

Возможная роль индивидуальных ДНК-белковых контактов сайт-специфической рекомбиназы *Flp* из *Saccharomyces cerevisiae* с азотистыми основаниями *Flp*-связывающего элемента ДНК

Ю. А. Возиянов

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

Сайт-специфическая рекомбиназа Flp, кодируемая 2-мкм плазмидой из S. cerevisiae, имеет множественные точечные контакты с основаниями Flp-связывающего элемента ДНК. В настоящей работе проведен анализ относительного вклада контактов в прочность связывания белка Flp с ДНК и особенностей их распределения в большом и малом желобке ДНК. Контакты белка Flp с Flp-связывающим элементом ДНК были подразделены на три группы в зависимости от их вклада в прочность связывания белка с ДНК. Предполагается, что белок Flp использует контакты третьей группы, которая вносит наименьший вклад в прочность связывания, наряду с контактами в малом желобке ДНК для первичной дискриминации между различными последовательностями ДНК. Показано, что белок Flp имеет контакты с Flp-связывающим элементом ДНК в малом желобке с противоположных сторон двойной спирали ДНК, и, вероятно, белок Flp оплетает ДНК.

Белок *Flp* является одним из компонентов сайт-специфической рекомбинационной системы 2-мкм плазмиды из *S. cerevisiae*. Эта рекомбинационная система вовлечена в процесс поддержания стабильного числа копий 2-мкм плазмиды в клетке дрожжей, инвертируя один участок плазмиды относительно другого по «flip-flop»-механизму [1, 2]. Система включает также два рекомбинационных сайта (рис. 1), названных *FRT* (*Flp* Recognition Target, мишень *Flp* рекомбинации), с которыми белок *Flp* связывается специфически [3, 4].

Изучение контактов белка *Flp* с *FRT* необходимо для понимания процесса связывания сайт-специфических рекомбиназ с ДНК и стимулируется тем, что указанный белок, вероятно, имеет по крайней мере два ДНК-связывающих домена [5]. Причем, как показали компьютерные исследования, белок *Flp*, как и все рекомбиназы интегразного семейства (Int-семейства) сайт-специфических рекомбиназ [6], не имеет гомологии ни с одним из известных ДНК-связывающих мотивов (J. Lee, A. Dwyer, Ю. Возиянов, неопубликованные данные; [7]).

ДНК-белковые контакты рекомбиназы *Flp* с *FRT* интенсивно изучались с использованием разнообразных химических зондов [8—10] и аналогов оснований [11]. Кроме того, в работе [12] количественно оценен эффект замены каждой пары оснований в связывающем элементе на три другие. Накопленные к настоящему времени данные о распределении контактов в большом и малом желобках ДНК и их относительном вкладе в прочность

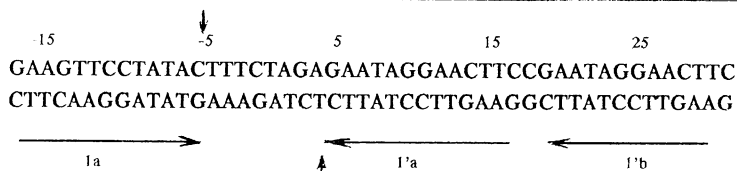


Рис. 1. Участок рекомбинации белка *Flp*. Участок рекомбинации состоит из трех *Flp*-связывающих элементов размером 12 п. о. (пар оснований) каждый. Три элемента связывания обозначены, как 1a, 1'a и 1'b, и выделены горизонтальными стрелками. Два связывающих элемента, 1a и 1'a, расположены инвертированно друг к другу и разделены спейсером (участком обмена цепей) — последовательностью ДНК размером 8 п. о. Третий *Flp*-связывающий элемент, 1'b, расположен в той же ориентации, что и 1'a, и отделен от него 2 п. о. Места разрезания фосфодиэфирных связей белком *Flp* обозначены вертикальными стрелками. Полярность верхней цепи — от 5' к 3' слева направо

связывания белка с ДНК позволяют провести анализ для выяснения возможной роли отдельных контактов. Такому анализу и посвящена настоящая работа.

