

ШАЛГУЕВ

Валерий Иванович

**ГОМОЛОГИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У ЭУКАРИОТ:
ОСОБЕННОСТИ ГОМОЛОГИЧЕСКИХ ДНК-ТРАНСФЕРАЗ**

***RAD51* ИЗ ДРОЖЖЕЙ *Pichia angusta*
И ВОДОРОСЛЕЙ *Chlamydomonas reinhardtii***

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2006

**Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики
Петербургского института ядерной физики им. Б.П.Константинова РАН.**

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор **Владислав Александрович Ланцов**
Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П.Константинова РАН.

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор **Николай Викторович Томилин**
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук,
профессор **Андрей Петрович Перевозчиков**
ГУ НИИ Институт экспериментальной
медицины РАМН, Санкт-Петербург

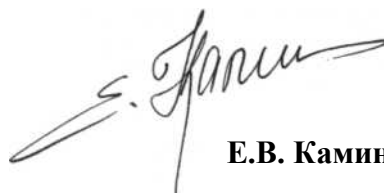
Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный
университет

Защита состоится “ ” декабря 2006 г. в “ ” часов на заседании Диссертационного
совета Д. 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан “ ” ноября 2006 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
Кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рекомбинация ДНК – один из фундаментальных процессов, происходящих в живой клетке. К настоящему времени наиболее детально исследована гомологическая рекомбинация (ГР) у прокариот. Основой процесса ГР у прокариот является способность белка RecA катализировать клеточную реакцию синапсиса и обмена нитей ДНК. Белок RecA играет центральную роль в гомологической рекомбинации и участвует в процессах: рекомбинационной репарации, репликации, мутагенеза, клеточного деления, регуляции экспрессии многих репарационных генов и индукции SOS-ответа клетки у бактерий [1-3].

Структурные и функциональные аналоги белка RecA обнаружены во всех организмах: от бактерий до эукариот, включая человека [4, 5]. Хотя многие принципиальные механизмы являются общими у прокариот и эукариот, ГР у высших организмов отличается наибольшей сложностью. Поэтому поиск аналогов белка RecA и исследование механизма ГР у эукариот является актуальной задачей молекулярной биологии.

Дрожжи *Pichia angusta* – один из видов таксономического комплекса мезофильных дрожжей *Hansenula polymorpha* – являются интересным объектом, привлекающим внимание в качестве продуцентов для получения рекомбинантных белков. Уникальность дрожжей *P. angusta* состоит в их термотолерантности, т.е. в способности расти при высоких температурах вплоть до 50 °С. Сравнение генома *P. angusta* с геномом *Saccharomyces cerevisiae* показало, что среди 2500 идентифицированных генов *P. angusta* 94% обладают гомологией с *S. cerevisiae*, тогда как 6% не обладают гомологией. До настоящего времени в литературе не было сообщений об обнаружении в геноме *P. angusta* генов, ответственных за гомологическую рекомбинацию и рекомбинационную репарацию.

В настоящей работе клонирован ген *RAD51* из термотолерантного штамма *P. angusta*, и приведены основные рекомбинационные характеристики белка Rad51_{Pa}, кодируемого этим геном. Белок Rad51_{Pa} является ДНК-зависимой АТФазой и проявляет типичные свойства семейства белков Rad51. В контексте белковой термостабильности биохимические и рекомбинационные свойства белка Rad51_{Pa} сравнивали с Rad51_{Sc} [6].

Вторым модельным объектом биохимических исследований была одноклеточная зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. К моменту начала наших исследований ее система гомологической рекомбинации (ГР), лежащая в основе рекомбинационной репарации двунитевых разрывов ДНК, была очень слабо изучена. В последние годы реализуется программа секвенирования ядерного генома *C. reinhardtii*. В

геноме были выявлены разнообразные нуклеотидные повторы. И было получено объяснение низкого уровня ядерной ГР относительно негомологичной рекомбинации. Анализ геномной и EST библиотек (EST - маркеры экспрессированных последовательностей) у микроводорослей *C. reinhardtii* позволил клонировать последовательность кДНК гена *RAD51C*. В настоящей работе ген *RAD51C* был экспрессирован, выделен и очищен его продукт. Были также изучены основные рекомбинационные и биохимические активности белка Rad51C_{Cr} [7].

Цели и задачи исследования

Целями данной работы являлось демонстрация и анализ основ термотолерантности дрожжевого белка Rad51 из *P. angusta* и выявление рекомбинационных активностей белка Rad51C из микроводорослей *C. reinhardtii*.

Для достижения этих целей были решены следующие задачи:

1. Клонирован ген *RAD51* из термотолерантных дрожжей *P. angusta*.
2. Выделен белок Rad51_{Pa}.
3. Исследованы рекомбинационные и термодинамические характеристики белков Rad51 из дрожжей *P. angusta* Rad51_{Sc} и *S. cerevisiae*.
4. Выделен белок Rad51C-His₆ и Rad51C из *C. reinhardtii*.
5. Исследованы рекомбинационные характеристики белка Rad51C-His₆.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белок Rad51_{Pa} обладает основными биохимическими активностями, необходимыми для образования рекомбинационного пресинаптического комплекса.
2. При температуре 40–42°C (оптимальной для роста клетки-хозяина) по сравнению контролем при 37°C изменяются три характеристики пресинаптического комплекса, образуемого белком Rad51_{Pa}, АТФ и онДНК:
 - уменьшается время образования комплекса [Rad51_{Pa}::онДНК:: АТФ];
 - уменьшается энергия активации АТФазной активности комплекса [Rad51_{Pa}::онДНК];
 - появляется способность пресинаптического комплекса [Rad51_{Pa}::онДНК:: АТФ] катализировать реакцию обмена протяженных молекул ДНК.
3. Белок Rad51C_{Cr} обладает следующими биохимическими активностями, необходимыми для образования рекомбинационного пресинаптического комплекса у водорослей *C. reinhardtii*:
 - ДНК-зависимая АТФазная активность;
 - способность к образованию нуклеопротеинового филамента на он- и днДНК;
 - ДНК-трансферазная активность.

Научная новизна

Впервые клонирован ген *RAD51* из метилотрофных термотолерантных дрожжей *Pichia angusta*, способных к выживанию при температуре 50°C.

Впервые показано, что белок Rad51 из *P. angusta* обладает термозависимыми характеристиками. При температуре выше оптимальной для роста клетки-хозяина (~40°C) по сравнению с 37°C: (1) уменьшается время образования и энергия активации АТФазной активности комплекса белка Rad51 и онДНК; (2) появляется способность комплекса катализировать ключевую реакцию ГР -реакцию обмена протяженных молекул ДНК.

Впервые показано, что белок Rad51С из водорослей *C. reinhardtii* способен: (1) образовывать нуклеопротеиновый филамент на онДНК; (2) катализировать реакцию замещения и обмена нитей ДНК.

