

10/10/96  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

---

На правах рукопису

УДК 577.151.02

577.151.36

577.151.45

ВОЗІЯНОВ Юрій Анатолійович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО КОМПЛЕКСУ  
САЙТ-СПЕЦИФІЧНОЇ РЕКОМБІНАЗИ FLP  
З ДРІЖДЖІВ S.CEREVISIAE

(03.00.03 - молекулярна біологія)

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1996

ДВ. 854825

Робота виконана в Інституті молекулярної біології і генетики  
НАН України та на кафедрі Мікробіології Університету штату  
Техас, США

Наукові керівники:

доктор біологічних наук  
О.І. Корнелюк та  
професор М. Джайарам

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,  
професор С.М. Храпунов та  
кандидат біологічних наук  
О.І. Черепенко

Провідна установа:

Інститут біоорганічної хімії та  
нафтохімії НАН України

Захист відбудеться "19" листопада 1996 р. на засіданні  
Спеціалізованої вченої ради Д 016.11.01 з захисту докторських  
дисертацій в Інституті молекулярної біології і генетики НАН  
України за адресою 252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

0.10.51 *Корнелюк*

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту молеку-  
лярної біології і генетики НАН України.

Автореферат розісланий "17" листопада 1996 р.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

*Л.Л. Лукаш*  
Л.Л. Лукаш

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00760102 (G)

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Сайт-специфічна рекомбінація залучена до таких процесів, як інтеграція і ексцизія лізогенних бактеріофагів, транспозиції, інверсії контролюючих елементів генної активності, переключення типів спарювання, перебудови між генами варіабельних і константних ділянок імуноглобулінів. Вивчення процесу сайт-специфічної рекомбінації на різних модельних системах дозволяє підійти до розуміння природних процесів спрямованих змін геному.

2-мкм плазміда з *S.cerevisiae* кодує систему сайт-специфічної рекомбінації, яка складається з білку Flp, каталізуючого інверсії однієї ділянки плазміди відносно іншої по механізму "flip-flop", і двох інвертованих рекомбінаційних сайтів на плазміді. Ця рекомбінаційна система залучена до процесу ампліфікації 2-мкм плазміди у клітинах дріжджів. Механізм ампліфікації 2-мкм плазміди на цей час є моделлю механізму генної ампліфікації.

Дисертаційне дослідження присвячене вивченню початкових етапів сайт-специфічної рекомбінації, яка каталізується білком Flp - зв'язуванню білку Flp з ділянкою рекомбінації і наступному розрізуванню ДНК.

Процес зв'язування білку Flp з ділянкою рекомбінації передбачає встановлення специфічних точкових контактів з визначеною послідовністю ДНК. Для розуміння цього процесу необхідно вивчення контактів білку з ДНК, яке стимулюється ще й тим, що білок Flp має щонайменш два ДНК-зв'язуючих домени, причому, в первинній структурі білку Flp не знайдено гомології з жодним з відомих ДНК-зв'язуючих мотивів (Panigrahi & Sadowski, 1994). Раніше методом "відбитків" було досліджено ряд потенційних ДНК-білкових контактів в ділянці Flp-рекомбінації (Bruckner & Cox, 1986; Panigrahi & Sadowski, 1992). В нинішній роботі досліджені деякі потенційні точкові контакти білку Flp з

ДНК в малому і великому жолобку з використанням аналогів канонічних основ, з якими неможливо утворення ряду специфічних ДНК-білкових контактів. Результати дослідження дозволяють розширити уявлення про процес зв'язування білку F1p з ДНК.

Білок F1p, зв'язуючись з ділянкою рекомбінації, згинає її, причому вугол вигину становить більш ніж 140 градусів, і його центр розташований у центрі спейсерної послідовності ділянки рекомбінації (Schwartz & Sadowski, 1990). В дисертації проведено теоретичний аналіз первинної послідовності ділянки F1p-рекомбінації, який свідчить, що про ймовірну схильність ділянки рекомбінації до згинання, зумовленого зв'язуванням з білком, і, можливо, до протікання перших ферментативних етапів рекомбінації - розрізуванню ДНК і/або переносу ланцюгу.

Зв'язування білку F1p з ділянкою рекомбінації приводить до першого каталітичного етапу рекомбінації - розрізуванню ДНК. Результати проведених в дисертації експериментів по вивченню реакції розрізування свідчать про те, що розрізування ДНК білком F1p відбувається до утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу (комплексу між двома ділянками рекомбінації із зв'язаними з ними молекулами ферменту) і підтримує ідею про достатність зв'язування димеру білку F1p з однією ділянкою рекомбінації для ініціації розрізування ДНК.

**МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Метою роботи було вивчення характеру зв'язування білку F1p з ділянкою F1p-рекомбінації, а також вивчення першого каталітичного етапу рекомбінації - розрізування ДНК білком F1p.

Виходячи з мети роботи в ході її виконання були поставлені такі завдання:

1. Розробити методику оцінки ступеня спорідненості різних ДНК-субстратів до білку F1p за допомогою фрагментів ДНК, що

містять один Flp-зв'язуючий елемент ДНК і спейсерну послідовність (т.з. "половинних" сайтів рекомбінації).