Ранее [8—11] показано, что белок *Flp* специфически связывается с ДНК путем установления множественных точечных контактов (являющихся по своей природе, вероятно, водородными связями) как в большом, так и в малом желобках ДНК. На рис. 2 показано распределение контактов белка *Flp* с основаниями его связывающего элемента. Хотя в среднем отсутствие этих контактов оказывает незначительное влияние на прочность связывания белка *Flp* с ДНК [11], однако анализ показывает их явную неравноценность. Для проведения анализа целесообразно разделить контакты на три группы по величине относительного вклада в прочность связывания (таблица). Первую группу контактов со стороны ДНК образуют следующие атомы: N₇-атом гуанина G·C пары в положении 1, (т. е. N₇-G1), а также O₄-T2, N₄-A4 и N₂H-G7 (см. рис. 2). Отсутствие какого-либо контакта первой группы уменьшает прочность связывания белка *Flp* с *Flp*-связывающим элементом примерно в 10 раз. При отсутствии в *Flp*-свя-

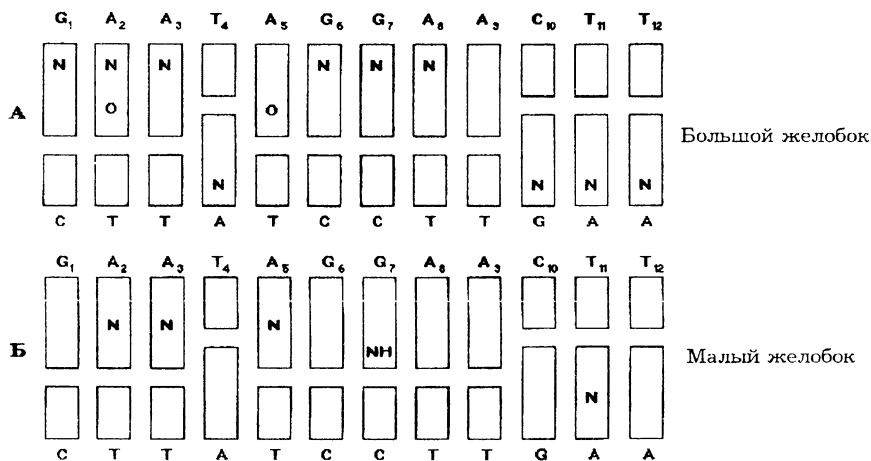


Рис. 2. Распределение контактов белка *Flp* с основаниями *Flp*-связывающего элемента 1'a в большом (А) и малом (Б) желобках ДНК. Показаны контактирующие с белком *Flp* атомы оснований *Flp*-связывающего элемента ДНК. Последовательность связывающего элемента (см. рис. 1) изображена в виде прямоугольников неравного размера и пронумерована слева направо в направлении от 5' к 3'. Символом «N» обозначены N₇- и N₃- атомы аденина и гуанина; символом «NH» — N₂H-группа гуанина; символом «O» — O₄-атомы тимина. Данные о контактах взяты из работ [8, 11]

звующем элементе контакта второй группы прочность связывания падает примерно в 2 раза. Во вторую группу входят атомы O₄-T5, N₇-G7, N₇-A8,

Три группы контактов *Flp*-рекомбиназы с *Flp*-связывающим элементом ДНК

Группа		
1-я	2-я	3-я
N ₂ H-G7 (20)	N ₇ -G7 (2,6)	N ₇ -A3 (1,5)
N ₇ -G1 (7,1)	N ₇ -A8 (2,4)	N ₇ -A2 (1,3)
N ₇ -A4 (6,7)	N ₇ -G10 (2,2)	N ₇ -G6 (1,3)
O ₄ -T2 (5,0)	O ₄ -T5 (2,0)	N ₇ -A11 (1,3)
	N ₇ -A12 (2,0)	

Примечание. В скобках указано, во сколько раз уменьшается прочность связывания белка *Flp* с ДНК при отсутствии соответствующего контакта. Данные об относительном вкладе контактов в прочность связывания взяты из работы [11].

N₇-G10 и N₇-A12. Наконец, к третьей группе отнесены атомы N₇-A2, N₇-A3, N₇-G6 и N₇-A11. Отсутствие атомов, образующих контакты 3-й группы, приводит лишь к незначительному снижению прочности связывания белка *Flp* с ДНК.

Вероятно, именно контакты 1-й группы ответственны за специфичность связывания белка *Flp* с ДНК. Интересно, что контакты этой группы в основном распределены в первой половине *Flp*-связывающего элемента ДНК. Это наблюдение хорошо согласуется с данными работы [12] о том, что замены оснований в первых позициях *Flp*-связывающего элемента ведут к резкому уменьшению прочности связывания белка *Flp* с ДНК. Вполне очевидно, что первая половина *Flp*-связывающего элемента ДНК играет особую роль в связывании белка *Flp* с *FRT*. В первой половине связывающего элемента (между 4-й и 5-й парами оснований, см. рис. 1) находится разрезаемая белком *Flp* фосфодиэфирная связь. Для разрезания именно этой связи необходимо обеспечить достаточно прочное специфическое связывание белка в первой половине связывающего элемента ДНК. Следует отметить, что стабилизации белка *Flp* на ДНК способствуют также белок-белковые взаимодействия между двумя мономерами белка *Flp*, связанными с *FRT* и расположенными голова к голове [13] (рис. 1), т. е. мономер белка *Flp*, специфически связавшийся с одним из *Flp*-связывающих элементов ДНК, помогает связаться другому мономеру белка *Flp* с другим *Flp*-связывающим элементом.