Впервые получены доказательства консервативности функций белков семейства Rad51 из разных царств эукариот на примере термотолерантных дрожжей *P. angusta* и водорослей *C. reinhardtii*.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты работы показывают сходство механизма ГР у низших и высших эукариот. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов гомологической рекомбинации у различных эукариотических организмов. Теоретические результаты работы могут быть использованы в учебных спецкурсах по молекулярной биологии, читаемых на биолого-медицинских факультетах высших учебных заведений.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на ежегодных конференциях молодых ученых Петербургского института ядерной физики (Гатчина, 2000-2005); VIII, IX и X Международных школах-конференциях молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2004, 2005, 2006 г.); Международной конференции “Chlamy 2004” Abstracts of 11th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Kobe, Japan, 2004 г.), Политехническом Симпозиуме “Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона” (Санкт-Петербург, Россия, 2004 г.), Международной конференции “The N.W. Timofeeff-Ressovsky conference” (Ереван, Армения, 2005 г.), Международной конференции “Chlamy 2006” Abstracts of 12th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas (Portland, Oregon, USA, 2006).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 странице машинописного текста и состоит из введения, глав “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, двух глав результатов исследования, главы “Обсуждение”, выводов и списка цитируемой литературы. Иллюстрационный материал представлен 55 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные и дрожжевые штаммы. Термотолерантный дрожжевой штамм *P. angusta* Y1397 получен из Российской коллекции микроорганизмов. Для исследования функциональной компенсации дефекта гена *RAD51* использовали следующие дрожжевые штаммы. Дрожжевой диплоидный штамм D4004 *S. cerevisiae* (*MATa/MAT α ade2 Δ -248/ade2 Δ -248 leu2-3,112/ leu2-3,112 ura3-160,288/ura3-160,288 trp1/trp1 RAD51/RAD51*) и производный от него штамм *rad51-1*, D3164 (*MATa/MAT α ade2 Δ -248/ade2 Δ -248 leu2-3,112/ leu2-3,112 ura3-160,288/ura3-160,288 trp1/trp1 rad51-1/rad51-1*). Бактериальный штамм DH5 α использовали для выделения и трансформации плазмидной ДНК. Для производства рекомбинантных белков использовали бактериальный штамм BL21 (DE3): *F' ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) dcm gal Δ recA₃₀₆*.

Клонирование и секвенирование гена *RAD51* из *P. angusta*. Геномную ДНК выделяли из термофильных дрожжей *P. angusta* штамма ВКМ Y1397. Геномную библиотеку этих дрожжей конструировали по рестриктазам *XhoI* и *BamHI* на базе плазмиды pUC19. Для клонирования полноразмерного гена *RAD51* создали библиотеку кДНК этих дрожжей в векторной системе Uni-ZAP XR. Путем скрининга выявили клон, содержащий открытую рамку считывания длиной 1107 н, соответствующий гену *RAD51* из *P. angusta* (код доступа DDBJ/EMBL/GenBank-AY307358). Нуклеотидную последовательность определяли с помощью секвенирования дидезокситерминирующим методом с ДНК-полимеразой T7.

Выделение белка Rad51 из *P. angusta*. Кодировующую последовательность гена *RAD51* из *P. angusta* клонировали в экспрессионный вектор pET21b. Белок Rad51_{pa} выделяли из экстракта клеток BL21(DE3), содержащих плазмиду pET-PaRad51 с геном *RAD51*, осаждали полимином Р и последовательно очищали на колонках с фосфоцеллюлозой P11, гидроксипатитом, Cibacron Blue и Hi-Trap Q.

Выделение белка Rad51_{Cr} и Rad51_{Cr}-His₆ из *C. reinhardtii*. Анализ баз данных EST-последовательностей кДНК микроводоросли *C. reinhardtii* выявил две последовательности (AV629583 и BG848251), кодирующие белок сходный с белком Rad51C из *Arabidopsis*. Используя праймеры специфичные к AV629583 и BG848251, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицировали ген *RAD51C* из *C. reinhardtii*. Была обнаружена

открытая рамка считывания, соответствующая белку Rad51C (код доступа DDBJ/EMBL/GenBank-AY058913). Ген *RAD51C* переклонировали в вектор pET21b для экспрессии белка Rad51C_{Ct} и Rad51C_{Ct}-His₆ (содержащий полигистидиновый (6 aa) тракт на С-конце белка) в клетках *E. coli* BL21(DE3) ДгесА. Белок Rad51C_{Ct} выделяли из телец включения с использованием хроматографической очистки на колонке MonoQ. Белок Rad51C_{Ct}-His₆ выделяли с помощью ряда последовательных хроматографических стадий на колонках с Ni-NTA-агарозой, гидроксапатитом, DEAE-сефарозой и Ni-Трап Q.

Анализ кинетических параметров реакции гидролиза АТФ. Гидролиз АТФ, катализируемый белками Rad51 и RecA, измеряли с помощью спектрофотометрического теста, в котором уровень образования АДФ сопряжен с окислением NADH в NAD⁺. Таким образом, уменьшение в поглощении света с $\lambda_{340\text{nm}}$ оказывается прямо пропорциональным гидролизу АТФ. Окисление NADH определяли с использованием коэффициента экстинкции $\epsilon_{340} = 6.22 \times 10^{-3} \text{ (M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$. Реакцию проводили при 37°C в стандартном буфере TMD (50 mM Трис-НСl (рН 8.0), 10mM MgCl₂, 1mM дитиотрейтол, 1mM АТР, 100mM NaCl, 3 mM Фосфоенолпируват, 30 U/мл Пируват киназа, 30 U/мл Лактат дегидрогеназа, 200 мкМ NADH) и указанные количества ДНК-субстратов и белка Rad51. Спонтанный и ДНК-независимый гидролиз АТФ учитывали как фоновый. Кинетические параметры реакции, катализируемой ферментом, константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы скоростей ферментативного гидролиза каждого из субстратов (k_{cat}), определяли с помощью нелинейного регрессионного анализа уравнений Михаэлиса-Ментен. Для расчетов использовали компьютерную программу Origin 6.0.

