

Байтин
Дмитрий Михайлович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ
БЕЛКА RecA

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2018

Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» - Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор **Георгий Борисович Смирнов** - «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России).

доктор медицинских наук, профессор **Виктор Вениаминович Тец** - заведующий кафедрой микробиологии вирусологии и иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени акад. И.П. Павлова

доктор физ.-мат.наук, профессор **Нина Анатольевна Касьяненко** кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров, Санкт-Петербургский Государственный Университет

Ведущая организация:

Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов" Федерального медико-биологического агентства России

Защита состоится «27» декабря 2018 года в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института: (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу <http://www.cytspb.rssi.ru>

Автореферат разослан « » 2018 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Белок RecA является ключевым компонентом гомологической рекомбинации всех микроорганизмов. Впервые ген *recA* у *Escherichia coli* был описан в 1965 году (Clark and Margulies, 1965). Было показано, что система рекомбинационной репарации напрямую зависима от целостности этого гена. С тех пор продукт этого гена – рекомбиназа А, является одним из наиболее интенсивно изучаемым белков у прокариот.

В зависимости от типа стрессового воздействия белок RecA участвует в нескольких системах защиты бактериальной клетки. Он вовлечен в конъюгационную рекомбинацию, процессы рекомбинационной репарации, мутагенеза, клеточного роста и деления, регуляции экспрессии многих репарационных генов и в других процессах жизнеобеспечения клетки (Ланцов, 2007; Galletto et al., 2007). Большое семейство RecA-подобных белков включает в себя белки RecA бактерий и RadA архей, Dmc1 и Rad51 эукариот (Rosa and Cox, 1997). Такая консервативность белка в ходе эволюции объясняется его фундаментальной ролью в регуляции клеточных процессов.

Белок RecA (~37 кДа) функционален в виде филамента, когда мультимеризуется на ДНК. Мономер RecA в единственном числе как правило неактивен. В виде филамента он взаимодействует с одноцепочечной ДНК (оцДНК) или двуцепочечной ДНК (дцДНК). Филаментация сопровождается гидролизом АТФ. Белок RecA является копротеазой белков LexA и UmuD, основными регуляторами SOS ответа и мутагенеза (Ланцов, 2007; Cox, 2007).

Структура белка RecA была получена дважды. В 1992 году его трехмерная кристаллическая структура была получена в присутствии АДФ, то есть в неактивной форме (Story et al., 1992; Story and Steitz, 1992). Современная модель нуклеопротеинового комплекса появилась после получения кристаллов активных филаментов RecA в присутствии ДНК и

АТФ в 2008 году (Chen et al., 2008). Структурный анализ предоставил широкие возможности для направленного исследования сайтов белка с помощью биохимических и генетических методов. С помощью аминокислотных замен стало возможным детально идентифицировать участки белка, ответственные за связывание с ДНК, АТФ и сайты межмономерных взаимодействий. Биохимические свойства вариантов RecA, полученных на основе кристаллической структуры, анализируют для интерпретации функциональной модели филамента.

Несмотря на очевидные успехи в изучении структурно-функциональной организации филамента RecA, до сих пор актуальным остается исследование механизмов регуляции активности филамента вспомогательными или регуляторными белками. Анализ многих природных и мутантных белков показывает, что бактериальный белок RecA несет в себе огромный рекомбинационный потенциал, который не реализован *in vivo*, потому что вреден для метаболизма клетки. Ограничения во многом определяются оптимизированным составом аминокислотных остатков самого белка, а так же функцией регуляторных белков. Нарушение любой из этих систем приводит к гиперрекомбинации либо гипорекомбинации. Эволюция рекомбиногенных свойств ограничена возможностями метаболизма других систем клетки. Увеличение рекомбиногенности оказалось возможным сделать искусственно, но это сопровождается негативным эффектом для репликативного аппарата и клеточного деления. Таким образом, эволюция поддерживает баланс между различными аспектами метаболизма ДНК находя компромисс между уровнем активности сразу многих белков рекомбинации и репарации. Неисчерпанный потенциал рекомбиногенности белка RecA может послужить подспорьем в решении многих биотехнологических задач. Вместе с тем, прикладной характер подобных исследований заключается в поиске новых путей антибактериальной терапии. Так как белок RecA является активатором бактериального SOS-ответа, он функционально задействован в общей резистентности патогенных

бактерий к действию антибактериальных препаратов. Рекомбиназы являются хорошей мишенью для конструирования соединений, блокирующих бактериальный SOS-ответ и мутагенез. Небольшие пептидные фрагменты, представляющие функциональные участки природных ингибиторов могут стать одними из лучших кандидатов для достижения блокирования SOS-ответа у бактерий (Estieu-Gionnet, et al., 2011).

