

## Взаимодействие белка *Flp* с участком рекомбинации: индуцированное фермент-субстратное соответствие

Ю. А. Возиянов\*, А. И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
252143 Киев, ул. Академика Заболотного, 150

*Сайт-специфическая рекомбиназа Flp, кодируемая 2 мкм плазмидой дрожжей Saccharomyces cerevisiae, участвует в амплификации числа копий названной плазмиды, инвертируя одну ее часть относительно другой в ходе репликации плазмиды. В работе рассмотрен сложный процесс связывания белка Flp с участком Flp-рекомбинации, который состоит из ряда последовательных стадий узнавания. Анализ первичной последовательности фрагмента ДНК в участке рекомбинации белка Flp, проведенный для выяснения предрасположенности участка к конформационным изменениям, вызываемым связыванием с ним белка Flp, показал случайность распределения в нем динуклеотидов, имеющих тенденцию к изгибанию ДНК в сторону малого желобка ДНК. Вероятно, фрагмент молекулы ДНК в участке рекомбинации является не «пассивным» субстратом для реакции рекомбинации, над которым белок Flp производит специфическое действие, а субстратом, способствующим оптимальному прохождению рекомбинационного процесса. Очевидно, именно последовательный процесс взаимоиндуцированного соответствия Flp-рекомбиназы и участка рекомбинации обеспечивает их эффективное и специфическое связывание.*

**Введение.** Кодируемая 2 мкм плазмидой дрожжей *S. cerevisiae* сайт-специфическая рекомбиназа *Flp* участвует в амплификации числа копий данной плазмиды и инвертирует одну ее часть относительно другой в ходе репликации плазмиды [1]. Белок *Flp* является типичным представителем интегрального семейства сайт-специфических рекомбиназ [2, 3], осуществляющих перестройки ДНК, направленные на интеграцию фаговых хромосом в бактериальную хромосому и эксцизию из нее (белки *Int* фагов лямбда, *P22*, *P4*), мономеризацию димерных (мультимерных) кольцевых молекул ДНК бактериальных хромосом, некоторых плазмид и фагов (белок *Cre* фага *P1*, белки *XerC* и *XerD* бактерий), инверсию одной части 2 мкм плазмид дрожжей относительно другой в ходе их репликации (белки *Flp*, *R*) [1, 4—6].

Начальным этапом рекомбинационного процесса, катализируемого белком *Flp*, является связывание белка с участком рекомбинации, в результате чего наблюдается сильное изгибание ДНК. Интенсивное изучение системы сайт-специфической *Flp*-рекомбинации в течение последних лет показывает, что процесс связывания белка *Flp* с участком рекомбинации представляет собой сложный процесс, состоящий из ряда последовательных стадий. Каким образом белок *Flp* находит участок рекомбинации? В чем состоят

\*Correspondence address.

особенности его структуры и взаимодействия с ДНК, позволяющие ему быстро найти участок рекомбинации и специфически с ним связаться? Отражает ли первичная структура участка *Flp*-рекомбинации его способность принимать необходимую для реакции рекомбинации конформацию?

В настоящей работе мы провели анализ данных о связывании белка *Flp* с участком рекомбинации, а также о распределении в участке *Flp*-рекомбинации динуклеотидов, имеющих тенденцию к изгибанию ДНК в сторону либо большого, либо малого желобков ДНК [7]. Результаты работы показывают, что в случае белка *Flp* основным процессом, обеспечивающим быстрое и специфическое связывание, является последовательный процесс взаимоиנדугированного соответствия фермента и субстрата.

**Поэтапное связывание белка *Flp* с ДНК.** Функция сайт-специфических рекомбиназ в клетках как прокариот, так и эукариот заключается в направленных изменениях генома [3, 8]. С теоретической точки зрения, к рекомбиназам должны предъявляться два взаимосвязанных требования: 1) рекомбиназа, как и любой другой ДНК-связывающий белок, не должна прочно связываться с несубстратными последовательностями ДНК. В противном случае, ввиду значительного избытка несубстратных последовательностей ДНК, она будет неспособна в разумное время найти субстратную последовательность; 2) рекомбиназы, как и эндонуклеазы рестрикции, должны свести до минимума вероятность осуществления своей функции, связываясь с последовательностями ДНК, отличными от последовательности — субстрата рекомбинации, поскольку неконтролируемые перестройки генома, скорее всего, приведут к негативным для клетки последствиям.

На примере *Flp*-рекомбиназы мы попытались проследить, каким образом реализуются эти требования. Хотя изучение белка *Flp* и комплексов белка с ДНК биофизическими методами не проводилось, однако обширные данные биохимических исследований позволяют достаточно подробно описать этапы постепенного связывания белка *Flp* со своим субстратом и косвенно предположить изменение конформаций белка на каждом из этапов связывания.