Реакция переноса нити с ДНК-олигонуклеотидным субстратом. Реакционную смесь (40 мкл), содержащую буфер А (33 mM Tris-acetate, 2 mM Mg-acetate, 66 mM K-acetate (рН 7.9), 1 mM АТР), 18 мкМ олигонуклеотида #1, меченного [³²P] (5' – gtt gca tga agt agc tga aga ata att agt tct ttc ggg ttg aaa ata ata ata aat aaa gtc ttt ata tat gag tat gta tat cat cga tga att cga gc) и 1 мкМ белка RecAЕс или 6 мкМ белка Rad51C_{Ct}-His₆ инкубировали 10 мин при 37°C. Реакцию переноса нити ДНК инициировали добавлением 36 мкМ днДНК-субстрата. ДнДНК-субстрат приготовлен отжигом олигонуклеотидов #1 и #2 (5' – gct cga att cat cga tga tat aca tac tca tat ata aag act tta ttt att att att ttc aac ccg aaa gaa cta att att ctt cag cta ctt cat gca ac). В качестве гетерологического контроля использовали олигонуклеотид #3 (5' - tgc agc gta cga agc ttc agc acc taa ttg aca ccg tac tac ttt aat tag acc cag aga ccg aga gag aga ggg aga ggg aga ggg aga ggg aga ggg ag). Реакцию останавливали добавлением 2 мкл буфера S (150 mM Трис-НСl (рН 7.5), 200 mM ЭДТА, 5% SDS; 5% глицерина; 0.05% бромфенола синего; 0.05% ксиленцианола). Продукты реакции разделяли электрофорезом в ПААГ (12%) в

буфере ТВЕ. Гели высушивали и анализировали после экспозиции на рентгеновской пленке.

Реакция замещения нити с флуоресцентной ДНК. Реакцию замещения нити ДНК, катализируемую белком Rad51, проводили следующим образом. ДнДНК длиной 28 нп (флуорогенный зонд) была с двойной меткой. 5'-конец одной из ее нитей был помечен флуоресцеином #20 (5'-FAM - aaa cta ata aga ttt aca aca att tct c - 3'-PO₄); а 3'-конец комплементарной нити содержал дапсил #21 (3'-DABCYL - ttt gat tat tct aaa tgt tgt taa aga g - 5'). Гибридизационная проба днДНК была образована отжигом олигонуклеотидов #20 и #21. ОнДНК-мишень #22 содержала последовательность 5'- aaa cta ata aga ttt aca aca att tct caa act aat aag att tac aac aat ttc tca aac taa taa gat tta caa caa ttt ctc. В качестве гетерологичного контроля использовали негомологичный олигонуклеотид 84н. Перекрытие между спектром испускания флуоресцеина и спектром поглощения дапсила приводило к гашению флуоресценции. В стандартной реакции (125 мкл) белок ResA_{Ec} (3 мкМ) или Rad51_{Pa} (3 мкМ) и онДНК (10 мкМ) инкубировали в буфере Y (20 мМ Tris-HCl (pH 7.5); 2 мМ MgCl₂; 20 мМ NaCl; 1 мМ АТР) и с АТФ-регенерирующей системой (3 мМ фосфоенолпируват и 30 U/мл пируват киназы) в течение 3 минут при 37°C. Затем добавляли MgCl₂ (до конечной концентрации 12 мМ) и днДНК пробу (3 мкМ). Изменение флуоресценции реакционной смеси анализировали с помощью спектрофлюориметра Hitachi F-4000 (Hitachi, Япония) с длиной волны поглощения и испускания: 490 и 520 нм соответственно. Спектр испускания записывался автоматически в корректирующей моде с вычитанием спектра буфера. Спектр поглощения и испускания регистрировали при оптической ширине 10 и 5 нм соответственно.

Реакция переноса нити ДНК с субстратом на основе фага φX174. В стандартной реакции, 20 мкМ белка Rad51_{Pa} и 60 мкМ (+)φX174 онДНК инкубировали в буфере TMD (25 мМ Tris-HCl (pH 7.5); 10 мМ MgCl₂; 1 мМ DTT; 2 мМ АТР; 4 мМ PEP; 30 U/мл РК) в течение 5 минут при указанной температуре. Добавляли 6 мкМ белка SSB или 3 мкМ RPA и после инкубации в течение 7 минут, добавляли 60 мкМ днДНК φX174 (линеаризованную обработкой эндонуклеазой рестрикции *Pst*I). Финальный объем смеси составлял 40 мкл. По истечении 120 минут, реакцию останавливали добавлением 2 мкл буфера STOP (150 мМ Tris-HCl (7.5), 200 мМ EDTA, 5% SDS и 20 мг/мл протеиназы К) и инкубацией реакционной смеси при 37°C в течение 30 минут. Продукты реакции разделяли электрофорезом в агарозном геле (1%) в буфере TAE в течение 12 часов при 1 В/см и анализировали после окрашивания бромистым этидием. Реакцию переноса нити ДНК с белком Rad51_{Sc} проводили следующим образом. 20 мкМ белка Rad51_{Sc} инкубировали с 60 мкМ онДНК (+)φX174 в буфере MMD (40 мМ K-Mes (pH 6.5); 2.5 мМ

MgCl₂; 1 мМ DTT; 2мМ АТФ; 60 мМ КСl) в течение 5 минут при указанной температуре, добавляли 6 мкМ белка SSB и продолжали инкубацию 7 минут. Далее добавляли 5 мМ спермидина (конечная концентрация) и 60 мкМ днДНК фХ174, линеаризованную рестриктазой *PstI* и продолжали инкубацию в течение 120 минут. Анализировали реакцию переноса нити ДНК аналогично тому, как это было сделано для белка Rad51_{ра}. Реакцию переноса нити с белком RecA_{Ес} проводили аналогичным образом.

Визуализация белка Rad51_{ра} методом иммуноблотинга. Иммунизацию курицы проводили препаратом белка Rad51_{ра}. Доза антигена составляла 550 мкг на курс иммунизации. Вторичное введение антигена проводили на 15-й день. Очистку и выделение поликлональных антител из куринных яиц проводили с помощью хроматографии на колонке DEAE. Элетрофорез белков проводили в 10% ПААГ. Электроперенос осуществляли на нитроцеллюлозные мембраны (Schleicher and Schuль) с помощью аппарата 2051 MIDGET MULTIBLOT (LKB). Первичные антитела визуализировали с помощью вторичных, сцепленных с пероксидазой хрена. Затем их окрашивали диаминобензидином и фотографировали. Негативы сканировали на лазерном денситометре, и определяли количество белков в пробе.

Функциональная компенсация дефекта гена *RAD51* в *S. cerevisiae*. О способности компенсировать дефект гена *RAD51* в дрожжах *S. cerevisiae* судили, сравнивая чувствительность клеток трансформантов, несущих ген *RAD51*, к действию γ -облучения. Ген *RAD51* субклонировали в дрожжевой вектор pYES2 под промотор *GAL1*. Плазмидами pYES2-PaRad51 и pYES2 (с геном *RAD51* и без него) трансформировали диплоидный штамм *S. cerevisiae*, несущий мутацию в гене *RAD51*. Перед облучением клетки выращивали до стационарной фазы роста на селективной среде с неферментируемым источником углерода (2% рафиноза или 3% лактоза). После γ -облучения разными дозами, клеточные суспензии высевали на среду YEP-лактат. В качестве индуктора промотора *GAL1* использовали галактозу (0.2%). Клетки инкубировали при 30°C в течение 3-4 дней перед подсчетом числа колоний. Определение радиочувствительности культур клеток к γ -облучению ⁶⁰Со проводили на установке “Исследователь” с мощностью дозы 33.7 Грей/мин.