Интересно, что один из контактов первой группы, N₂H-G7, расположен в малом желобке ДНК (пара G·C; 7-я позиция *Flp*-связывающего элемента ДНК, см. рис. 1 и таблицу), причем, возможно, что это один из наиболее критичных контактов белка *Flp* с ДНК [11, 12]. Его отсутствие в *Flp*-связывающем элементе ДНК ведет к 20-кратному снижению прочности связывания белка с ДНК. Контакт белка с NH₂-группой гуанина в малом желобке ДНК теоретически может выступать в роли хорошего дискриминационного контакта, поскольку его отсутствие вследствие замены пары G·C на пару A·T или T·A не компенсируется равнозначным контактом с другими функциональными группами оснований в малом желобке [12, 14—16].

Из факта существования контакта N₂H-G7 вытекают интересные выводы. Данные по футпринтингу с использованием гидроксил-радикала [10] и нитрозоэтилмочевины [8] показали, что белок *Flp* после взаимодействия со своим связывающим элементом располагается на одной стороне двойной спирали ДНК. Если предположить, что *Flp*-связывающий элемент ДНК находится в В-форме, то из наличия контакта N₂H-G7 следует, что белок *Flp* имеет контакты с ДНК с противоположных сторон ДНК, т. е. белок при

связывании с узнаваемой последовательностью ДНК как бы оплетает ее.

Кроме контакта с NH_2 -группой гуанина (являющейся донором водородной связи) $\text{G}\cdot\text{C}$ пары в 7-й позиции *Flp*-связывающего элемента ДНК в малом желобке, белок *Flp* имеет контакт с N_7 -атомом гуанина (см. рис. 2) (являющимся акцептором водородной связи) в большом желобке ДНК. Известно, что при установлении водородной связи происходит перераспределение электронной плотности на доноре и акцепторе водородной связи [17]. Так, акцептор несколько «оттягивает» на себя электронную плотность в направлении к атому водорода, в то время как донор несколько оттягивает ее на себя в направлении от атома водорода. Если донор и акцептор водородной связи расположены на одной и той же молекуле и они оба используются системой белок — ДНК для контактов, то образование водородной связи одним из них (например акцептором) помогает образованию водородной связи другим (донором), т. е. донор и акцептор действуют кооперативно. Вероятно, такая ситуация реализуется в случае контактов белка *Flp* с парой $\text{G}\cdot\text{C}$ в 7-й позиции *Flp*-связывающего элемента ДНК, и связывание белка с N_7 -атомом гуанина (акцептором водородной связи) облегчает таковое с NH_2 -группой гуанина (донором).

Возможно, что роль контакта $\text{N}_2\text{H-G7}$ состоит не только в обеспечении специфичности связывания белка *Flp* с ДНК, но и в жесткой фиксации некоего домена белка *Flp* со стороны ДНК, противоположной той, где находится разрезаемая белком *Flp* фосфодиэфирная связь (рис. 1). Таким доменом может быть домен, содержащий аминокислотные остатки, вступающие в межмономерные белок-белковые связи, ответственные за изгиб *FRT* [18]. Это предположение основывается на том факте, что среди изучаемых сайт-специфических рекомбинационных систем *Int*-семейства только в *Flp*-системе показаны изгиб ДНК в участке обмена цепей [14] и контакты рекомбиназы с противоположных сторон цепи ДНК [11, 19]. При этом возможно и другое объяснение роли контакта $\text{N}_2\text{H-G7}$. Не исключено, что белку *Flp* очень важно иметь с парой в 7-м положении эффективный контакт для повышения специфичности связывания, однако белок осуществляет его в малом желобке ДНК, так как фрагменту белка, взаимодействующему с 7-й парой оснований (а также с близлежащими парами) *Flp*-связывающего элемента ДНК в большом желобке, необходима определенная подвижность.