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение молекулярных механизмов регуляции гомологической рекомбинации и SOS ответа рекомбиназным аппаратом клетки и регуляторными белками.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить ряд конкретных задач:

- 1) Выявление вариантов гена *recA*, определяющих гиперрекомбинацию. Определение верхнего предела рекомбиногенности.
- 2) Исследование взаимосвязи между регуляторными генами, SOS-функцией и рекомбиногенностью.
- 3) Анализ путей и молекулярных механизмов гиперрекомбинации на основе биохимических свойств вариантов белка RecA
- 4) Выяснение причин и механизмов негативной селекции гиперрекомбиногенного фенотипа
- 5) Определение роли негативного регулятора белка RecX в метаболизме клетки на основе его биохимических свойств
- 6) разработка модели функционирования белка RecX

Научная новизна. Систематический анализ основных генов SOS системы клетки, а так же мутантов *recA* является оригинальным комплексным исследованием генетических основ гиперрекомбинации. Впервые показано, что рекомбиногенность в ходе конъюгационной рекомбинации может изменяться в десятки раз. Детальный анализ выявил наличие естественных механизмов саморегуляции рекомбиногенности в

бактериальной клетке. Ранее было показано, что степень рекомбиногенности белка RecA связана с динамическими характеристиками процесса мультимеризации филамента на молекуле ДНК. В этой работе впервые продемонстрирована возможность повышения рекомбинационных свойств белка RecA также за счет усиления синаптной активности филамента. Оценен вклад регуляторной системы клетки, активаторов и ингибиторов белка RecA, в контроль рекомбиногенности. Одновременно, проведен структурно-функциональный анализ основного ингибитора рекомбинации - белка RecX. Была усовершенствована модель ингибирования, благодаря чему удалось выявить функционально-активный центр белка RecX. Впервые разработан биотехнологический подход, благодаря которому небольшой пептидный фрагмент регуляторного белка может быть использован как ингибитор белков RecA и SOS ответа бактериальной клетки. Последнее десятилетие характеризуется экспоненциально повышающимся интересом к небольшим молекулам, которые могли бы на генетическом уровне остановить адаптацию бактерий к разрабатываемым антибиотикам. В работе впервые продемонстрировано, что такие молекулы могут разрабатываться на основе одного из регуляторных белков рекомбинации и эффективно функционировать *in vivo*. Получен патент на семейство конформационно-стабильных пептидов состоящих всего из 20 природных аминокислот, построенных на основе белка RecX.

Теоретическая и практическая значимость. Научно-практическая значимость представленной работы состоит в первую очередь в существенном вкладе в дальнейшее понимание внутриклеточных процессов гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации. Исследованы последствия гиперрекомбинации для метаболизма клеточной ДНК и пути негативной селекции гиперрекомбиногенного фенотипа. Охарактеризованы разные молекулярные механизмы, отвечающие за рекомбиногенность белков RecA. Использование выявленных вариантов белка RecA, с усиленной рекомбинационной

функцией, могут в дальнейшем привести к более продуктивному использованию рекомбинационного потенциала этого белка в биотехнологиях.

Предложена усовершенствованная модель функционирования одного из самых эффективных негативных регуляторов рекомбинации – белка RecX. Впервые выявлен биотехнологический подход, благодаря которому небольшой пептидный фрагмент регуляторного белка может быть использован как ингибитор белков RecA. Такое понимание молекулярных процессов важно не только в общем плане познания, но и дает возможность при необходимости вмешиваться в эти процессы. Поскольку белок RecA выполняет основную роль в поддержании генетического разнообразия популяций и, в частности, в развитии устойчивости к антибиотикам, одновременное применение пептидных ингибиторов белка RecA с антибиотиками смогло бы приостановить или даже воспрепятствовать развитию устойчивости бактерий к применяемым лекарствам.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Рекомбиногенный фенотип может сильно варьировать как в зависимости от аминокислотных замен в самом белке RecA, так и в зависимости от экспрессии регуляторных белков SOS-системы.
2. Гиперрекомбинационные свойства белка RecA могут быть как результатом изменения динамики филаментации, так и повышения синаптной активности филамента.
3. Гиперрекомбинация нарушает метаболизм ДНК бактериальной клетки и поэтому исчезает в ходе негативной селекции в ряду клеточных генераций. Мутации не затрагивают ген *recA*, но возникают в регуляторных участках ДНК, подавляя экспрессию гена.
4. Белок RecX вызывает гипорекомбиногенный фенотип, подавляя филаментацию RecA *in vivo* и *in vitro*. Потенциальная роль белка RecX в удалении белка RecA с хромосомной ДНК, по завершении рекомбинации, включает в себя восстановление клеточного роста.

5. Предлагаемая нами модель функционирования белка RecX в ходе дестабилизации филамента RecA включает RecX-ДНК взаимодействия в участке 139-150 а.к. белка RecX. Регуляция активности белка RecX белком SSB обусловлена взаимодействием обоих белков с ДНК.