Статистическая обработка результатов. Анализ проводили методом наименьших квадратов с использованием коэффициента Стьюдента для заданной достоверности $\alpha=0.9$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование рекомбинационных и термодинамических характеристик белков Rad51 из дрожжей *P. angusta* и *S. cerevisiae*

1.1 Клонирование и первичная структура гена *RAD51 P. angusta*

Для клонирования гена были выбраны консервативные области, содержащие мотивы Волкера А и В. С помощью ПЦР с вырожденными праймерами, фрагмент гена *RAD51* был амплифицирован. В качестве матрицы ПЦР использовали геномную ДНК термотолерантных дрожжей *P. angusta*. Этот фрагмент клонировали в плазмиду pUC19 по сайтам рестрикции *EcoRI* и секвенировали.

Для клонирования полноразмерного гена *RAD51* была создана библиотека кДНК этих дрожжей. Скрининг библиотеки провели зондом, который получили из фрагмента гена *RAD51* (552 нп), кодирующего N-конец белка. В результате выявили клон, содержащий открытую рамку считывания длиной 1107 нп, что соответствовало белку в 369 аа. Аминокислотная последовательность белка Rad51_{pa} оказалась гомологичной белку RecA (26% идентичных аминокислот) и дрожжевому белку Rad51_{sc} (71% идентичных аминокислот). Нуклеотидную последовательность гена *RAD51* термотолерантных дрожжей *P. angusta* депонировали в базу данных DDBJ/EMBL/GenBank с кодом доступа AY307358.

1.2 Гидролиз АТФ, катализируемый белком Rad51_{pa}

Существует прямое соответствие между гидролизом АТФ и связыванием белка RecA с ДНК. Поэтому скорость гидролиза АТФ позволяет проводить прямой мониторинг образования нуклеопротеинового филамента RecA на ДНК. Ферментативные активности белков Rad51 анализировали по способности катализировать ДНК-зависимый гидролиз АТФ.

В присутствии поли(dT) белки Rad51_{pa} и Rad51_{sc} проявляли линейную скорость гидролиза АТФ. Гидролиз АТФ абсолютно зависел от наличия в реакционной смеси ионов Mg⁺² и ДНК. При температуре 37°C белок Rad51_{pa} катализировал гидролиз АТФ с постоянной скоростью в течение 2 часов. При увеличении температуры до 47°C линейная скорость гидролиза АТФ сохранялась без изменений в течение 20 минут, после чего скорость гидролиза снижалась до нуля вследствие инактивации белка. В наших экспериментах был определен гидролиз АТФ при 37°C с k_{cat} (число оборотов) $\sim 1.2 \text{ мин}^{-1}$ для белка Rad51_{pa}. Скорость гидролиза АТФ белком Rad51_{pa} оказалась сниженной в ~ 25 раз по сравнению с белком RecA_{ec}. Подобная низкая АТФазная активность характерна для большинства эукариотических гомологов RecA (Таблица 1). Интересно, что при

использовании онДНК (φX174) в условиях избытка белка относительно онДНК (6 нуклеотидов на мономер белка) наблюдалось изменение в энергии активации при температуре выше или ниже 40°C (18 и 13 ккал×моль⁻¹ соответственно).

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза АТФ.

ДНК-субстрат	T (°C)	поли(dT)	онДНК φX174	без ДНК
Rad51C _{Cr} -His ₆	37	0.16±0.05	0.10±0.03	0.04±0.02
Rad51C _{Cr}	34	0.10±0.03	0.10±0.02	0.03±0.02
Rad51C _{Hs} [8]	37	0.02	0.019	0.006
Rad51 _{Pa}	37	1.2±0.5	1.0±0.1	0.08±0.03
Rad51 _{Sc} [9]	37	0.5	0.4-0.44	0.044

Предполагается, что это связано с изменением константы Михаэлиса при росте температуры для этого ДНК-субстрата. Подобная бимодальность АТФазной активности была обнаружена у гомологичных белков RadA из *Pyrobaculum islandicum* [10] и RadA из *Desulfurococcus amylolyticus* [11, 12].

1.3 Сравнение термостабильности белков Rad51_{Pa} и Rad51_{Sc}

Термостабильность белков Rad51_{Pa} и Rad51_{Sc} сравнивали по их остаточной каталитической активности. Белки Rad51_{Pa} и Rad51_{Sc} (1 мг/мл) прогревали в отсутствие кофакторов в течение 10 минут и измеряли остаточную скорость поли(dT)-зависимого гидролиза АТФ до и после прогрева. Добавление онДНК и АТФ увеличивало время полуинактивации белка Rad51_{Pa} с 12 до 50 мин при температуре 47°C.

Можно предположить, что большая энергия инактивации Rad51_{Pa} является следствием большей термостабильности его активного центра по сравнению с белком Rad51_{Sc} (Таблица 2).

Таблица 2. Сравнение термодинамических параметров инактивации ДНК-зависимой гидролитической активности белков Rad51_{Pa} и Rad51_{Sc}

Термодинамический параметр	Rad51 _{Pa}	Rad51 _{Sc}
E _i (ккал×моль ⁻¹)	71.0±2.0	62.0±1.0
ΔH (ккал×моль ⁻¹)	70.4±2.0	61.0±2.0
ΔS (ккал×моль ⁻¹ ×K ⁻¹)	0.15±0.03	0.13±0.02
ΔG (ккал×моль ⁻¹)	25.0±2.0	21.0±2.0

Примечание: E_i- энергия инактивации, ΔH-изменение энтальпии, ΔS-изменение энтропии, ΔG – изменение свободной энергии.

Если при образовании активированного комплекса число вращательных и колебательных степеней свободы увеличивается, то $\Delta S > 0$. Известно, что, если в реакции происходит разрыв химических связей, то $\Delta H > 0$. Так как продукты диссоциации обладают большей степенью неупорядоченности, чем исходные вещества, то $\Delta S > 0$. Из (Таблица 2) видно, что изменение энтропии у белка Rad51_{Sc} несколько больше, чем у белка Rad51_{Pa}.

1.4 Термозависимость нуклеации

Связывание белка Rad51_{Pa} с ДНК в присутствии АТФ, регистрируемое по скорости его гидролиза, проходит две фазы: задержку нуклеации (лаг-период) и полную нуклеацию. Последняя выражается в постоянной скорости гидролиза АТФ. Протяженность лаг-фазы для онДНК была обратно пропорциональна температуре проведения реакции. Выше температуры 42°C происходил резкий переход от относительно замедленной лаг-фазы (6–8 мин) к быстрой нуклеации с лаг-фазой 1-2 мин, что означало более быстрое образование филамента при повышении температуры.