*Flp*-рекомбиназа существует в растворе в виде мономера и образует димер только после связывания с участком рекомбинации [9, 10]. Белок обладает существенным сродством к неспецифическим участкам ДНК (конкретная величина константы диссоциации, впрочем, не определена), и вполне естественно предположить, как это было сделано для *lac*-репрессора [11], что мономер белка осуществляет поиск *Flp*-связывающего элемента ДНК, непрочно связываясь на короткое время с различными участками ДНК. Анализ потенциальных ДНК-белковых контактов в *Flp*-связывающем элементе ДНК [12] позволил выделить группу контактов, являющихся наименее «критичными» в связывании белка с ДНК. Мы предполагаем, что именно они ответственны за первичный скрининг *Flp*-связывающих элементов ДНК, завершением которого является связывание мономера белка *Flp* с одним из *Flp*-связывающих элементов ДНК участка рекомбинации. Четкой структуры защиты белком *Flp* ДНК от разрезания ДНКазой I или от метилирования остатков гуанина и аденина диметилсульфатом (ДМС) при таком связывании, впрочем, не наблюдается [9]. Подобная структура защиты образуется только при связывании димера белка с элементами 1a и 1'a (рис. 1). Несмотря на отсутствие четкой структуры защиты (иными словами, слабости связывания), белок *Flp* связан с одним из *Flp*-связывающих элементов ДНК участка рекомбинации специфически [9, 10]. Это наблюдение представляется очень важным. Если в процессе поиска участка рекомбинации белок *Flp* обнаружит некую последовательность, точно соответствующую *Flp*-связывающему элементу ДНК, он прочно с ней не свяжется. Для прочного связывания необходимо, чтобы на строго определен-

ном расстоянии от слабосвязанного мономера белка в определенной ориентации к первому с ДНК связался второй мономер белка. Если связывания второго мономера не произойдет, поиск белком *Flp* участка рекомбинации продолжится. Благодаря такой особенности мономер белка *Flp*, слабо связавшийся с «половинным» участком рекомбинации, не будет исключен из рекомбинационного процесса.

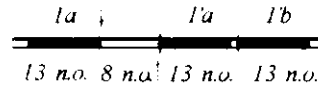


Рис. 1. Схематическое изображение участка *Flp*-рекомбинации. Показан «полный» участок рекомбинации, состоящий из трех *Flp*-связывающих элементов. Три элемента связывания обозначены, как  $1a$ ,  $1'a$  и  $1'b$ . *Flp*-связывающий элемент  $1'b$  отделен от элемента  $1'a$  1 п. о. Места разрезания фосфодиэфирных связей белком *Flp* обозначены вертикальными стрелками. Связываясь с природным участком рекомбинации, состоящим из трех *Flp*-связывающих элементов ДНК, белок *Flp* образует три ДНК-белковых комплекса, содержащих соответственно один (комплекс I), два (комплекс II) и три (комплекс III) мономера белка *Flp*. Полностью активным в реакции рекомбинации является комплекс II, содержащий димер белка *Flp*. Считается, что функция мономера белка, связывающегося с *Flp*-связывающим элементом ДНК  $1'b$ , состоит в облегчении связывания другого мономера белка с элементом  $1'a$  [9, 10]

Последовательно связавшись с инвертированными *Flp*-связывающими элементами ДНК участка рекомбинации, мономеры белка *Flp* образуют функциональный димер. В составе димера мономеры белка находятся в неидентичных конформациях [13], что является следствием характерного для *Flp*-рекомбиназы так называемого «разделенного» активного центра [14, 15]. Сущностью такого центра является то, что аминокислотные остатки одного из мономеров белка определенным образом активируют разрезаемую белком фосфодиэфирную связь, а разрезает эту связь аминокислота другого мономера белка. В каждый момент времени разрезанной оказывается только одна фосфодиэфирная связь, т. е. в комплексе участок рекомбинации — белок *Flp* образуется в каждый момент времени только один активный центр. Это гарантирует отсутствие двухцепочечных разрывов ДНК и последовательность обмена цепей ДНК, характерную для сайт-специфических рекомбиназ интегразного семейства [8, 16]. Первый мономер белка *Flp*, связывающийся с одним из *Flp*-связывающих элементов ДНК участка рекомбинации (рис. 1), вероятно, принимает такую конформацию, которая препятствует принятию вторым мономером белка, связывающимся со вторым *Flp*-связывающим элементом ДНК, аналогичной конформации, что обеспечивает организацию только одного активного центра белка в каждый момент времени. В участке рекомбинации один из *Flp*-связывающих элементов ( $1a$ , рис. 1) неоптимален для связывания белка *Flp*. Это приводит к тому, что мономер белка в первую очередь связывается с другим *Flp*-связывающим элементом (оптимальным,  $1'a$ ) участка рекомбинации [10] (в природном субстрате рекомбинации этому содействует, вероятно, также элемент  $1'b$ ). Скорее всего, преимущественная последовательность связывания белка *Flp* с участком рекомбинации способствует тому, что белком предпочтительнее разрезается фосфодиэфирная связь на стыке элемента  $1a$  и спейсерной последовательности ДНК [17]. Интересно, что для некоторых белков (например, для эндонуклеазы рестрикции *BamHI* [18]) также показано, что мономеры белка в составе димера при связывании с сайтами узнавания находятся в неидентичных конформациях. Однако неясно, отражает ли данный факт возможные функциональные особенности связывания белка с ДНК (или особенности собственно ферментативной реакции)