2. Провести мутаційний аналіз Flp-зв'язуючого елемента ДНК з використанням аналогів основ, з якими неможливо утворення ряду специфічних водневих зв'язків, а саме: 7-дезагуаніну та інозину замість гуаніну, 7-дезааденіну замість аденіну та 4-О-метилтиміну замість тиміну.

3. Провести аналіз первинної послідовності ділянки Flp-рекомбінації, а саме розподілу "вигиноутворюючих" динуклеотидів та олігонуклеотидів з відомими конформаційними властивостями.

4. Розробити методи аналізу структурної організації фермент-субстратного комплексу білку Flp з ділянкою рекомбінації на етапі розрізування ДНК.

5. Провести одночасний моніторинг утворення продуктів реакцій розрізування ДНК білком Flp та рекомбінації в цілому в різних умовах.

**НАУКОВА НОВИЗНА РОБОТИ.** 1. Вперше показано, що розрізування білком Flp ДНК відбувається до утворення синаптичного комплексу, і для розрізу ДНК достатньо утворення комплексу між димером білку Flp та однією ділянкою рекомбінації.

2. Виявлено, що при надоптимальному молярному співвідношенні білку Flp до Flp-зв'язуючого елемента ДНК блокується утворення продуктів рекомбінації, але це блокування не пережоджає розрізуванню ДНК білком Flp.

3. Виявлено, що білок Flp утворює з Flp-зв'язуючим елементом ДНК множинні контакти різного ступеню "критичності" для зв'язування.

Кореляцію ефективності реакції рекомбінації із зв'язуванням білку Flp з мутантними ділянками рекомбінації, в яких

4. Виявлено, що білок F1r утворює ДНК-білкові контакти одночасно в великому та малому жолобках подвійної спіралі ДНК щонайменш з п'ятью основами F1r-зв'язуючого елемента ДНК, причому білок F1r має контакти з F1r-зв'язуючим елементом ДНК в малому жолобку з обох боків подвійної спіралі.

5. Виявлено, що в ділянці F1r-рекомбінації існує схильність до згинання, зумовленого зв'язуванням з білком F1r.

6. Запропоновані і впроваджені методи розведення і блокування утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу білку F1r з ділянками рекомбінації за допомогою рекомбінаційно-неактивного аналогу субстрату білку F1r для вивчення реакцій розрізування ДНК і рекомбінації в цілому.

7. Запропонована та впроваджена методика використання "половинних" сайтів рекомбінації і аналогів основ для вивчення точкових контактів білку F1r з ДНК.

8. Запропоновано модель ранніх етапів F1r-рекомбінації та робочу модель ділянки F1r-рекомбінації, зв'язаної з білком F1r.

**ПРАКТИЧНА ЦІННІСТЬ РОБОТИ.** Запропоновані в роботі методи аналізу білково-нуклеїнових контактів та організації фермент-субстратного комплексу можуть бути рекомендовані для дослідження інших моделей сайт-специфічної рекомбінації, а також при дослідженні структурно-функціональної організації різних ДНК-білкових комплексів.

**АПРОБАЦІЯ РОБОТИ.** Матеріали роботи доповідалися на конференціях Austin Spring Meeting (Austin, США, 1994) та Workshop on Site-Specific Recombination and Transposition (Woodshole, США, 1994).

1. Розробити методику об'єкти ступеня скористаності різних ДНК-субстратів до білку F1r за допомогою фрагментів ДНК, що

## РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

## 1. ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ БІЛКУ Flp З ДІЛЯНКОЮ РЕКОМБІНАЦІЇ

1.2. Мутаційний аналіз Flp-зв'язуючого елемента ДНК з використанням аналогів основ.

Процес зв'язування білку Flp з ділянкою рекомбінації (рис.1) передбачає встановлення специфічних точкових контактів з визначеною послідовністю ДНК. Для розуміння цього процесу необхідно вивчення контактів білку з ДНК. Раніше методом "відбитків" було досліджено ряд потенційних ДНК-білкових контактів в ділянці Flp-рекомбінації (Bruckner & Cox, 1986; Panigrahi & Sadowski, 1992).