1.5 Рекомбинационный перенос онДНК, активируемый [Rad51_{Pa}::АТФ::онДНК]

Реакция переноса максимально эффективна при стехиометрии связывания белка Rad51_{Pa} в соотношении 1 мономер на 2 нуклеотида. Эту реакцию анализировали электрофоретически путем выявления промежуточного и конечного продуктов реакции. Это позволяло проследить переход нити ДНК, катализируемый белком Rad51_{Pa}, с двунитевой линеаризованной молекулы фага фХ174 на одонитевую замкнутую в кольцо молекулу ДНК того же фага. Реакция хорошо изучена и проходила в несколько этапов, важнейшими из которых являлось накопление промежуточного продукта – сцепленных молекул ДНК (JM) между ее кольцевой и линейной формой, и переход этого промежуточного продукта в конечный продукт (FP), каким является кольцевая онДНК фага с разрывом в переданной нити. Результаты рекомбинационной реакции обмена нити представлены в виде графика, показывающего соотношение промежуточных и конечных продуктов реакции. Как видно (Рис. 1), накопление промежуточных продуктов достаточно эффективно при 37°C и выше, тогда как завершение реакции (переход промежуточных продуктов в конечные), происходило эффективно лишь при температурах выше 40-42°C. Наблюдаемая рекомбинационная реакция была возможна вплоть до 53°C.

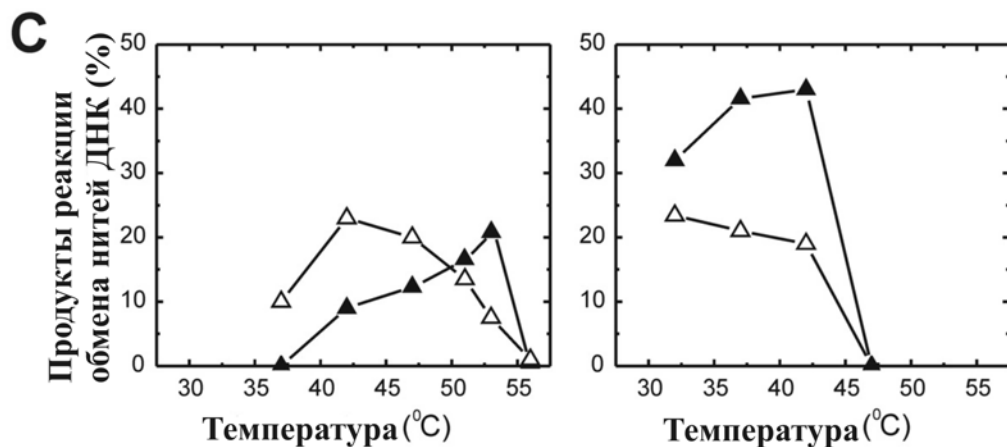
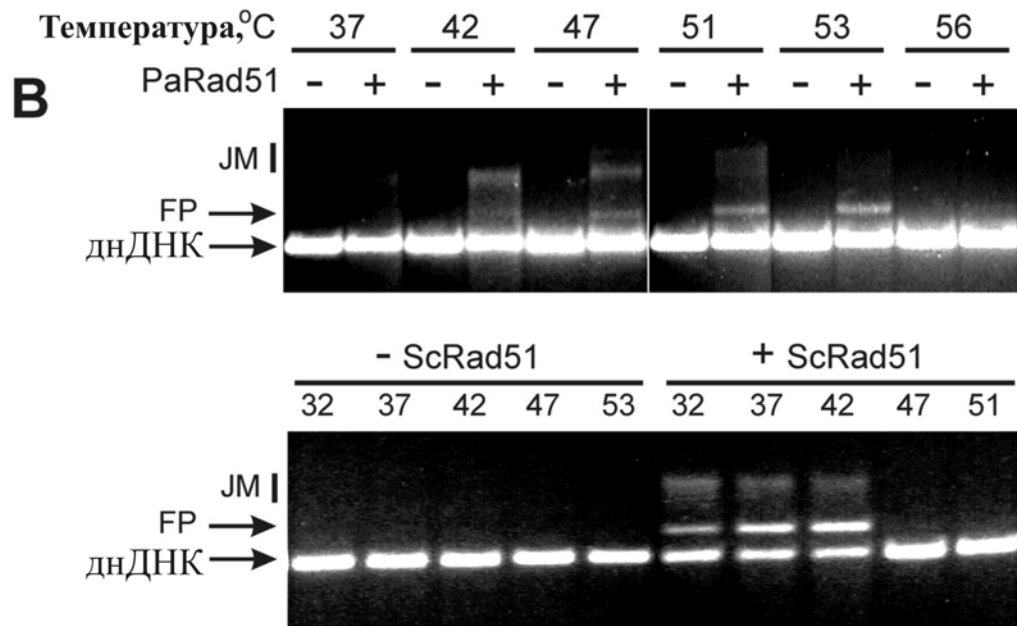
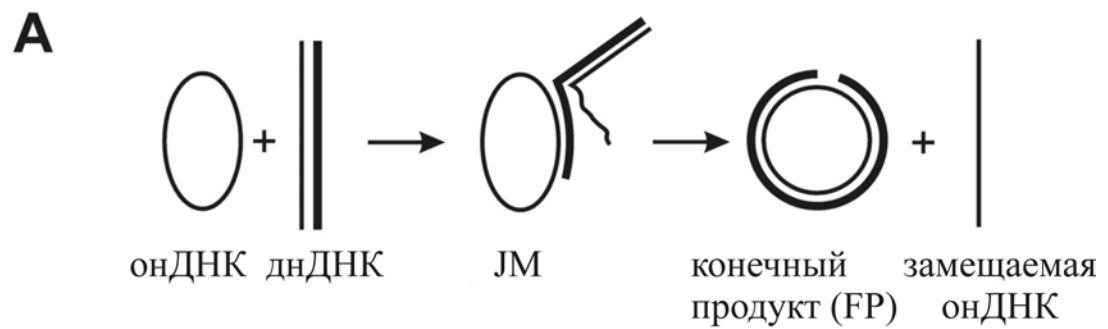


Рис. 1. Реакция переноса нити *in vitro*, катализируемая белками Rad51_{Pa} (PaRad51) или Rad51_{Sc} (ScRad51) зависит от температурных условий. (A) Схема реакции обмена нити ДНК между ϕ X174 онДНК (плюс нить) и репликативной формой линейной днДНК того же фага. (B) Тестирование реакции обмена нити ДНК в агарозном гель-электрофорезе. JM (joint molecules) – связанная молекула ДНК, промежуточный продукт реакции переноса нити; FP (final products) – финальные продукты переноса нити ДНК. (C) Графическое представление относительных количества JM и FP, определенных из теста (B) (см. Материалы и методы). Обозначения: белый треугольник, JM; черный треугольник, FP. Слева, Rad51_{Pa}; справа, Rad51_{Sc}.