Образование функционального комплекса димера белка *Flp* и участка рекомбинации завершает процесс связывания белка с ДНК. Данные о связывании суммированы на рис. 2.

Изучение структуры белка *Flp* и функциональной роли его доменов позволяет предположить возможные пути динамических конформационных перестроек, индуцируемых связыванием с ДНК. Белок *Flp* содержит по крайней мере два ДНК-связывающих домена [20—22]. N-концевой домен белка (*IA/P13*, рис. 3) связывается с первыми четырьмя парами *Flp*-связы-

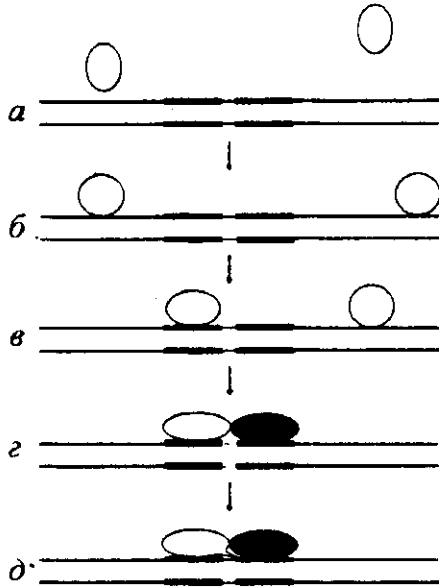
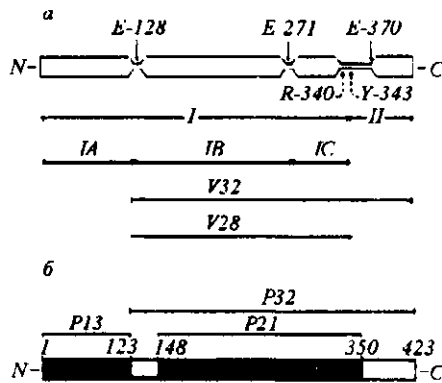


Рис. 2. Схематическое изображение поэтапного связывания белка *Flp* с участком рекомбинации. Белок существует в растворе в виде мономеров, осуществляющих поиск участка рекомбинации и связывающихся с ним поодиночке (а—в). Связавшись с участком рекомбинации, момеры белка *Flp* образуют димер, причем момеры белка находятся в разных конформациях (г), что обеспечивает организацию только одного активного центра белка в каждый момент времени и разрезание только одной цепи ДНК (д)

Рис. 3. Доменная организация белка *Flp*, по данным [20] (а) и [21] (б): а — схематическое изображение белка *Flp* (размер белка 423 аминокислотных остатка) с указанием мест гидролиза белка протеазой *V8* (сплошные линии) и трипсином (штриховые линии). Гидролиз белка *Flp* трипсином позволяет разделить белок на два пептида — *I* и *II*. В результате гидролиза протеазой *V8* образуются пептиды *IA*, *IB*, *IC*, *V32* и *V28*; б — схематическое изображение белка *Flp* с указанием мест гидролиза протеиназой *K* и образующихся при гидролизе пептидов *P13*, *P21* и *P32*



вающего элемента ДНК (расположенными возле спейсерной последовательности ДНК), а С-концевой домен (*V32/P32*, рис. 3), в котором расположены каталитические аминокислотные остатки белка *Flp*, — с остальными девятью парами [21]. Белок *Flp* разрезает ДНК на стыке *Flp*-связывающего элемента ДНК и спейсерной последовательности (см. рис. 1), однако изолированный С-концевой домен белка в месте разрезания с ДНК не связывается. Для связывания С-концевого домена белка *Flp* в месте разрезания необходимо, чтобы одновременно с ним в среде присутствовал N-концевой домен белка [21].