В нинішній роботі досліджені деякі потенційні точкові контакти білку Flp з ДНК в малому і великому жолобках з використанням аналогів канонічних основ, з якими неможливо утворення ряду специфічних ДНК-білкових контактів. Для цього в роботі було розроблено методику оцінки ступеня спорідненості різних ДНК-субстратів до білку Flp за допомогою фрагментів ДНК, що містять один Flp-зв'язуючий елемент ДНК та спейсерну послідовність (т.з. "половинних" сайтів рекомбінації). Методика включає дослідження відносної реакційної здатності "половинних" сайтів рекомбінації, які мали в Flp-зв'язуючому елементі ДНК замість канонічних основ їх аналоги, в реакції переносу ланцюгу (Serre et al., 1992; Saxena et al., 1994). Реакція переносу ланцюгу в "половинних" сайтах включає розрізування ланцюгу ДНК з супутнім ковалентним приєднанням білку Flp до ДНК, і з'єднання ланцюгу шляхом переносу фосфатної групи на 5'-ОН групу, якою закінчується спейсерна послідовність (рис.2). Базуючись на даних попередніх робіт про кореляцію ефективності реакції рекомбінації із зв'язуванням білку Flp з мутантними ділянками рекомбінації, в яких

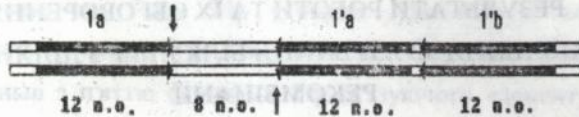


Рис.1. Ділянка рекомбінації білку Flp. Ділянка рекомбінації складається з трьох Flp-зв'язуючих елементів (1a, 1'a і 1'b). Між елементами 1a і 1'a - спейсерна послідовність. ↓ - місця розрізу ДНК білком Flp.

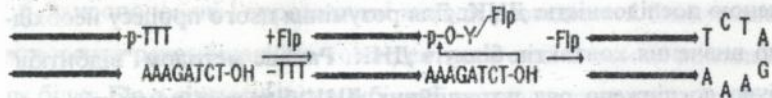


Рис.2. Утворення продукту реакції переносу ланцюгу в "половинному" сайті. ⇒ - Flp-зв'язуючий елемент ДНК. P - фосфатна група. Y - тирозин активного центру білку Flp.

було замінено кожену пару основ в Flp-зв'язуючому елементі ДНК на три можливі пари основ (Senecoff et al., 1988), а також на тому, що каталітичні амінокислотні залишки білку Flp не приймають участі у зв'язуванні з основами Flp-зв'язуючого елемента ДНК (Parsons et al., 1990), вимірювання реакційної здатності "половинних" сайтів розглядалося в роботі як задовільна міра зв'язування "половинних" сайтів білком Flp.

В роботі було використано такі аналоги канонічних основ ДНК, які перешкоджають утворенню потенційних водневих зв'язків між білком і деякими атомами/групами атомів основ ДНК в великому або малому жолобках: 7-деазагуанін і інозин замість гуаніну, 7-деазааденін замість аденіну, 4-О-метилтимін замість тиміну. "Половинні" сайти містили аналоги основ тільки в одному з двох ланцюгів (один аналог основи на один "половинний" сайт). Всього було використано 24 мутантних "половинних" сайти.

Результати експериментів наведені у табл.1. Чисельні значення в таблиці показують у скільки разів зменшується реакційна здат-

Табл. 1. Реакційна здатність "половинних" сайтів, що містять аналоги основ.

	G1	A2	A3	T4	A5	G6	G7	A8	A9	C10	T11	T12
7DG	7.1					1.3	2.6			2.2		
7DA		1.3	1.7	6.7	1			2.4	1		1.3	2.0
I	1					1	20			1		
40MeT		62	4.0	3.9	25			4.1	3.9		4.0	4.1

Зверху показано послідовність Flp-зв'язуючого елемента ДНК. ↓ - місце розрізу ДНК білком Flp. 7DG - реакційна здатність "половинних" сайтів, що містять 7-деазагуанін; 7DA - 7-дезааденін; I - інозин; 40MeT - 4-О - метилтимін. Діапазон коливань значень - 10-20% від указаних у таблиці величин.

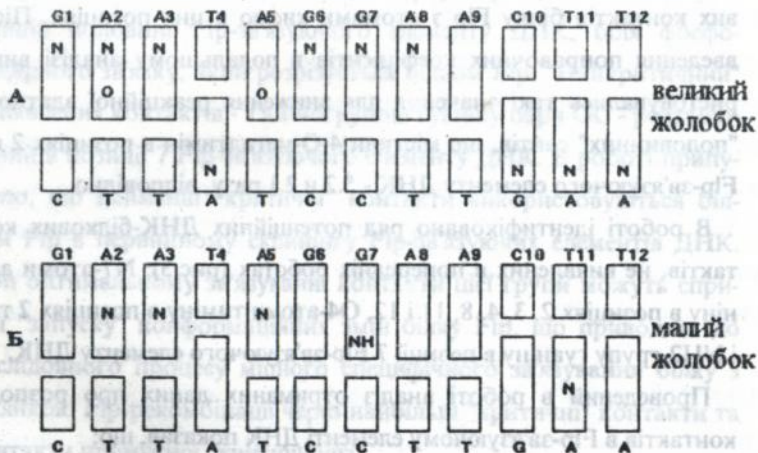


Рис.3. Розподіл контактів білку Flp с основами Flp-зв'язуючого елемента ДНК у великому (А) і малому (Б) жолобках ДНК. "N" - N7- і N3- атоми аденіну і гуаніну; "NH" - NH<sub>2</sub>-група гуаніну; "O" - O4-атом тими́на.