1.6 Функциональная компенсация дефекта гена *RAD51* дрожжей *S. cerevisiae*

О способности гена компенсировать дефект гена *RAD51* в *S. cerevisiae* судили, сравнивая чувствительность клеток трансформантов, несущих ген *RAD51*, к действию γ -облучения. Из дозовой зависимости выживаемости дрожжевых штаммов в нашем эксперименте (Рис. 2) было выявлено значение ($LD_{37}=350$ Грей) для диплоидного штамма *S. cerevisiae* (дикий тип).

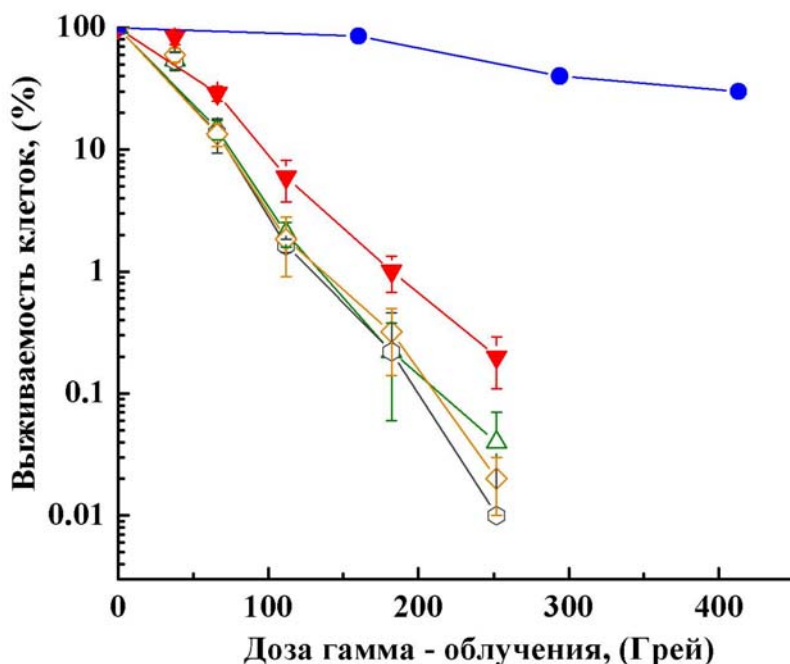


Рис. 2. Чувствительность клеток дрожжей *S. cerevisiae* к действию γ -излучения в жидкой среде. Обозначения: Диплоидный штамм (*rad51/rad51*), трансформированный плазмидой $pYES2::RAD51_{Pa}$, несущей ген *RAD51* из *P. angusta* под контролем регулируемого промотора *GALI*: на среде без индуктора (\triangleleft); на среде с индуктором (\blacktriangledown). Диплоидный штамм (*rad51/rad51*), трансформированный плазмидой $pYES2$: на среде без индуктора (\diamond); на среде с индуктором (\square). Диплоидный штамм дикого типа (*Wt 2n RAD+*) (\bullet). Стандартное отклонение (\pm) определялось из трех экспериментов.

Штаммы с делецией гена *RAD51* оказались более чувствительны к γ -облучению, чем дикий тип дрожжей *S. cerevisiae* ($ФИД=0.135$), а штамм, в котором экспрессировали белок $Rad51_{Pa}$ обладал повышенной выживаемостью ($ФИД=0.176$). Как видно, ген *RAD51* дрожжей из *P. angusta* функционировал в гетерологичных клетках *S. cerevisiae*, что проявлялось в частичной репарации γ -повреждений клеток, дефектных по гену *ScRAD51* и трансформированных плазмидой $pYES2-PaRad51$, продуцирующей синтез белка $Rad51_{Pa}$. Эти данные показывают, что хотя белки $Rad51_{Sc}$ и $Rad51_{Pa}$ гомологичны друг другу, *in vivo* белок $Rad51_{Pa}$ способен частично компенсировать функцию дрожжевого $Rad51_{Sc}$.

Эффект частичной компенсации выявил сложность ДНК репарационного механизма в дрожжах, где существенную роль играют взаимодействия Rad51 с другими белками рекомбинационного комплекса.

2. Изучение рекомбинационных свойств и кинетических параметров белка Rad51C из микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

2.1 Гидролиз АТФ, катализируемый белками Rad51C_{Cr} и Rad51C_{Cr}-His₆

Пресинаптический комплекс – это тройной комплекс [Rad51::АТФ::онДНК], который в присутствии ионов Mg⁺² обладает АТФазной и ДНК-трансферазной активностями. ОнДНК-зависимый гидролиз АТФ позволяет проследивать условия образования, стабильность и распад комплекса. Нами исследован ряд биохимических характеристик пресинаптического комплекса, образованного белком Rad51C_{Cr}-His₆.

Таблица 3. Термодинамические параметры гидролиза АТФ, катализируемого белками Rad51C_{Cr} и Rad51C_{Cr}-His₆

Термодинамический параметр	Rad51C _{Cr}	Rad51C _{Cr} -His ₆
E _A (ккал×моль ⁻¹)	11.2±1.0	10.5±1.0
ΔH(ккал×моль ⁻¹)	10.6±1.0	9.9±0.9
ΔS(ккал×моль ⁻¹ ×K ⁻¹)	-0.020±0.007	-0.030±0.008
ΔG(ккал×моль ⁻¹)	17.2±0.9	17.0±1.0

Примечание: E_A – энергия активации, ΔH – изменения энтальпии, ΔS – изменения энтропии, ΔG – изменения свободной энергии.

Производили сравнение термодинамических параметров гидролиза АТФ этих белков. С такой целью сняли зависимость скорости гидролиза АТФ от температуры, варьируя последнюю от 25 до 50°C. В интервале температур от 25 до 37°C АТФаза обоих белков подчинялась уравнению Аррениуса, что позволило рассчитать искомые термодинамические параметры (Таблица 3).

Сравнение представленных параметров показало, что наличие полигистидинового тракта не только не ухудшило термодинамических характеристик природного белка, но и позволило выделить белок в более активном состоянии. Последнее, возможно, объяснялось более простой схемой его экспрессии и выделения, не предусматривающей процедуру денатурации/ренатурации белка. Дальнейшие исследования мы проводили с белком Rad51C_{Cr}-His₆.

2.2 Реакции замещения и переноса нитей ДНК *in vitro*

Для исследования RecA- или Rad51C_G-зависимого обмена нити ДНК между 24 нп дуплексной ДНК и гомологичной 50 н был использован метод флуоресцентного гашения. В нашем тесте 5'-конец онДНК был помечен флуоресцеином, а комплементарный 3'-конец - дапсилем. Перекрытие между флуоресцентным спектром испускания флуоресцеина со спектром поглощения дапсила приводило к гашению флуоресценции в дуплексе.

Обмен нити ДНК приводил к усилению флуоресцентного сигнала при отделении донора от акцептора (Рис. 3).