Очевидно, что в случае белка *Flp* мы имеем дело с модулированием связывания С-концевого домена белка, которое может осуществляться посредством конформационного изменения в N-концевом домене, распространяющегося на С-концевой домен белка. Модулирование связывания С-концевого домена, скорее всего, необходимо белку *Flp* для обеспечения минимальной вероятности разрезания несубстратной последовательности ДНК. Оно наблюдается в случае как одного *Flp*-связывающего элемента ДНК, так и двух инвертированных элементов, однако в последнем случае эффект модулирования выражен гораздо сильнее, что хорошо коррелирует с описанным выше фактом образования четкой структуры защиты участка рекомбинации от метилирования ДМС (и от разрезания ДНКазой I) только при связывании с ДНК димера белка.

Вероятно, в модулировании связывания значительную роль играют межмономерные взаимодействия двух молекул белка *Flp*, связанных с инвертированными *Flp*-связывающими элементами ДНК участка рекомбинации. N-концевой домен белка *Flp* вовлечен в межмономерные взаимодействия [20] и, вероятно, этот домен не только способен модулировать связывание С-концевого домена самостоятельно, но и усиливать (а, возможно, и изменять) свое действие в ответ на межмономерные взаимодействия. В передаче модулирующего сигнала от N-концевого домена белка могут участвовать аминокислотные остатки, взаимодействующие с центральной GC-парой, расположенной в 7-м положении *Flp*-связывающего элемента ДНК. Белок *Flp* имеет с этой парой по крайней мере два контакта: с N7-атомом гуанина (расположенным в большом желобке ДНК) и с NH<sub>2</sub>-группой гуанина (расположенной в малом желобке) [12]. Как было предположено в этой работе, взаимодействие аминокислотных остатков белка с этими группами гуанина носит кооперативный характер, облегчая связывание друг друга.

Можно предположить, что N-концевой домен белка при модулировании связывания активирует субдомен С-концевого домена белка, осуществляющий контакты в малом желобке в центре *Flp*-связывающего элемента ДНК, что в свою очередь активирует связывание субдомена, осуществляющего контакты в большом желобке ДНК. В конечном счете это приводит к связыванию С-концевого домена белка *Flp* с парами оснований, примыкающими к месту разрезания белком фосфодиэфирной связи.

По-видимому, в процессе связывания с участком рекомбинации белок *Flp* претерпевает ряд конформационных изменений, способствующих прочному и специфичному связыванию. Иными словами, определенные последовательности ДНК при связывании с белком индуцируют конформационные изменения в белке, способствующие как дальнейшему связыванию, так и прохождению собственно реакции рекомбинации. Индуцированные конформационные изменения белка *Flp*, очевидно, обратимы, и белок может продолжить поиск, если конформационные изменения не привели к дальнейшему упрочению связывания. Вполне очевидно также, что способность к этим динамическим изменениям заложена в структуре самого белка, эволюционировавшего в направлении оптимизации рекомбинационного процесса, включающего, естественно, и процесс связывания с субстратом. В свою очередь, связываясь с участком рекомбинации, белок *Flp* индуцирует в нем конформационные изменения [22]. Естественно возникает вопрос, заложена ли предрасположенность к конформационным изменениям в самом субстрате — участке рекомбинации? И если это так, то можно предположить, что в процессе поиска белком *Flp* участка рекомбинации белок узнает ее не только путем установления специфических ДНК-белковых контактов, но и по способности принимать необходимую конформацию при связывании с белком *Flp*.

Распределение «изгибообразующих» динуклеотидов в участке *Flp*-рекомбинации. Связывание белка *Flp* с участком рекомбинации приводит к сильному изгибу ДНК, причем угол изгиба составляет более 140 градусов и его центр расположен в центре спейсерной последовательности ДНК [22]. Индуцирование конформационных изменений ДНК в результате связывания с ней белков в целом является очень распространенным явлением [23], и система *Flp* в данном случае — не исключение.

Можно предположить, что первичная структура участка *Flp*-рекомбинации также эволюционировала в направлении оптимизации рекомбинационного процесса (как, вероятно, и структура самого белка *Flp*). Отражает ли структура участка рекомбинации его способность к изгибанию? Интересно, что белок *Flp* связывается с фосфатными группами ДНК с одной стороны двойной спирали [24], и нейтрализация отрицательных зарядов фосфатов только с одной стороны двойной спирали ДНК может в значительной степени облегчать ее изгибание.

