

Рекомбинационный комплекс из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в процессе очистки

В. С. Смолина

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН
188350, Гатчина Ленинградской обл.

Показано, что рекомбинационная активность между гомологичными плазмидами, несущими различные мутантные аллели *tet*-гена, сохраняется в процессе четырехступенчатой очистки экстрактов из митотических и мейотических клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Реакция требует присутствия ионов Mg^{2+} и не зависит от наличия АТФ и dNTP. Молекулярная масса рекомбинационного комплекса равна 440—450 кДа.

Введение. Генетическая рекомбинация — сложный процесс, в результате которого происходит обмен генетического материала ДНК. Для исследования рекомбинации *in vitro* предложено несколько моделей. Общими для всех них являются два типа событий, вносящих значительный вклад в понимание гомологической рекомбинации: 1) образование гибридной ДНК в результате обмена нитей на участках гомологии; 2) образование перекрестных структур нитей ДНК, так называемых структур Холлидея.

Для доказательства того, что эти явления наблюдаются при генетической рекомбинации, применяются разные методические подходы. Одним из самых распространенных приемов исследования энзимологии рекомбинации является применение трансферазной реакции, в которой происходит обмен нитей на гомологичных участках.

Самые первые и обширные исследования в этом направлении проведены на *RecA*-белке из *Escherichia coli* [1—3]. Стехиометрические количества *RecA*-белка связываются в реакции с однопочечными ДНК и осуществляют перенос нитей в 3'—5'-направлении, сопровождающийся гидролизом АТФ.

АТФ-зависимая трансферазная активность описана для *UvsX*-белка бактериофага Т4 [4], *Rec1*-белка *U. maydis* [5, 6]. АТФ-независимая трансфе-

разная активность была обнаружена у белков, выделенных из митотических и мейотических клеток *S. cerevisiae* [7, 8], В-лимфоидных клеток человека [9], миелобластов человека, клеток HeLa и семенников крыс [10].

Вторым приемом по широте использования при изучении рекомбинации *in vitro* является применение мутантных плазмид [11, 12]. С помощью этой системы можно изучать рекомбинационную активность неочищенных экстрактов из различных организмов и проводить сравнительную характеристику их активности.

Авторы работы [13] осуществили такие исследования на экстрактах из клеток мышей, клеток лилии, митотических и мейотических клеток дрожжей.

В работе [11] с помощью электрофореза в агарозном геле и электронного микроскопа показано, что клеточные экстракты дрожжей катализируют реакцию рекомбинации *in vitro* между гомологическими плазмидами, содержащими различные мутантные аллели в тетрациклиновом гене. Исследования рекомбинантной ДНК с применением электрофореза в агарозном геле показали, что ряд новых видов ДНК образуется во время реакции рекомбинации. Эти новые виды ДНК мигрируют в агарозном геле с уменьшенной электрофоретической подвижностью по сравнению с субстратной ДНК.

С помощью электронного микроскопа обнару-

жены перекрещенные структуры Холлидея — четырехцепочечные интермедиаты ДНК, возникающие при гомологической или сайт-специфической генетической рекомбинации. Аналогичные результаты получили и другие авторы [14] с частично очищенными экстрактами из плаценты человека.

В данной работе приводятся результаты исследования рекомбиногенной активности в процессе частичной (четырёхступенчатой) очистки экстрактов из митотических и мейотических клеток дрожжей *S. cerevisiae*.

Известно, что в рекомбинации, помимо *RecA*-белка, участвует целый ряд различных белков и стимулирующих факторов. Как этот сложный комплекс поведет себя в процессе очистки? Предполагалось, что, возможно, после первого же этапа очистки исчезнет рекомбиногенная активность из-за потери каких-то нуклеаз, «надрезающих» нити ДНК, или других факторов, участвующих в рекомбинационном процессе, как это случилось при очистке рекомбиногенной активности из клеток человека [15]. Авторы работы [15] показали, что при очистке *RecA*-подобного белка действительно происходит разделение пиков активности этого белка и каких-то стимулирующих факторов, необходимых для эффективной рекомбинационной реакции. При смешивании этих пиков происходило восстановление исходной активности.