ність мутантних "половинних" сайтів порівняно з реакційною здатністю "половинного" сайту, який містив тільки канонічні основи (активність якого прийнята за 1), тобто 1 - відсутність ефекту, 20 - 20-ти кратне зниження активності.

Виявлені суттєві ефекти заміни тиміну на 4-О-метилтимін у всіх АТ-парах Flp-зв'язуючого елемента ДНК в роботі були інтерпретовані з відомою обережністю, тому що наявність тільки одного з двох водневих зв'язків в парі 4OMeT-A, а також послаблення цього зв'язку внаслідок метилювання атому кисню в положенні 4 тиміну може викликати деформації локальної структури ДНК. Але, значне зниження реакційної здатності "половинних" сайтів, що містили 4-О-метилтимін в позиціях 2 і 5 Flp-зв'язуючого елемента ДНК порівняно з таким в позиціях 3, 4, 8, 9, 11 і 12 Flp-зв'язуючого елемента ДНК, на нашу думку, свідчить на користь можливих контактів білку Flp з атомами кисню в цих позиціях. Після введення поправочних коефіцієнтів в подальшому аналізі використовувались такі значення для зниження реакційної здатності "половинних" сайтів, що містили 4-О-метилтимін в позиціях 2 і 5 Flp-зв'язуючого елемента ДНК - 5.2 і 2.1 разу, відповідно.

В роботі ідентифіковано ряд потенційних ДНК-білкових контактів, не виявлених в попередніх роботах (рис.3): N7-атоми адеїну в позиціях 2, 3, 4, 8, 11 і 12, O4-атоми тиміну в позиціях 2 та 5 і NH<sub>2</sub>-групу гуаніну в позиції 7 Flp-зв'язуючого елемента ДНК.

Проведений в роботі аналіз отриманих даних про розподіл контактів в Flp-зв'язуючому елементі ДНК показав, що:

- потенційні контакти розподілені по всьому Flp-зв'язуючому елементу ДНК як у великому, так і в малому жолобках ДНК. Контакти білку з Flp-зв'язуючим елементом ДНК в малому жолобку розташовані з протилежних боків подвійної спіралі ДНК, і, ймовірно, білок Flp як би обплітає ДНК;

- щонайменш з п'яттю парами основ Flp-зв'язуючого елемента ДНК білок Flp має контакти як у великому, так і в малому жолобках ДНК. Це може мати значення для підвищення специфічності зв'язування білку з ДНК, а також може відображати особливості динаміки зв'язування різних доменів білку Flp з Flp-зв'язуючим елементом ДНК (від'ємна кооперативність зв'язування для пар АТ у позиціях 2, 3, 5 і 11 Flp-зв'язуючого елемента ДНК та позитивна кооперативність зв'язування для пари GC в позиції 7 Flp-зв'язуючого елемента ДНК);

- не всі потенційні контакти мають однакове значення для зв'язування білку Flp з ДНК. Контакти були поділені на три групи - найменш та найбільш "критичні" контакти, а також контакти проміжної "критичності". Найбільш "критичні" контакти з Flp-зв'язуючим елементом ДНК білок Flp утворює, в основному, в першій половині Flp-зв'язуючого елемента ДНК, біля фосфодієфірного зв'язку, який розрізується білком Flp. "Найкритичніший" з виявлених контактів - з аміногрупою гуаніну пари GC - розташований в позиції 7 Flp-зв'язуючого елемента ДНК. В роботі припущено, що найменш "критичні" контакти використовуються білком Flp в первинному скринінгу Flp-зв'язуючих елементів ДНК. При оптимальному зв'язуванні контакти цієї групи можуть сприяти "запуску" конформаційних змін білку Flp, що приводять до послідовного процесу міцного специфічного зв'язування білку з ділянкою Flp-рекомбінації через найбільш "критичні" контакти та контакти проміжної "критичності".

Результати роботи погоджуються з точкою зору на процес специфічного зв'язування білку Flp з ДНК як на процес встановлення послідовних серій слабких контактів з індивідуальними парами основ ДНК (Kimball et al., 1995). Такий спосіб зв'язування

може бути загальним правилом для ДНК-зв'язаних білків, що впізнають довгі ділянки ДНК.

## 1.2. Теоретичний аналіз спроможності ділянки Flp-рекомбінації до згинання.

Зв'язуючись з ділянкою рекомбінації, білок Flp його різко згинає, причому кут вигину становить більш ніж  $140^\circ$ , а його центр розташований у центрі спейсерної послідовності ділянки рекомбінації (Schwartz & Sadowski, 1990). Якщо припустити, що первинна структура ділянки Flp-рекомбінації оптимізована в ході еволюції, досить природно виникає питання - чи існує в ділянці рекомбінації схильність до згинання? Така схильність змогла б полегшити сам процес згинання. Схильність деяких фрагментів ДНК, що зв'язуються з білками, до згинання, що викликається зв'язуванням, було виявлено у ряді робіт (Travers, 1989).