Для выявления существенных особенностей первичной структуры участка *Flp*-рекомбинации мы провели сравнительный анализ распределения «изгибообразующих» динуклеотидов [7] в участке *Flp*-рекомбинации и в участках рекомбинации некоторых других рекомбиназ (рис. 4). Результаты представлены на рис. 5. Как видно, во всех участках рекомбинации можно выделить четыре симметрично расположенных блока по три нуклеотида (два динуклеотида с одним общим нуклеотидом), имеющих тенденцию к

			AT/GC	
GAAGTTCCTATAC	TTTCTAGA	GAATAGGAACTTC	65/35	FLP
TTGATGAAAGAA	TACGTTA	TTCTTTCATCAA	74/26	R1
TTTCATTAAGGAA	TAAGTAA	TTCCCTAATGAAA	69/31	B2
GGTTGCTTAAGAA	TAAGTAA	TTCTTAAGCAACC	67/33	B3
AAATGGAAAGGAA	TGGTTC A	TTCCTTTCCATTT	63/37	M1
ATTTGTCTGATAA	TGAAGCA	TTATCAGACAAAT	69/31	KD1
	CAGCTTT	TAAGTTG	65/35	Int
TAACCTCGTATAA	TGTATG	CTATACGAAGTTA	71/29	Cre
GATTGGTGCATAA	TGTATA	TTATGCTAAATCA	72/28	XerC/XerD

Рис. 4. Участки рекомбинации некоторых рекомбиназ интегразного семейства. Представлены участки рекомбинации рекомбиназ *Flp* (*S. cerevisiae*); *R* (*Zygosaccharomyces rouxii*); *B2* (*Z. bailii*), *B3* (*Z. rouxii*), *M1* (*Z. fermentati*); *KD1* (*Kluyveromyces drosophilorum*), *Int* (фаг лямбда), *Cre* (фаг P1) *XerC/XerD* (*Escherichia coli*) [4—7]. Показаны только верхние цепи. Инвертированно расположенные последовательности связывающих элементов отделены друг от друга спейсерной последовательностью (кором) из 6—8 п. о. Для каждого участка рекомбинации вычислено отношение AT/GC

изгибанию в сторону малого желобка ДНК. Явно выраженных блоков динуклеотидов, преимущественно изгибающихся в сторону большого желобка ДНК, не обнаружено. Следует отметить, что участок рекомбинации белка *Int* (в данном случае коровая последовательность attP [8]) не столь протяженный, как у других рекомбиназ интегразного семейства, и здесь невозможно выделить первый и четвертый блоки.

Первый и четвертый блоки расположены по наружным краям белок-связывающих элементов ДНК участков рекомбинации, а второй и третий — по внутренним. Спейсерная последовательность находится между вторым и

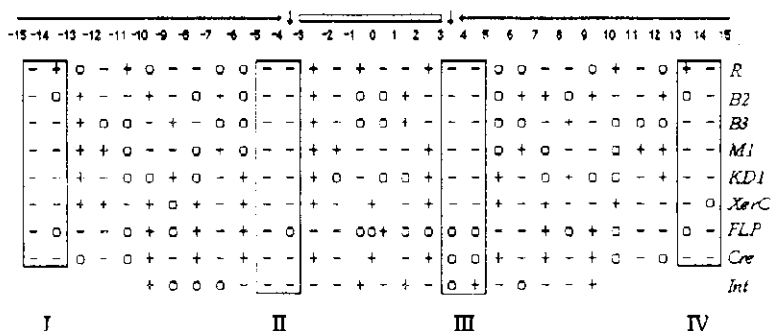


Рис. 5. Распределение «изгибообразующих» динуклеотидов в участках рекомбинации некоторых рекомбиназ интегразного семейства. Динуклеотиды, имеющие тенденцию к изгибанию в сторону большого желобка (ТА, СG, СА/ТG, GГ/СC), обозначены на рисунке символом «+», в сторону малого желобка (АТ, АА/ТТ, GТ/АC) — «-», остальные динуклеотиды, считающиеся нейтральными ввиду невыраженности тенденции обозначены символом «o». Символы расположены между соответствующими цифрами, обозначающими номер пары в участке рекомбинации. Блоки по три нуклеотида (два динуклеотида с одним общим нуклеотидом), имеющие тенденцию к изгибанию в сторону малого желобка ДНК, выделены прямоугольниками и пронумерованы от I до IV. Участки рекомбинации нормированы по размеру участка R-рекомбинации (31 п. о.). Поскольку спейсерные последовательности в разных участках рекомбинации различаются (6—8 п. о.), расположение символов в некоторых случаях нерегулярно