Отличительной особенностью белка *Flp* являются его контакты с ДНК как в большом, так и в малом желобке (рис. 2). Вероятно, именно контакты белка в большом желобке в основном ответственны за сайт-специфичность его связывания с ДНК [14]. Однако по крайней мере один контакт 1-й группы белка *Flp* с ДНК в малом желобке, т. е. $\text{N}_2\text{H-G7}$, может вносить существенный вклад в специфичность связывания (см. выше) [11, 13]. Роль остальных идентифицированных к настоящему времени контактов в малом желобке (с N_3 -атомами аденина) остается неясной. Как видно из рис. 2, белок *Flp* имеет контакты с N_3 -атомами аденина в позициях 2, 3, 5 и 11 узнаваемой им последовательности ДНК. Следует отметить, что с каждой из пар оснований в этих положениях белок *Flp* имеет также контакты в большом желобке. Если предположить, что связывающий элемент ДНК находится в В-форме, то оказывается, что все эти контакты расположены примерно на одной и той же стороне спирали ДНК. Причем на той же стороне, что и идентифицированные контакты белка *Flp* с фосфатными группами ДНК. Одним из объяснений данного факта может быть то, что контакты с N_3 -атомами аденина не являются дискриминационными, и белок *Flp* использует их для правильной ориентации на ДНК. Однако возможно и другое объяснение. Известно, что некоторые белки (например, *Integration Host Factor*, IHF [20]) специфически связываются с ДНК, имея контакты в

основном в малом желобке ДНК, причем с парами А·Т. Хотя положение акцепторов водородных связей в малом желобке ДНК (N_3 -атомов пуринов и O_2 -атомов пиримидинов) для пар А·Т близко к таковому для пар G·C [14], однако оно неидентично, и белок мог бы использовать эти небольшие различия для дискриминации между парами А·Т и G·C с помощью аминокислот — доноров водородной связи. Не исключено также, что белок *Flp* осуществляет связывание с ДНК в несколько этапов. В этом случае белок в первую очередь мог бы использовать для связывания слабые дискриминационные контакты 3-й и 2-й групп, в том числе и с N_3 -атомами аденина. Если последовательность ДНК не является оптимальной, слабость контактов обеспечивала бы быструю диссоциацию комплекса белок — ДНК. Если же последовательность ДНК окажется оптимальной, соответствующие конформационные перестройки в белке могли бы способствовать установлению сильных контактов для обеспечения прочного специфического связывания.

Результаты анализа данных о ДНК-белковых контактах рекомбиназы *Flp* с *FRT* согласуются с точкой зрения на процесс специфического связывания белка *Flp* с ДНК как на процесс установления последовательных серий слабых контактов с индивидуальными парами оснований ДНК [10, 11]. Такой способ связывания, при котором практически все пары оснований участвуют в установлении слабых контактов с белком, может быть общей особенностью узнавания белками протяженных участков ДНК или РНК [21]. Как показано в настоящей работе, для сайт-специфических ДНК-связывающих ферментов выделение групп контактов, вносящих различный относительный вклад в прочность и специфичность связывания белка с определенной последовательностью ДНК, позволяет также предположить, какие именно контакты и на каких этапах могли бы участвовать в установлении специфического связывания с ДНК.

Автор благодарен А. И. Корнелюку и Д. М. Говоруну за критические замечания, высказанные при обсуждении работы.

Ю. А. Возіанов

Можлива роль індивідуальних ДНК-білкових контактів сайт-специфічної рекомбінази *Flp* з *Saccharomyces cerevisiae* з азотистими основами *Flp*-зв'язуючого елемента ДНК

Резюме

Сайт-специфічна рекомбіназа *Flp*, яка кодується 2-мкм плазмідом із *S. cerevisiae*, має множинні контакти з основами *Flp*-зв'язуючого елемента ДНК. В роботі здійснено аналіз відносного внеску контактів у міцність зв'язування білка *Flp* з ДНК та особливостей їх розподілу у великому та малому жолобках ДНК. Контакти білка *Flp* з *Flp*-зв'язуючим елементом ДНК було підрозділено на три групи в залежності від їх внеску в міцність зв'язування білка з ДНК. Припускається, що білок *Flp* використовує контакти третьої групи (котрі вносять найменший внесок у міцність зв'язування) поряд з контактами в малому жолобку ДНК для первинної дискримінації між різними послідовностями ДНК. Показано, що білок *Flp* має контакти з *Flp*-зв'язуючим елементом ДНК в малому жолобку з протилежних сторін подвійної спіралі ДНК і цілком імовірно, що білок *Flp* облітає ДНК.