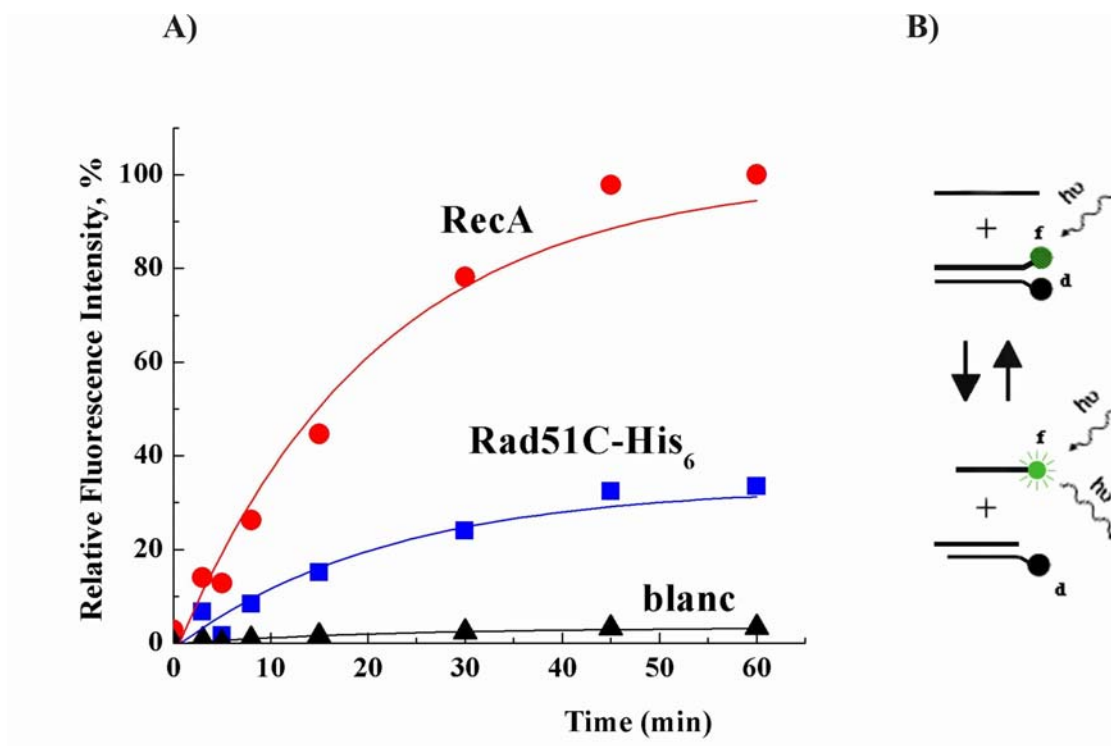


Рис. 3. Кинетика реакции замещения нити ДНК с использованием флуоресцентномеченных субстратов (см. Материалы и методы). А) Реакция замещения нити ДНК для белков RecA и Rad51C_G-His₆ в присутствии АТФ; В) схема реакции замещения нити ДНК.

Расхождение в эффективности переноса нити, катализируемой белком RecA, связано с тем, что реакцию проводили при низкой концентрации белка RecA и в отсутствие АТФ-регенерирующей системы. Известно, что при эквимольном соотношении нуклеопротеинового филамента RecA к дуплексу, образуется ~50% конечного продукта реакции переноса нити ДНК. Однако эффективность реакции переноса нити увеличивается, если соотношение дуплекс/онДНК превысит 1. Скорость реакции переноса нити ДНК белком Rad51C_G-His₆ того же порядка, как в реакции с белком RecA_{EC}. Низкая эффективность реакции переноса нити ДНК с использованием флуоресцентномеченных субстратов связана с избытком субстрата онДНК относительно белка в нашей реакции

(дуплекс/онДНК <1). Реакция переноса нити ДНК с радиоактивно меченным олигонуклеотидом. Результаты переноса нити (Рис. 4) регистрировали с помощью меченого ^{32}P олигонуклеотида. Как видно, перенос онДНК белком Rad51C_{Cr}-His₆ к 90 минуте по эффективности составлял лишь 30% от таковой у RecA, что было в согласии с результатами с флуоресцентной меткой. В последнем случае максимум переноса однострессового олигомера длиной в 170 нуклеотидных остатков белком RecA достигал к 120 мин и составлял 75% от исходной днДНК, тогда как белок Rad51C_{Cr}-His₆ переносил лишь 20% онДНК из флуоресцентномеченой днДНК.

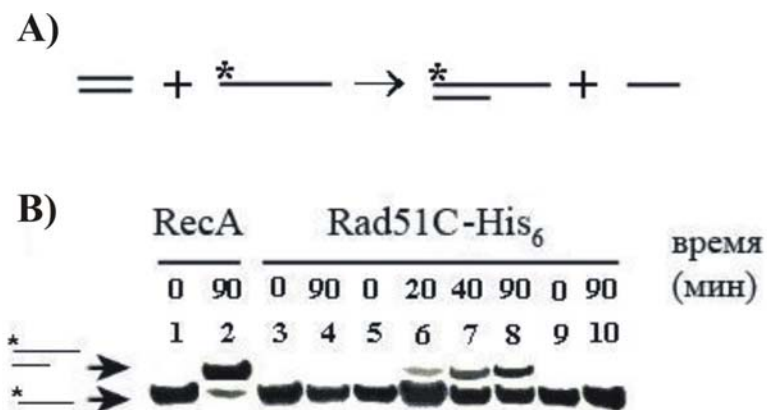


Рис. 4. Радиоавтограф электрофореграммы реакции переноса нитей ДНК. А) Схема тестирования ДНК-трансферазной активности с использованием радиоактивно меченого ДНК-субстрата. В) Кинетика реакции переноса нити ДНК с радиоактивно меченным субстратом. Дорожки 1, 2 - реакция с белком RecA в течение 0 и 90 минут, соответственно. Дорожки 3, 4 - контрольная реакция с белком Rad51C_{Cr}-His₆, когда в реакции отсутствует гомологичная днДНК в течение 0, 90 минут, соответственно. Дорожки 5, 6, 7, 8 - реакция с белком Rad51C_{Cr}-His₆ и гомологичными ДНК-субстратами в течение 0, 20, 40, и 90 минут, соответственно. Дорожки 9, 10 - контрольная реакция с белком Rad51C_{Cr}-His₆, когда в реакции присутствует гетерологичная, в течение 0, 90 минут, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Белок Rad51 из *P. angusta* обладает термозависимыми характеристиками ДНК-зависимого гидролиза АТФ. При температуре, оптимальной для роста термофильных дрожжей *P. angusta* (~40°C), изменяются три рекомбинационные характеристики его пресинаптического комплекса [Rad51_{Pa}:: АТФ::онДНК]:
 - уменьшается время образования комплекса;
 - уменьшается энергия активации АТФазной активности комплекса;
 - появляется способность комплекса катализировать обмен протяженных молекул ДНК.
2. Ген *RAD51* из дрожжей *P. angusta* способен частично компенсировать дефект гена *ScRAD51* в клетках *S. cerevisiae*.
3. Белок Rad51C из водорослей *C. reinhardtii* является гомологической ДНК-трансферазой и обладает основными рекомбинационными характеристиками подсемейства Rad51C семейства белков Rad51, включая:
 - ДНК-зависимую АТФазную активность;
 - АТФ-зависимую ДНК-трансферазную активность пресинаптического комплекса [Rad51C_{Cf}:: АТФ::онДНК].