Для виявлення суттєвих особливостей первинної структури ділянки Flp-рекомбінації в роботі проведено порівняльний аналіз розподілу "вигиноутворюючих" динуклеотидів (Barber et al., 1990) в ділянці Flp-рекомбінації з таким в ділянках рекомбінації деяких інших рекомбіназ інтегразної родини (рис.4). Динуклеотиди, що мають тенденцію до вигину у бік великого жолобку ДНК (major-philic dimers) (TA, CG, CA/TG, GG/CC), позначені на рисунку символом '+'; у бік малого жолобку (minor-philic dimers) (AT, AA/TT, GT/AC) - '-', а ті, що не мають виразної тенденції до вигину - 'o'. В ділянках рекомбінації можливо виділити чотири симетрично розташованих блоки по три нуклеотиди (два динуклеотиди з одним спільним нуклеотидом), що мають тенденцію до вигину у бік малого жолобку ДНК. Розташування виділених блоків динуклеотидів таке (відстань між 1-м (3-м) і 2-м (4-м) блоками становить



10 пар основ), що вигини ДНК у бік малого жолобку у відповідних місцях можуть призвести до глобального вигину ДНК.

2-й і 3-й блоки розташовані у місцях розрізу рекомбіназами ДНК. В роботі припущено, що при вигині у бік малого жолобку виникають напруження у фосфодіефірному зв'язку O5'-P, що розрізується рекомбіназами, і підсилення вигину динуклеотида у бік малого жолобку при зв'язуванні білку з ділянкою рекомбінації може полегшувати проходження реакції розрізування ДНК і/або наступної реакції переносу ланцюгу ДНК на відповідний сайт ділянки рекомбінації-партнеру. Присутність у 2-му і 3-му блоках в ділянці F1r-рекомбінації "нейтральних" динуклеотидів, ймовірно, відображає особливості механізму реакції розрізування білком F1r ДНК. Це припущення посередньо підтримується фактом про різну ефективність розрізування ДНК білком F1r в позиціях -4/-3 (більш ефективна реакція) і 3/4 (менш ефективна), та особливостями розрізування ділянок рекомбінації деякими іншими рекомбіназами інтегразної родини.

Спейсерна послідовність ділянки F1r-рекомбінації (TTTCTAGA) містить тетра nukлеотид CTAG. Цей тетра nukлеотид має особливі властивості. Аналіз кристалу олігонуклеотиду d(CTCTAGAG) (Hunter et al., 1989) показав, що цей олігонуклеотид має вигин у бік великого жолобку з центром в динуклеотиді ТА. Тетрануклеотид CTAG є важливою складовою частиною trp-оператора. Аналіз ко-кристалу trp-репресору і trp-оператору (Otwiński et al., 1988) також показав присутність вигину у бік великого жолобку з центром в динуклеотиді ТА тетра nukлеотиду CTAG. Таким чином, можна обґрунтовано припустити, що спейсерна послідовність ділянки F1r-рекомбінації має схильність до вигину у бік великого жолобку ДНК з центром приблизно у центрі спейсерної послідовності ділянки рекомбінації.

На основ аналізу первинної послідовності ділянки Flp-рекомбінації в роботі запропоновано робочу модель ділянки Flp-рекомбінації, зв'язаної з білком Flp. Основними особливостями моделі є чотири вигини ДНК у бік малого жолобку по краях Flp-зв'язуючих елементів ДНК, і вигин у бік великого жолобку ДНК з центром у центрі спейсерної послідовності ділянки Flp-рекомбінації.

Проведений в роботі аналіз первинної послідовності ділянки Flp-рекомбінації, а також порівняння його результатів з даними роботи про мутаційний аналіз спейсерної послідовності цієї ділянки (Umlauf & Cox, 1988) дозволяє обґрунтовано припустити, що в ділянці Flp-рекомбінації існує схильність до згинання, яке викликається зв'язуванням з білком Flp, і, можливо, до протікання перших ферментативних етапів рекомбінації - розрізування ДНК-субстрату і/або переносу ланцюгу. В роботі також припущено, що білок Flp в процесі пошуку ділянки рекомбінації впізнає її не тільки шляхом встановлення з нею специфічних ДНК-білкових контактів, але й по спроможності приймати необхідну конформацію при зв'язуванні з білком Flp.

## 2. ВИВЧЕННЯ РЕАКЦІЇ РОЗРІЗУВАННЯ ДНК БІЛКОМ FLP

Білок Flp розрізує ДНК досить незвичайним способом - мономер білку Flp, зв'язаний з одним з Flp-зв'язуючих елементів ДНК, розрізує ДНК не біля свого місця зв'язування, а через спейсер у місці зв'язування другого мономера на тому ж ланцюзі ДНК (Lee et al., 1994). Відкриття такого способу розрізування ставить таке питання - коли відбувається розрізування ДНК? Чи є взаємодія комплексу двох рекомбінаційних сайтів із зв'язаними з ними білком Flp (структури, абсолютно необхідної на етапі переносу ланцюгів ДНК) необхідною умовою реакції розрізування? Цілом

очевидно, що відповідь на це запитання дозволить глибше зрозуміти механізм сайт-специфічної Flp-рекомбінації.