Y. A. Vozıyanov

Possible role of individual protein-DNA contacts of *Flp* site-specific recombinase from *Saccharomyces cerevisiae* with nucleic bases of *Flp*-binding element of DNA

Summary

Site-specific recombinase *Flp* encoded by 2 micron plasmid from *S. cerevisiae* has multiple contacts with nucleic bases of *Flp*-binding element of DNA. We present an analysis of relative contribution of these

contacts to strength of *Flp*-protein binding to DNA, and of the peculiarities of their distribution at major and minor grooves of DNA. The contacts of *Flp*-protein with *Flp*-binding element of DNA have been divided into three groups depending on their contribution in strength of *Flp*-protein binding to DNA. It has been suggested that *Flp*-protein uses the third group of contacts (they make the least contribution to strength of *Flp*-protein binding to DNA) along with minor groove contacts for initial discrimination between different DNA sequences. It has been shown that *Flp*-protein has contacts with nucleic bases in minor groove at opposite sides of DNA, so *Flp*-protein probably wraps DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fletcher A. B.* Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Theor. Biol.*—1986.—**119**, N 2.—P. 197—204.
2. *Volkert F. C., Broach J. R.* Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast // *Cell.*—1986.—**46**, N 4.—P. 541—550.
3. *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: CSH Laboratory, 1991.—P. 291—331.
4. *Sadowski P. D.* Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops // *FASEB J.*—1993.—**7**, N 6.—P. 760—767.
5. *Panigrahi G. B., Sadowski P. D.* Interaction of the NH₂- and COOH- terminal domains of the *FLP* recombinase with the *FLP* recognition target sequence // *J. Biol. Chem.*—1994.—**269**, N 14.—P. 10940—10945.
6. *Argos P., Landy A., Abremski K. et al.* The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity // *EMBO J.*—1986.—**5**, N 2.—P. 433—440.
7. *Freemont P. S., Lane A. N., Sanderson M. R.* Structural aspects of protein-DNA recognition // *Biochem. J.*—1991.—**278**, N 1.—P. 1—23.
8. *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.
9. *Panigrahi G. B., Beatty L. G., Sadowski P. D.* The *Flp* protein contacts both major and minor grooves of its recognition target sequence // *Nucl. Acids Res.* — 1992. — **20**, N 22.—P. 5927—5935.
10. *Kimball A. S., Kimball M. L., Jayaram M., Tullius T. D.* Chemical probe and missing nucleoside analysis of *Flp* recombinase bound to the recombination target sequence // *Ibid.*—1996 (in press).
11. *Saxena P., Whang I., Vozizyanov Y. et al.* DNA recognition by the *Flp* site-specific recombinase: Probing with *Flp* protein variants and non-canonical DNA target sites // *J. Mol. Biol.* (submitted).
12. *Senecoff J. F. P., Rossmeyssl P. J., Cox M. M.* DNA recognition by *FLP* recombinase of the yeast 2 micron plasmid: a mutational analysis of the *FLP* binding site // *J. Mol. Biol.*—1988.—**201**, N 2.—P. 405—421.
13. *Parsons R. L., Evans B. R., Zheng L., Jayaram M.* Functional analysis of Arg-308 mutants of *Flp* recombinase // *J. Biol. Chem.*—1990.—**265**, N 8.—P. 4527—4533.
14. *Seeman N. C., Rosenberg J. M., Rich A.* Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1976.—**73**, N 3.—P. 804—808.
15. *Kolomiets I. N., Kondratyuk I. V., Stepanyugin A. V. et al.* Influence of methylation on nucleic acid purine bases on their interactions with amino acids through the carboxylic group // *J. Mol. Struct.*—1991.—**250**—P. 1—11.
16. *Zheltoovsky N. V., Samoilenko S. A., Kondratyuk I. V. et al.* Recognition of purine bases and nucleosides by the amino acid carboxylic group // *Ibid.*—1995.—**344**—P. 53—62.
17. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. Пер. с англ.— М.: Мир, 1987.—584 с.
18. *Schwartz C. J. E., Sadowski P. D.* *FLP* recombinase of the 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* bends its DNA target: Isolation of *FLP* mutants defective in DNA bending // *J. Mol. Biol.*—1989.—**205**, N 4.—P. 647—658.
19. *Ross W., Landy A.* Patterns of phage lambda Int recognition in the regions of strand exchange // *Cell.*—1983.—**33**, N 2.—P. 261—272.
20. *Craig N., Nash H. E.* *coli* integration host factor binds to specific sites in DNA // *Ibid.*—1984.—**39**, N 5.—P. 707—716.
21. *Невинский Г. А.* Важная роль слабых взаимодействий при узнавании ферментами протяженных молекул ДНК и РНК // *Молекуляр. биология.* — 1995. — **29**, № 1.—С. 16—37.