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шалгуев В.И., Киль Ю.В., Юрченко Л. В. и Ланцов В. А. Термозависимость главного белка гомологической рекомбинации Rad51 у дрожжей *Hansenula polymorpha*. ДАН. 2002. Т.387. Стр. 328-330.
2. Shalguev V.I., Kil Y.V., Yurchenko L.V., Namsaraev E.A., Lanzov V.A. Rad51 Protein from the Thermotolerant Yeast *Pichia angusta* as a Typical but Thermodependent Member of the Rad51 Family. Eukaryot Cell. 2004. V. 3(6). P. 1567-1573.
3. Шалгуев В.И., Кабоев О.К., Сизова И.А., Hegemann P., Ланцов В.А.. Идентификация белка Rad51C из *Chlamydomonas reinhardtii*: рекомбинационные характеристики. Молекулярная биология. 2005. Т.39. №1. Стр. 112-119.
4. Шалгуев В.И., Киль Ю.В., Ланцов В. А. Гомологическая трансфераза RAD51 из термотолерантных дрожжей *Pichia angusta*// Тезисы докладов 8-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", – Пушкино. – 2004. – Стр.72.
5. Irina Sizova, Valery Shalguev, Oleg Kaboev, Peter Hegemann, Vladislav Lanzov. Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* homologous recombination system: biochemical activities of Rad51C protein // Abstracts of 11th International Conference on the Cell and

Molecular Biology of Chlamydomonas “Chlamy2004” Kobe, Japan, May 11-15, 2004.

6. **В. И. Шалгуев**, О. К. Кабоев, И. А. Сизова, В. А. Ланцов. Идентификация белка Rad51C из *Chlamydomonas reinhardtii*: рекомбинационные характеристики // Тезисы докладов 9-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", – Пущино. – 2005. – Стр.104.

7. **В. И. Шалгуев**, О. К. Кабоев, И. А. Сизова, П.Хегеманн, В. А. Ланцов. Идентификация белка Rad51C из *Chlamydomonas reinhardtii*: рекомбинационные характеристики // Тезисы Материалов семинаров Политехнического Симпозиума "Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона", – Санкт-Петербург. – 2005. – Стр. 48–49.

8. **V.I. Shalguiev**, O.K. Kaboev, I.A. Sizova, P. Hegemann and V.A. Lanzov. Paralogs of Rad51 protein family from *Chlamydomonas reinhardtii*: recombinational characteristics. Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution. The Second International Conference dedicated to the 105th anniversary of the birth of N. W. Timofeeff-Ressovsky and the 70th anniversary of the paper “On the Nature of Gene Mutations and Gene Structure” by N.W.Timofeeff-Ressovsky, K.G.Zimmer and M.Delbruck. Yerevan, September 8-11, 2005; p.90.

9. **Шалгуев В.И.**, Кабоев О.К., Сизова И.А., Хегеманн П., Ланцов В.А. Три паралога семейства рекомбинационных белков Rad51 у микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Тезисы докладов 10-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века", – Пущино. – 2005. – Стр.100.

10. Irina Sizova, **Valery Shalguiev**, Oleg Kaboev, Peter Hegemann and Vladislav Lanzov Identification and biochemical activities of *Chlamydomonas* homologous recombination proteins Rad51, Rad51B and Rad51C // Abstracts of 12th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. “Chlamy 2006”. Portland, Oregon, USA. May 9-14, 2006. P.78.

11. Kaboev O, Luchkina L, **Shalguiev V**, Andreichuk Y, Kulikov V, Kozarenko A, Lanzov V: Improved RecA-assisted fluorescence assay for DNA strand exchange reaction. *Biotechniques* 2006, 40(6):736-738.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bianco PR, Tracy RB, Kowalczykowski SC: DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Frontiers in Bioscience (online journal)* 1998, 3:560-603.
2. Roca AI, Cox MM: RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology* 1997, 56(129):129-223.

3. Yoshioka K, Yumoto-Yoshioka Y, Fleury F, Takahashi M: pH- and salt-dependent self-assembly of human Rad51 protein analyzed as fluorescence resonance energy transfer between labeled proteins. *J Biochem (Tokyo)* 2003, 133(5):593-597.
4. Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, Ushio N, Ikeo K, Ogawa T: Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet* 1993, 4(3):239-243.
5. Brendel V, Brocchieri L, Sandler SJ, Clark AJ, Karlin S: Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. *Journal of Molecular Evolution* 1997, 44(5):528-541.
6. Shalguev VI, Kil YV, Yurchenko LV, Namsaraev EA, Lanzov VA: Rad51 protein from the thermotolerant yeast *Pichia angusta* as a typical but thermodependent member of the Rad51 family. *Eukaryot Cell* 2004, 3(6):1567-1573.
7. Shalguev VI, Kaboev OK, Sizova IA, Hagemann P, Lanzov VA: Identification of *Chlamydomonas reinhardtii* Rad51C: Recombinational Characteristics. *Molecular Biology* 2005, 39(1):98-104.
8. Lio YC, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Chen DJ: Complex formation by the human Rad51B and Rad51C DNA repair proteins and their activities in vitro. *J Biol Chem* 2003, 278(4):2469-2478.
9. Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC: A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(12):7940-7945.
10. Spies M, Kil Y, Masui R, Kato R, Kujo C, Ohshima T, Kuramitsu S, Lanzov V: The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a DNA-dependent ATPase that exhibits two disparate catalytic modes, with a transition temperature at 75 degrees C. *Eur J Biochem* 2000, 267(4):1125-1137.
11. Kil YV, Glazunov EA, Lanzov VA: Characteristic thermodependence of the RadA recombinase from the hyperthermophilic archaeon *Desulfurococcus amylolyticus*. *J Bacteriol* 2005, 187(7):2555-2557.
12. Glazunov EA, Kil Y, Lantsov VA: Two types of temperature dependence of homologous recombinases in archaea: the properties of the *Desulfurococcus amylolyticus* recombinase. *Dokl Biol Sci* 2001, 379:389-392.

Отпечатано в типографии ПИЯФ РАН

188350, Гатчина, Ленинградской обл., Орлова роща

Зак. __, тир. ____, уч.-изд. _____ 2006 г.