Для відповіді на це запитання були розроблені спеціальні експерименти. Основна ідея цих експериментів полягала у тому, щоб утворити такі умови проведення реакції рекомбінації, при яких би так чи інакше зменшувалась би кількість новоутворених рекомбінаційно-компетентних синаптичних комплексів. Рекомбінація в цілому абсолютно залежить від утворення таких комплексів, тому оцінка ефективності рекомбінації в цих експериментах слугувала мірою утворення синаптичних комплексів. Реакція розрізування ДНК білком Flp може залежити, а може і не залежити від утворення синаптичного комплексу. Якщо утворення синаптичного комплексу передує реакцію розрізування, то її ефективність повинна корелювати з кількістю новоутворених синаптичних комплексів, тобто з ефективністю рекомбінації в цілому. Якщо ж реакція розрізування передує утворення синаптичного комплексу, такої кореляції відмітити буде не можливо.

Вищезначені умови утворювались: 1) при розведенні реакційної суміші (при розведенні збільшується час, що потребують компоненти реакції (білок+ДНК) на зустріч один з одним) (рис.5); 2) при введенні в реакційну суміш аналогу субстрату (який містить вставку з 4 п.о. в спейсерній послідовності ділянки рекомбінації), що блокує утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу (табл.2); 3) при надоптимальних співвідношеннях білок/ДНК (при яких ефективність рекомбінації знижена) (рис.6).

Проведені експерименти показали, що:

- реакція розрізування ДНК білком Flp в визначених умовах не є швидкість-лімітуючою стадією рекомбінації;
- в умовах, коли ефективність рекомбінації в цілому різко знижена (тобто різко знижена кількість рекомбінаційно-компетен-

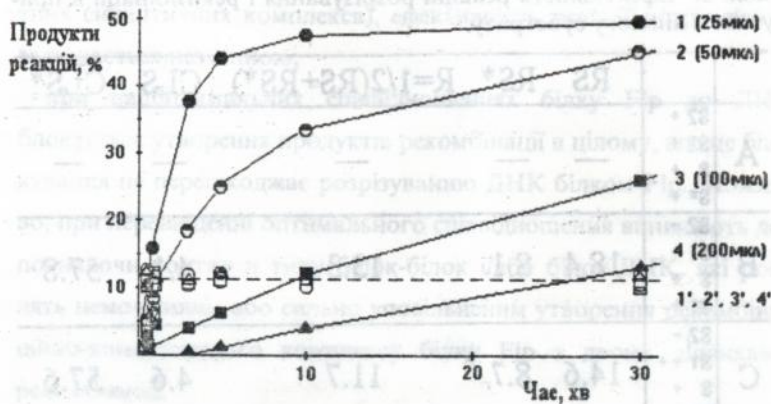


Рис.5. Залежність утворення продуктів реакції рекомбінації (—) і розрізування ДНК (- - -) від часу при різних об'ємах реакційної суміші.

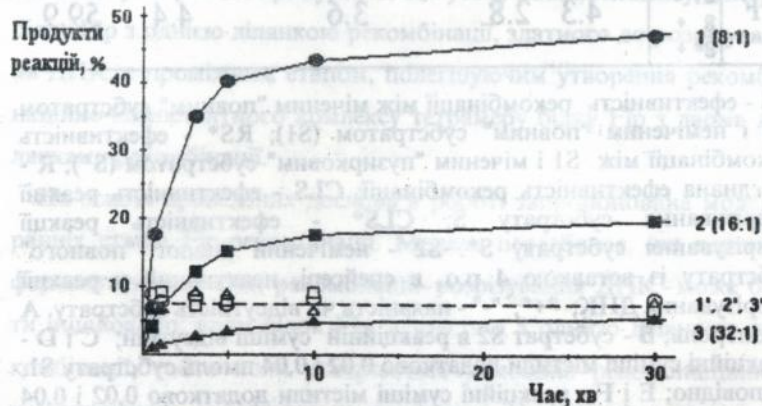


Рис.6. Залежність утворення продуктів реакції рекомбінації (—) і розрізування ДНК (- - -) від часу при співвідношеннях білок/ДНК, що збільшуються.

Табл. 2. Ефективність реакцій розрізування і рекомбінації в присутності аналогу субстрату.