Материалы и методы. Источники экстрактов и их приготовление. Дрожжи *S. cerevisiae*, диплоидные штаммы Pг-2 MAT α /MAT α ; SVW1 MAT α /MAT α . Клетки выращивали в среде, содержащей в 1 л 10 г пептона, 2 % глюкозы, 20 мл дрожжевого автолизата (рН 5,0). Инкубацию проводили в течение 16 ч до середины логарифмической фазы. Затем клетки осаждали, промывали холодным буфером А (50 мМ трис-НСl, рН 7,5; 1 мМ ЭДТА; 10 % сахарозы), ресуспендировали в том же буфере (1 г/мл), охлаждали жидким азотом и хранили при -70 °С.

В случае мейотических клеток после охлаждения промывали споруляционной средой (0,3 %-й ацетат натрия) и инкубировали в этой среде при 30 °С до определенного времени. После споруляции клетки обрабатывали так же, как и вегетативные.

Перед использованием клетки оттаивали при комнатной температуре и немедленно помещали в ледяную баню. Добавляли KCl до концентрации 1 М, 0,5 ЭДТА (рН 8,0) до 1 мМ, PMSF до 0,1 мМ, 2-меркаптоэтанол до 10 мМ и разрушали клеточные стенки прессованием. Клеточный дебрис осаждали при 10 000 об/мин. К супернатанту добавляли 25 %-й стрептомицин сульфат до конечной концентрации 5 % для удаления клеточной ДНК,

выдерживали 30 мин на холоду и при повторном центрифугировании осадок отбрасывали, к супернатанту добавляли сульфат аммония до 70 % насыщения, в течение 30 мин растворяли на мешалке и оставляли в холодильнике на несколько часов.

Образовавшийся осадок осаждали центрифугированием (10 мин, 10 000 об/мин). Осадок ресуспендировали в буфере Б (20 мМ трис-НСl, рН 7,5; 0,1 мМ ЭДТА, 10 %-й глицерин, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ PMSF) и диализовали против буфера Б с 0,07 М NaCl. Присутствие сульфата аммония определяли 10 %-м ВаСО₂. После диализа экстракт осветляли центрифугированием при 10000 об/мин и получали фракцию 1. Концентрацию белка в ней определяли спектрофотометрически. Затем диализат наносили на колонку с DEAE-целлюлозой, белок элюировали градиентом 0,1—0,4 М NaCl в том же буфере (фракция 2). Фракция 3 — очистка на колонке с Р-целлюлозой градиентом концентрации NaCl 0,2—0,5 М. И последняя, четвертая ступень очистки на колонке с UV—ДНК-целлюлозой градиентом 0,2—0,5 М NaCl.

Рекомбинация *in vitro*. Рекомбиногенную активность определяли с использованием системы межплазмидной рекомбинации *in vitro*, в основе которой лежит восстановление функциональной активности тетрациклинового гена в результате гомологической рекомбинации между двумя плазмидами, одна из которых содержит делецию в сайте *BamHI* данного гена, другая — вставку в сайт *SalGI* (рис. 1). При обработке таких плазмид экстрактами из дрожжей и последующей трансформации ими клеток Z387 *E. coli* с дефектным геном *recA* выявляли число трансформантов, приобретших устойчивость к тетрациклину в результате рекомбинации.

Реакционная смесь (50 мкл) содержала по 0,5 мкг каждой плазмиды, 35 мМ Hepes, рН 7,8; 2 мМ спермидин, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 5 мМ АТР, 0,1 мг/мл BSA, четыре dNTP, концентрация каждого по 20 мМ и от 0 до 10 мкг белкового клеточного экстракта. Контрольные образцы содержали те же компоненты реакционной смеси, но вместо клеточного экстракта добавляли дистиллированную воду. После инкубации при 30 °С в течение 1,5 ч ДНК в образцах очищали с помощью экстракции фенолом и дальнейшим осаждением двумя объемами этанола с ацетатом аммония. После осаждения ДНК и тщательного высушивания проб едва заметный осадок ДНК ресуспендировали в 20 мкл бидистиллированной воды и использовали для трансформации (через электропорацию) штамма Z387.

