—1984.—3, N 2.— P. 1737—1744.
7. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase / G. G. Maul, B. T. Franch, W. J. van Venrooij et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 10.— P. 5145—5149.
8. Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication *in vitro* / L. Yang, M. S. Wold, J. J. Li et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 1.— P. 950—954.
9. McCoubrey W. K., Champoux J. J. The role of single-strand breaks in the catenation reaction catalyzed by the rat type I topoisomerase // J. Biol. Chem.—1986.—261, N 9.— P. 5130—5137.
10. Need for DNA topoisomerase activity as swivel for DNA replication and transcription of ribosomal RNA / S. J. Brill, S. di Nardo, K. Voekel-Meiman et al. // Nature.—1987.—326, N 6081.— P. 414—416.
11. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast / C. Holm, T. Goto, J. C. Wang, D. Botstein // Cell.—1985.—41, N 2.— P. 553—563.
12. Ross W. E. DNA topoisomerases as targets for cancer therapy // Biochem. Pharm.—1985.—34, N 15.— P. 4191—4195.
13. Characterization of a camptotecin resistant human DNA topoisomerase I / E. Kjeldsen, B. J. Bonven, T. Andoh et al. // J. Biol. Chem.—1988.—263, N 6.— P. 3912—3916.
14. Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cells nuclei / Y. Pommier, R. E. Schwartz, L. A. Zwelling et al. // Biochemistry.—1989.—24, N 20.— P. 6406—6410.
15. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II / K. M. Tewey, G. L. Chen, E. M. Nelson et al. // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 15.— P. 9182—9187.
16. Thompson R. J., Mosig G. ATP-dependent supercoiling topoisomerase of *Chlamydomonas reinhardtii* affects accumulation of specific chloroplast transcripts // Nucl. Acids Res.—1985.—13, N 3.— P. 873—891.
17. Purification and characterization of wheat germ DNA topoisomerase I (nicking-closing enzyme) / W. S. Dynan, J. J. Jendrisak, D. A. Hager et al. // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 11.— P. 5860—5865.
18. Fukata H., Ohgami K., Fukasawa H. Isolation and characterization of DNA topoisomerase II from cauliflower inflorescences // Plant Mol. Biol.—1986.—6, N 1.— P. 137—144.
19. Lam E., Chua N.-H. Chloroplast DNA gyrase and *in vitro* regulation of transcription by template topology and novobiocin // Ibid.—8, N 2.— P. 415—424.
20. Siedlecki J., Zimmermann W., Weissbach A. Characterization of a prokaryotic topoisomerase I activity in chloroplast extracts from spinach // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 5.— P. 1523—1537.
21. *In vitro* transcription of chloroplast protein genes / E. M. Orozco, J. E. Mullet, L. Hanley-Bowdin, N.-H. Chua // Meth. Enzymol.—1986.—118.— P. 232—240.
22. Montecucco A., Ciarrochi G. AMP-dependent DNA relaxation catalyzed by DNA ligase occurs by a nicking-closing mechanism // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 15.— P. 1369—1381.
23. Nielsen B., Tewari K. K. Pea chloroplast topoisomerase I: purification, characterization, and role in replication // Plant Mol. Biol.—1988.—11, N 1.— P. 3—12.
24. Карпенчук К. Г., Руденко Г. Н. Ядерная ДНК-топоизомераза зародышей кукурузы // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 2.— С. 77—82.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91