		RS	RS*	$R=1/2(RS+RS^*)$	CLS	CLS*
A	S2 +					
	S1 +					
	S +	—	—	—	—	—
	S* +					
B	S2 -					
	S1 +	18.4	8.1	13.3	4.1	57.8
	S +					
	S* +					
C	S2 -					
	S1 ++	14.6	8.7	11.7	4.6	57.6
	S +					
	S* +					
D	S2 -					
	S1 +++	17.0	11.5	14.3	5.6	56.3
	S +					
	S* +					
E	S2 +					
	S1 +	11.0	6.5	8.8	5.6	58.4
	S +					
	S* +					
F	S2 ++					
	S1 +	4.3	2.8	3.6	4.4	59.9
	S +					
	S* +					

RS - ефективність рекомбінації між міченим "повним" субстратом (S) і неміченим "повним" субстратом (S1); RS\* - ефективність рекомбінації між S1 і міченим "пузирковим" субстратом (S\*); R - об'єднана ефективність рекомбінації; CLS - ефективність реакції розрізування субстрату S; CLS\* - ефективність реакції розрізування субстрату S\*. S2 - немічений аналог "повного" субстрату із вставкою 4 п.о. в спейсері, неактивний у реакції розрізування ДНК; "+", "-" - наявність чи відсутність субстрату. А - контроль; В - субстрат S2 в реакційній суміші відсутній; С і D - реакційні суміші містили додатково 0,02 і 0,04 пмоль субстрату S1, відповідно; Е і F - реакційні суміші містили додатково 0,02 і 0,04 пмоль S2, відповідно. В таблиці вказано середні значення двох серій реакцій. Діапазон коливань значень - 10-20% від вказаних в таблиці значень (крім значень для R).

тних синаптичних комплексів), ефективність реакції розрізування залишається незмінною;

- при надоптимальних співвідношеннях білку Flp до ДНК блокується утворення продуктів рекомбінації в цілому, але це блокування не перешкоджає розрізуванню ДНК білком Flp. Можливо, при перевищенні оптимального співвідношення виникають доповнюючі контакти типу білок-білок і/або білок-ДНК, які роблять неможливим або сильно уповільненим утворення рекомбінаційно-компетентного комплексу білку Flp з двома ділянками рекомбінації.

На основі отриманих даних в роботі зроблено висновок про те, що розрізування ДНК білком Flp відбувається до утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу. Ці дані краще всього погоджуються з моделлю, згідно якої розрізування ДНК білком Flp ініціюється при зв'язуванні димеру білку з однією ділянкою рекомбінації, тобто з половиною синаптичного комплексу. В роботі припущено, що утворення комплексу димеру білку Flp з однією ділянкою рекомбінації, здатного до розрізування ДНК, є проміжним етапом, полегшуючим утворення рекомбінаційно-компетентного комплексу тетрамеру білку Flp з двома ділянками рекомбінації.

На основі проведених дослідів в роботі запропонована модель ранніх етапів Flp-рекомбінації. Модель передбачає, що перший ферментативний етап рекомбінації-розрізування ДНК - може бути ініційовано, коли білок Flp зв'язується з однією ділянкою рекомбінації, тобто коли утворюється половина рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу. У відсутність партнеру по синаптичному комплексу розрізана ДНК швидко відновлює свою первісну цілісність, і розрізи ДНК не приводять до необоротних пошкоджень. Відбувається так би мовити осцилювання

розрізування-відновлення ДНК. Коли з'являється партнер по реакції рекомбінації, утворюється синаптичний комплекс між двома ділянками рекомбінації, і стає здійсненою умова переносу ланцюгу по рекомбінантному типу.

На закінчення слід відзначити, що в роботі проведено комплексне дослідження початкових етапів Flp-рекомбінації. Найбільш суттєвими результатами є такі:

- білок Flp утворює з Flp-зв'язуючим елементом ДНК контакти різного ступеня "критичності" для зв'язування;
- з теоретичної точки зору, в ділянці Flp-рекомбінації існує схильність до згинання, що викликається зв'язуванням з ним білку Flp;
- розрізування ДНК білком Flp відбувається до утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу тетрамеру білку Flp з двома ділянками рекомбінації. Реакція розрізування ініціюється при зв'язуванні з ділянкою рекомбінації димеру білку Flp.

## ВИСНОВКИ

1. Проведений в роботі мутаційний аналіз Flp-зв'язуючого елемента ДНК з використанням аналогів основ дозволив ідентифікувати ряд потенційних точкових контактів білку Flp з N7-атомами гуаніну, N7-атомами аденіну, O4-атомами тиміну і NH<sub>2</sub>-групою гуаніну Flp-зв'язуючого елемента ДНК. Потенційні контакти білку Flp з ДНК розподілені по всьому Flp-зв'язуючому елементу ДНК як в великому, так і в малому жолобках ДНК. Білок Flp має контакти з Flp-зв'язуючим елементом ДНК в малому жолобку з обох боків подвійної спіралі ДНК, тобто білок, зв'язуючись з ДНК, як би обплітає її.

2. Різна чутливість білку Flp до введення однакових аналогів основ в різні позиції Flp-зв'язуючого елемента ДНК, дозволяє зро-

бити висновок, що білок Flp утворює з ділянкою Flp-рекомбінації контакти різного ступеня "критичності" для зв'язування. Найбільш "критичні" контакти з Flp-зв'язуючим елементом ДНК білок Flp утворює, в основному, в першій половині Flp-зв'язуючого елемента ДНК біля фосфодіефірного зв'язку, що розрізується білком Flp. "Найкритичніший" з виявлених контактів білок утворює з аміногрупою гуаніну пари GC, розташованої в позиції 7 Flp-зв'язуючого елемента ДНК.