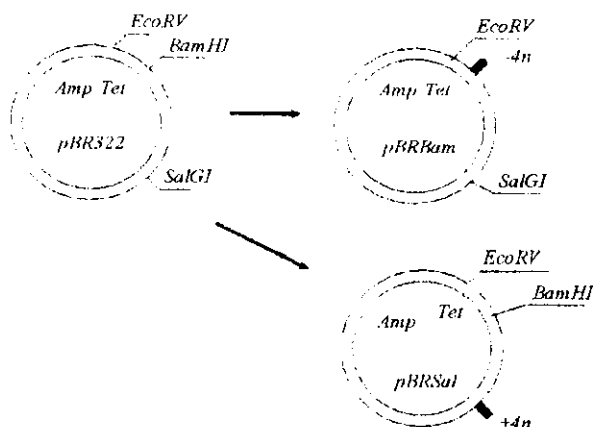


Рис. 1. Субстраты для бесклеточной рекомбинационной системы. Схема эксперимента: 1) инкубация плазмид с клеточным экстрактом; 2) выделение ДНК из реакционной смеси; 3) трансформация клеток *E. coli* Z387 *rec*⁻; 4) выращивание бактерий на селективной среде; 5) выделение и рестрикционный анализ плазмидной ДНК из рекомбинантов

Общее число трансформированных бактериальных клеток определяли по числу ампициллин-резистентных клеток (колоний), а частоту рекомбинации — как отношение *tet*-резистентных рекомбинантов к числу ампициллин-резистентных трансформантов.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 показано время появления индуцируемой рекомбинационной активности у штаммов Pr-2 и SVW1 на споруляционной среде.

Хотя оба штамма обладают 100 %-й споруляционной способностью, однако время индукции активности разное. Очевидно, для рекомбинации требуются некоторые функции, индуцируемые во время мейоза, и их наработка у этих штаммов разнится по времени в 2 раза. Авторы работы [13] показали, что у дрожжей *S. cerevisiae* на споруляционной среде пик активности появляется в интервале от 5 до 7 ч.

Проведенное нами сравнение рекомбиногенной активности митотических и мейотических клеток показало, что при мейозе активность возрастает в

пределах 5—100 раз. В процессе очистки рекомбиногенная активность экстрактов повышается и не зависит от АТФ и dNTP.

В таблице приведены данные по определению рекомбиногенной активности в процессе очистки дрожжевого экстракта. В контрольных образцах, где экстракта не добавляли, частота рекомбинации соответствовала $(1-2) \cdot 10^{-8}$.

Данные проведенных экспериментов показывают, что рекомбиногенная активность из дрожжевых экстрактов в процессе очистки вызывает рекомбинацию двух мутантных плазмид. Более того, эта активность в процессе очистки экстрактов из митотических и мейотических клеток возрастает на 2 и 3 порядка соответственно.

Учитывая, что рекомбинационная активность состоит из многих компонентов, участвующих в сложном процессе рекомбинации, и сохраняется при очистке можно предположить, что это должен быть какой-то высокомолекулярный комплекс.