третьим блоками. Легко увидеть, что расстояние между первым и вторым (третьим и четвертым) блоками составляет 10 п. о. Если предположить, что структура ДНК в белок-связывающих элементах не слишком отличается от В-формы, то первый и второй блоки (третий и четвертый) будут расположены примерно на одной и той же стороне двойной спирали ДНК. В принципе, регулярное изгибание динуклеотидов, расположенных на одной стороне двойной спирали, в сторону одного из желобков ДНК может привести к глобальному изгибанию ДНК [25, 26]. На основании относительного расположения блоков очень привлекательным выглядит предположение о том, что блоки динуклеотидов, имеющие тенденцию к изгибанию в сторону малого желобка ДНК, отражают предрасположенность участка *Flp*-рекомбинации к изгибанию, индуцированному связыванием с рекомбиназой. Кроме того, наличие выраженных блоков «изгибообразующих» динуклеотидов в участках рекомбинации других рекомбиназ интегразного семейства может быть отражением определенного изгиба этих участков при связывании с рекомбиназами (вероятно, различного в случае различных рекомбиназ).

Как видно из рис. 5, внутри второго и третьего блоков (позиции -4/-3, и 3/4) расположены разрезаемые рекомбиназами фосфодиэфирные связи ДНК. Естественно возникает вопрос, отражает ли изгибание динуклеотида в месте разрезания ДНК в сторону малого желобка более благоприятную ситуацию для процесса разрезания, чем если бы этот изгиб был в сторону большого желобка или бы его не было вовсе? Мы предполагаем, что при изгибании в сторону малого желобка возникают напряжения в разрезаемой рекомбиназой фосфодиэфирной связи 5'-P, и усиление изгиба динуклеотида в сторону малого желобка при связывании белка с участком рекомбинации облегчает прохождение реакции разрезания ДНК и/или следующей за ней реакции переноса цепи ДНК на соответствующий сайт участка рекомбинации — партнера. Косвенным подтверждением этого является тот факт, что для белков *Int* и *Cre* показано упорядоченное разрезание участка рекомбинации — вначале связи в позиции -4/-3 и только после этого связи в позиции 3/4 [8], а участки рекомбинации белков *Int* и *Cre* в позициях

3/4 не характеризуются наличием динуклеотида, имеющего тенденцию к изгибанию в сторону малого желобка (рис. 5). Вероятно, «неоптимальный» динуклеотид в позиции 3/4 необходим для снижения вероятности разрезания рекомбиназами этой фосфодиэфирной связи первой (здесь необходимо отметить, что разрезание ДНК первого и второго раундов в одном цикле рекомбинации неэквивалентно, по крайней мере в случае *Int*-системы рекомбинации [27]), и оптимальные топологические условия для второго раунда разрезания на сегодняшний день неясны).

Для участка рекомбинации белка *Flp* в позициях -4/-3 и 3/4 характерна особая ситуация — в обеих позициях отсутствуют динуклеотиды, преимущественно изгибающие ДНК в сторону малого желобка (рис. 5). Мы можем предложить следующее объяснение этому феномену. С 5'- и 3'-сторон от динуклеотида в позиции -4/-3 находятся динуклеотиды, изгибающие ДНК в сторону малого желобка, и, возможно, они модулируют изгибание динуклеотида в позиции -4/-3 в сторону малого желобка. Динуклеотид в позиции 3/4 окружен с обеих сторон нейтральными динуклеотидами. Скорее всего, это может свидетельствовать о том, что в этой позиции динуклеотид не изогнут в сторону малого желобка, и условия разрезания ДНК отличаются от условий разрезания в позиции -4/-3. В пользу такого объяснения может свидетельствовать тот факт, что белок *Flp* разрезает ДНК в позиции -4/-3 эффективнее, чем в позиции 3/4 [17].

Следует отметить, что мы не можем однозначно отнести наши замечания о возможной роли изгибания динуклеотидов в позициях -4/-3 и 3/4 в сторону малого желобков только на счет разрезания рекомбиназой ДНК. Следующий этап рекомбинации — перенос цепи ДНК — необходимо также рассматривать как этап, протекание которого может облегчаться изгибанием динуклеотида в соответствующем положении в сторону малого желобка. В рекомбинационном процессе существует динамический баланс между реакциями разрезания ДНК и переноса цепи [28, 29]. В случае, если равновесие сдвинуто в сторону переноса цепи (или восстановления цепей ДНК по родительскому типу), отмечается уменьшение промежуточного продукта реакции разрезания — ковалентно связанного комплекса белок *Flp* — ДНК и наоборот. Иными словами, то, что может рассматриваться как ухудшение протекания реакции разрезания ДНК, на самом деле может означать улучшение протекания реакции переноса цепи. Не исключено, однако, и то, что протекание обоих процессов облегчено изгибанием. Ввиду очевидной сложности задачи дискриминации между описанными выше объяснениями роли изгибания в разрезании ДНК и переносе цепи ДНК (так как неизвестна структура переходных состояний этих этапов) вопрос о роли специфического изгибания в катализе начальных этапов рекомбинационного процесса остается открытым.