3. Аналіз первинної послідовності ДНК в ділянці Flp-рекомбінації, проведений в роботі з метою з'ясування схильності ділянки до вигину, що викликається зв'язуванням з ним білку Flp, показав не випадковість розподілу "вигиноутворюючих" динуклеотидів та олігонуклеотидів з відомими конформаційними властивостями в ділянці Flp-рекомбінації. Аналіз свідчить на користь схильності ділянки рекомбінації до згинання, що викликається зв'язуванням з білком Flp. На основі аналізу розподілу запропоновано робочу модель ділянки Flp-рекомбінації, зв'язаної з білком Flp. Основними особливостями моделі є чотири вигини ДНК у бік малого жолобка по краях Flp-зв'язуючих елементів, і вигин у бік великого жолобка ДНК з центром у центрі спейсерної послідовності ділянки Flp-рекомбінації.

4. Виявлено, що надоптимальне співвідношення білку Flp до Flp-зв'язуючого елемента ДНК, яке блокує реакцію рекомбінації в цілому, не перешкоджає розрізуванню ДНК білком Flp.

5. Показано, що утворення рекомбінаційно-компетентного си-наптичного комплексу двох зв'язаних з білком Flp ділянок рекомбінації не є необхідною умовою ініціації реакції розрізування ДНК білком Flp. Достатньою умовою є зв'язування білку Flp з однією ділянкою рекомбінації.

6. Аналіз реакції розрізування ДНК білком F1p дозволяє запропонувати модель раних етапів F1p-рекомбінації, згідно з якою зв'язування білку F1p з ділянкою рекомбінації у відсутність партнера по синаптичному комплексу приводить до процесу розрізування-відновлення ДНК, що повторюється, який відбувається до утворення синаптичного комплексу двох ділянок рекомбінації.

#### СПИСОК ПРАЦЬ, НАДРУКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Saxena P., Whang I., Lee J., Lee J., Voziyanov Y., Mendoza V., Jayaram M. Role of tyrosine phosphorylation - dephosphorylation in copy number control of the yeast plasmid 2 micron circle //Cell. and Mol. Biol. Res.- 1994.- 40, N.3.- P.215-222.

2. Возиянов Ю.А. Возможная роль индивидуальных ДНК-белковых контактов сайт-специфической рекомбиназы F1p из *S.cerevisiae* с азотистыми основаниями F1p-связывающего элемента ДНК //Биополимеры и клетка.- 1996.- 12, N.1.- С.89-94.

3. Voziyanov Y., Lee J., Whang I., Lee J., Jayaram M. Analyses of the first chemical step in F1p site-specific recombination: Synapsis may not be a pre-requisite for strand cleavage //J. Mol. Biol.1996.- 256, 4.- P.720-735.

4. Возиянов Ю.А., Корнелюк А.И. Взаимодействие белка F1p с участком рекомбинации: индуцированное фермент-субстратное соответствие //Биополимеры и клетка.- 1996.- 12, N.3.- С.17-26.

## АНОТАЦІЇ

Возиянов Ю.А. Структурно-функціональна організація фермент-субстратного комплексу сайт-специфічної рекомбінази F1p із дрожжей *S.cerevisiae*. Дисертація на соискание ученої ступені кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.03 - молекулярна біологія. Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. Київ, 1996. Защищаються 4 печатні роботи. В роботі вивчалися початкові етапи F1p-залежимої сайт-специфічної рекомбінації - зв'язування білка F1p з участком рекомбінації і розрізання білком ДНК. Обнаружені найбільш і найменше "критичні" контакти білка F1p з основами F1p-зв'язуючого елемента ДНК. Оказалося, що білок F1p оплетает ДНК. В участку F1p-рекомбінації, вероятно, существует предрасположенность к изгибанию, вызываемого зв'язуванням с ним білка F1p. Показано, що білок F1p розрізає ДНК до утворення рекомбінаційно-компетентного синаптичного комплексу.

Voziyanov Y. Structure-functional organization of substrate-enzyme complex of site-specific recombinase F1p from yeast *S.cerevisiae*. Dissertation thesis for Candidate of Science degree on speciality 03.00.03 (molecular biology). Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU. Kiev, 1996. 4 printed papers are defended. In the present work the first stages of F1p-dependent site-specific recombination - binding of F1p-protein to site of recombination and protein-dependent cleavage of DNA - have been studied. The most and the least "critical" contacts of F1p-protein with the bases of F1p-binding element have been found. It turned out that F1p protein wraps DNA. The F1p recombination target very likely has a tendency to bend upon F1p protein binding. It has been found that F1p protein cleaves DNA before recombination-competent synaptic complex is formed.

Ключові слова: F1p, сайт-специфічна рекомбінація, білок-нуклеїнове впізнавання.

---

Зам. 96. Формат 60x90/16. Обл. вид. арк. 1.0

Підписано до друку 14.10.96 р. Тираж 100 прим.

---

Поліграфічна дільниця ІТФ ім. М.М.Боголюбова НАН України

404506

АВ 35.825