Молекулярную массу этого комплекса определяли дважды на колонке с Sephacryl S-300 ($75 \times$

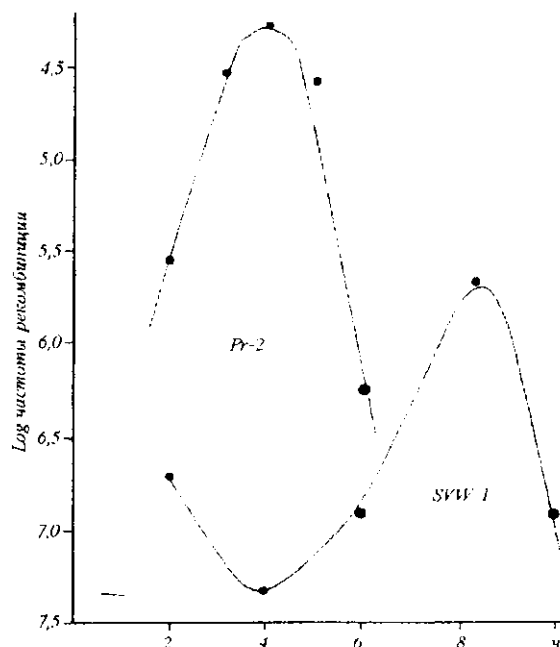


Рис. 2. Рекомбинационная активность экстрактов после перенесения клеток на споруляционную среду. Каждая точка соответствует 10 мкг экстрактивного белка в инкубационной смеси. Реакцию проводили в течение 90 мин при 30 °С

Очистка рекомбинантной активности из экстрактов митотических и мейотических клеток дрожжей

Стадия очистки, клетки	Белок, мг	Удельная активность, рекомбинанты/мг белка	Степень очистки
Фракция 1			
мейотические	230	$1,3 \cdot 10^2$	—
митотические	120	$0,37 \cdot 10^2$	—
Фракция 2			
мейотические	23	$6,9 \cdot 10^3$	53
митотические	6,8	$7,0 \cdot 10^3$	189
Фракция 3			
мейотические	5,9	$4,8 \cdot 10^4$	369
митотические	0,68	$1,3 \cdot 10^4$	351
Фракция 4			
мейотические	1,0	$3,2 \cdot 10^5$	2461
митотические	0,36	$8,3 \cdot 10^4$	2243

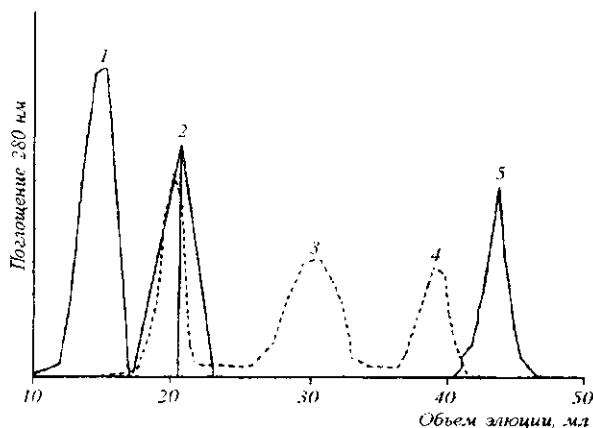


Рис. 3. Определение молекулярной массы рекомбинационного комплекса из дрожжей *S. cerevisiae*. Маркерные белки взяты из набора для калибрования высокомолекулярных белков гель-фильтрацией фирмы «Pharmacia» (Швеция): 1 — тироглобулин; 2 — ферритин; 3 — БСА; 4 — рибонуклеаза; 5 — цитохром С

× 0,48 см) в буфере (трис-НСl, рН 7,5 с 0,1 М NaCl) после предварительной очистки (фракция 2).

На рис. 3 показан выход (в мл) белкового пика из дрожжевого экстракта *S. cerevisiae* в процессе элюции с колонки Sephacryl S-300 в сравнении с объемами белковых маркеров.

Ферритин с молекулярной массой 440 кДа элюируется во фракции, соответствующей объему элюции 20,5 мл; исследуемый белковый пик из дрожжевого экстракта с высокой рекомбинантной активностью обнаружен во фракциях, соответствующих объему 20,5—21 мл. На основании этих результатов можно предположить, что в рекомбинационном процессе у дрожжей *S. cerevisiae* участвует сложный высокомолекулярный комплекс с молекулярной массой 440—450 кДа.