В целом, вышеизложенное позволяет нам сделать следующие выводы: 1) процесс связывания белка *Flp* с участком *Flp*-рекомбинации сопровождается последовательными конформационными изменениями как в белке, так и в ДНК. Связывание белка с несубстратными последовательностями ДНК не индуцирует этих изменений, что приводит лишь к слабым и неспецифическим контактам. На заключительных этапах для прочного связывания белка *Flp* с участком рекомбинации необходимы белок-белковые взаимодействия; 2) в участке рекомбинации, скорее всего, существует предрасположенность к изгибанию, вызываемому связыванием с белком *Flp* (и, возможно, к облегчению протекания первых каталитических этапов рекомбинационного процесса — разрезанию ДНК и/или переносу цепи ДНК), которая может свидетельствовать о том, что фрагмент ДНК в участке рекомбинации не является «пассивным» субстратом реакции рекомбинации, над которым белок производит специфическое действие, а субстратом, способствующим



проходженню рекомбинационного процесса. Очевидно, именно последовательный процесс взаимоиндуцированного соответствия *Flp*-рекомбиназы и участка рекомбинации обеспечивает их эффективное и специфическое связывание.

Ю. А. Возиянов, О. І. Корнелюк

Взаємодія білка *Flp* з ділянкою рекомбінації: індукована фермент-субстратна відповідність

Резюме

*Сайт-специфічна рекомбіназа Flp, яка кодується 2 мкм плазмідною з Saccharomyces cerevisiae, бере участь в ампліфікації числа копій згаданої плазміди, інвертуючи одну її частину відносно другої під час реплікації плазміди. В роботі розглянуто складний процес зв'язування білка Flp з ділянкою Flp-рекомбінації, який являє собою ряд послідовних стадій впізнання. Аналіз первинної послідовності фрагмента ДНК ділянки рекомбінації білка Flp, здійснений для з'ясування здатності цієї ділянки до згинання, яке виникає внаслідок зв'язування з нею білка Flp, показав не випадковість розподілу в ділянці динуклеотидів, що мають тенденцію до згинання ДНК у бік малого жолобка ДНК. Цілком імовірно, що фрагмент молекули ДНК у ділянці рекомбінації є не «пасивним» субстратом для реакції рекомбінації, а субстратом, що сприяє оптимальному проходженню рекомбінаційного процесу. Очевидно, саме послідовний процес взаємоіндукованої відповідності Flp-рекомбінази та ділянки рекомбінації забезпечує їх ефективне і специфічне зв'язування.*

У. А. Voznyanov, A. I. Kornelyuk

Interaction of *Flp* protein with its recombination site: substrate-enzyme molecular adjustment

Summary

*Site-specific recombinase Flp encoded by 2 micron plasmid from Saccharomyces cerevisiae participates in amplification of copy number of 2 micron plasmid by inverting two parts of the plasmid relative to each other. In the paper a complex process of binding of Flp protein to its recombination site, which appears to be a series of consequent steps of recognition, is considered. An analysis of the primary structure of the Flp recombination site has been made in order to figure out whether there is a predisposition of the recombination site to the conformational changes upon the Flp protein binding. The analysis has revealed that the distribution of the dinucleotides that have a tendency to bend DNA either toward minor groove of DNA is not random. It has been suggested that a fragment of DNA molecule at the site of recombination is not a «passive» substrate for the recombination reaction, but a substrate that favours the protein to carry out recombination reaction in an optimal way. Apparently, it is a multistep process of substrate-enzyme adjustment of the Flp protein and the recombination site that ensures their effective and specific binding.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Broach J. R., Volkert F. C. Circular plasmids in yeasts // The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics. — New York: Cold Spring Harbor Lab., 1991. — P. 291—331.
2. Argos P., Landy A., Abremski K. et al. The integrase family of site-specific recombinases: local similarities and global diversity // EMBO J.—1986.—5, N 2.—P. 433—440.
3. Sadowski P. D. Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops // FASEB J.—1993.—7, N 6.—P. 760—767.
4. Utatsu J., Sakamoto S., Imura T., Toh-E. A. Yeast plasmid resembling 2 micron DNA: Regional similarities and diversity at molecular level // J. Bacteriol.—1987.—169, N 12—P. 5537—5545.
5. Blakely G., May G., McCulloch R. et al. Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12 // Cell.—1993.—75, N 2.—P. 351—361.
6. Hoess R., Abremski K., Sternberg N. The nature of interaction of the *P1* recombinase *Cre* with the recombination site *loxP* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1984.—49.—P. 761—768.
7. Barber A. M., Zhurkin V. B. CAP binding sites reveal pyrimidine-purine pattern characteristic of DNA binding // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1990.—8, N 2.—P. 213—232.
8. Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination // Annu. Rev. Biochem.—1989.—58.—P. 913—949.
9. Andrews B. J., Beatty L. G., Sadowski P. D. Isolation of intermediates in the binding of the *FLP* recombinase of the yeast plasmid 2-micron circle to its target sequence // J. Mol.