Исследуемая рекомбинантная активность из дрожжевых экстрактов *S. cerevisiae* по своим свойствам аналогична АТР-независимой рекомбинантной активности, описанной другими авторами в клетках дрожжей [7, 8] и млекопитающих [9, 10].

Рекомбинантная активность из дрожжевых экстрактов отличается в процессе очистки от активности экстрактов из клеток человека [15].

Автор благодарит А. Т. Ахмедова, М. Л. Беккера, С. М. Нарыжного и Е. А. Намсараева за обсуждение результатов.

В. С. Смоліна

Рекомбінаційний комплекс з дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у процесі очистки

Резюме

Показано, що рекомбінаційна активність між гомологічними плазмідами, які несуть різні мутантні алелі *tet*-гена, зберігається в процесі чотирьохступеневої очистки екстрактів з мітотичних і мейотичних клітин дріжджів *S. cerevisiae*. Реакція вимагає присутності іонів Mg^{2+} та не залежить від наявності АТФ і dNTP. Молекулярна маса рекомбінаційного комплексу складає 440–450 кДа.

V. S. Smolina

The recombination complex from the yeast of *Saccharomyces cerevisiae* in purification procedure

Summary

The purification procedure of the extracts from the yeast mitotic and meiotic *S. cerevisiae* and the recombination activity between homologous plasmids containing different mutant alleles of the *tet*-gene has been described. The reaction of recombination required Mg^{2+} and was ATP and dNTP-independent. The molecular weight of recombinant complex was 440–450 kDa.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Redding C. M. The mechanism of conversion deletions and insertions // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1978.—43.—P. 1315–1316.
2. Redding C. M. Recombination on activities of *E. coli* RecA protein // Cell.—1981.—25.—P. 3–10.
3. Redding C. M. Homologous pairing and strand exchange in genetic recombination // Annu. Rev. Genet.—1982.—16.—P. 405–437.
4. Formosa T. A., Alberts B. M. DNA-synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 protein // Cell.—1988.—47.—P. 793–808.
5. Kmiec E. B., Holloman M. K. Homologous pairing of DNA molecules promoted by a protein from *Ustilago* // Ibid.—1982.—29.—P. 367–374.
6. Kmiec E. B., Holloman W. K. Synapsis promoted by *Ustilago* rec1 protein // Ibid.—1984.—36.—P. 593–598.
7. Kolodner R., Evans D. H., Morrison P. T. Purification and characterization of an activity from *Sacch. cerevisiae* that catalyzes homologous pairing and strand exchange // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 16.—P. 5580–5584.
8. Sugino A., Nitiss J., Resnick M. A. ATP-independent DNA strand transfer catalyzed by protein (s) from meiotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Ibid.—1988.—85.—P. 3883–3887.
9. Hsieh P., Meyn M. S., Camerini-Otero R. D. Partial purification and characterization of a recombinase from human cells // Cell.—1986.—44.—P. 885–894.
10. Ахмедов А. Т., Намсараев Е. А., Зайцева Е. М. и др. Изучение рекомбинационной активности в экстрактах клеток млекопитающих // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 2.—С. 38–45.
11. Symington L. S., Fogarty L. M., Kolodner R. Genetic recombination of homologous plasmids catalyzed by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae* // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 805–813.
12. Symington L. S. Plasmid recombination intermediates generated in a *Saccharomyces cerevisiae* cell-free recombination system // Mol. and Cell. Biol.—1985.—5.—P. 2361–2368.
13. Hotta Y., Tabata S., Rouchard R. A. et al. General recombination mechanism in extracts of meiotic cells // Chromosoma.—1985.—93.—P. 140–151.
14. Kucherlapati R. S., Spencer I., Moore P. D. Homologous recombination catalyzed by human cell extracts // Mol. and Cell. Biol.—1985.—5, N 4.—P. 714–720.
15. Ganee D. P., Moore I. Ch., Kucherlapati R. Characterization of an ATP-dependent strand transferase from human cells // Ibid.—1987.—7.—P. 3124–3130.

УДК 577.15

Поступила в редакцию 13.01.97