- Biol.—1987.—193, N 2.—P. 345—358.
10. Beatty L. G., Sadowski P. D. The mechanism of loading of *FLP* recombinase onto its DNA target sequence // *Ibid.*—1988.—204, N 2.—P. 283—294.
  11. Berg O. G., Winter R. B., von Hippel P. H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory // *Biochemistry.*—1981.—20, N 24.—P. 6929—6948.
  12. Возиянов Ю. А. Возможная роль индивидуальных ДНК-белковых контактов сайт-специфической рекомбиназы *Flp* из *S.cerevisiae* с азотистыми основаниями *Flp*-связывающего элемента ДНК // *Биополимеры и клетка.*—1996.—12, N 1.—С. 89—94.
  13. Qian X.-H., Inman R. B., Cox M. M. Protein-based asymmetry and protein-protein interactions in *Flp* recombinase-mediated site-specific recombination // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 35.—P. 21779—21788.
  14. Chen J. W., Lee J., Jayaram M. DNA cleavage in trans by the active site tyrosine during *Flp* recombination: Switching protein partners before exchanging strands // *Cell.*—1992.—69, N 4.—P. 627—658.
  15. Lee J., Whang I., Lee J., Jayaram M. Directed protein replacement in recombination full sites reveals trans-horizontal DNA cleavage by *Flp* recombinase // *EMBO J.*—1994.—13, N 22.—P. 5346—5354.
  16. Jayaram M. Mechanism of site-specific recombination: the *Flp* paradigm // *Nucl. Acids and Mol. Biol.*—1994.—8.—P. 268—285.
  17. Lee J., Jayaram M. Mechanism of site-specific recombination: logic of assembling recombinase catalytic site from fractional active sites // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 23.—P. 17564—17579.
  18. Newman M., Strzeleska T., Dorner L. F. et al. Structure of *BamHI* endonuclease bound to DNA: partial folding and unfolding on DNA binding // *Science.*—1995.—269, N 5224.—P. 656—663.
  19. Chen J. W., Evans B. R., Yang S.-H. et al. Domain of yeast site-specific recombinase (*Flp*) that recognizes its target site // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88, N 14.—P. 5944—5948.
  20. Pan G., Sadowski P. D. Identification of the functional domains of the *FLP*-recombinase: Separation of the nonspecific and specific DNA-binding, cleavage, and ligation domains // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 30.—P. 22546—22551.
  21. Panigrahi G. B., Sadowski P. D. Interaction of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal domains of the *FLP* recombinase with the *FLP* recognition target sequence // *Ibid.*—1994.—269, N 14.—P. 10940—10945.
  22. Schwarts C. J. E., Sadowski P. D. *FLP* protein of the 2 micron circle plasmid of yeasts induces multiple bends in *Flp* recognition target site its DNA // *J. Mol. Biol.*—1990.—216, N 2.—P. 289—298.
  23. Travers A. A. DNA conformation and protein binding // *Annu. Rev. Biochem.*—1989.—58.—P. 427—452.
  24. Bruckner R. C., Cox M. M. Specific contacts between the *Flp* protein of the yeast 2-micron plasmid and its recombination site // *J. Mol. Chem.*—1986.—261, N 20.—P. 11798—11807.
  25. Ulanovsky L. E., Trifonov E. N. Estimation of wedge components in curved DNA // *Nature.*—1987.—326, N 6114.—P. 720—722.
  26. Satchwell S. C., Drew H. R., Travers A. A. Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA // *J. Mol. Biol.*—1986.—191, N 4.—P. 659—675.
  27. Nunes-Duby S. N., Tirumalai R. S., Dorgai L. et al. Lambda integrase cleaves DNA in *cis* // *EMBO J.*—1994.—13, N 18.—P. 4421—4430.
  28. Lee J., Jayaram M. Role of partner homology in DNA recombination: complementary base pairing orients the 5'-hydroxyl for strand joining during *Flp* site-specific recombination // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 8.—P. 4042—4052.
  29. Voziyanov Y., Lee J., Whang I. et al. Analyses of the chemical step in *Flp* site-specific recombination: Synapsis may not be a pre-requisite for strand cleavage // *J. Mol. Biol.*—1996.—256, N 4.—P. 720—735.