6. Модифицированный пептидный фрагмент белка RecX, усовершенствованный с помощью программы SEQOPT, способен блокировать филаментацию RecA и SOS-ответ у бактерии. Предложен новый подход, направленный на решение задач по предотвращению адаптации бактерий к антибиотикам.

Личный вклад автора заключается в постановке задач, решаемых в ходе исследования. Автор осуществлял планирование работы, разрабатывал методы решения проблем, принимал самое непосредственное участие в получении представленных экспериментальных результатов, проводил анализ полученных результатов и координировал деятельность соавторов. Автор представлен в перечне соавторов рецензируемых публикаций преимущественно на первом либо последнем месте. Значительная часть полученных результатов была поддержана грантами РФФИ, руководство которыми принадлежит автору.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих отечественных и международных конгрессах, конференциях, симпозиумах, совещаниях и школах: “Keystone symposia”, 2007, Colorado, USA; на семинарах политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона», 2008, Санкт-Петербург; на всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и инновации в технических университетах», 2008, Санкт-Петербург и «Russian-Swiss Workshop on Regulation of genome stability by DNA replication and repair», 2010, Санкт-Петербург; 38th FEBS congress Amsterdam 2013, Пятый всероссийский форум студентов, аспирантов и молодых ученых "Наука и

инновации в технических университетах" Санкт-Петербург, 2011; Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, 2015; The FEBS Congress 2016, Ephesus, Turkey; FEBS Journal 11th International Conference on Protein Stabilisation, 2016; Istanbul Military Museum, Istanbul, Turkey; «Systems Biology and Bioinformatics», St.-Petersburg, 2016; Школа-конференция с международным участием «3rd International School and Conference Saint-Petersburg OPEN 2016».

Достоверность полученных результатов

Все реагенты были сертифицированными продуктами известных фирм. Оценка достоверности соответствующих результатов проведена с использованием соответствующих методов статистической обработки данных.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 печатных статей в рецензируемых журналах, рекомендованных перечнем ВАК, 1 патент и 7 тезисов, опубликованных в сборниках.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, иллюстрирована 41 рисунком и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, выводы и список литературы, включающий 301 источник (- на русском языке и - на иностранном).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рекомбинационный тест. Эффективность рекомбинации определяли по выходу рекомбинантов после конъюгации в течение 60 минут при температуре 37°C донора Hfr с реципиентом JC10289 *ΔrecA*. Для описания генетической структуры рекомбинантов и интенсивности рекомбинации были проведены измерения частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) на единицу длины ДНК. Величину ЧРО вычисляли определяя сцепленность между селективируемым и неселективируемым маркерами, где в роли селективируемого маркера выступали маркеры *thr*⁺ или *ara*⁺, а неселективируемым маркером был *leu*⁺. В случае, когда сцепленность между *thr*⁺ и *leu*⁺ не превышала 0.5 единиц, в качестве селективируемого маркера использовался маркер *ara*⁺, находящийся на меньшем расстоянии от маркера *thr*⁺ (Verhoef and de Naan, 1966; Wood and Walmsley, 1969; Бреслер и Ланцов, 1978). Величину среднестатистического расстояния между соседними кроссоверами (λ) определяли при помощи модифицированной формулы Холдейна (Бреслер и Ланцов, 1978): $\mu = 0.5[1 + \exp(2l/\lambda)]$. Для RecAEc это расстояние составляет 20 минут, что соответствует 5 обменам на геном *E. coli* (Bresler et al., 1978). Также использовался расчет относительного изменения величины λ (и, следовательно, величины ЧРО) по формуле $\lambda_2/\lambda_1 = \ln(2\mu_1 - 1)/\ln(2\mu_2 - 1)$, в которую входят только экспериментально определяемые величины μ_1 и μ_2 . Δ ЧРО для RecAEc была принята за 1 единицу.

SOS-хромотест. SOS-хромотест проводили согласно методике, описанной ранее (Миллер, 1976). В этом тесте эффективность SOS-ответа, контролируемого геном *recA*, регистрируется по синтезу β -галактозидазы, продуцируемой геном *lacZ*, находящимся под контролем SOS-индуцируемого гена *sfiA* в штамме GY7109. β -галактозидазную активность измеряли при помощи хромогенного субстрата *o*-нитрофенил- β -D-галактозида (ОНФГ). В присутствии β -галактозидазы это бесцветное вещество превращается в галактозу и *o*-нитрофенол. Поскольку *o*-нитрофенол окрашен в желтый цвет, его количество можно измерить по

поглощению при 420 нм. Если концентрация ОНФГ достаточно высока, то количество образовавшегося *o*-нитрофенола пропорционально количеству фермента и времени взаимодействия фермента с ОНФГ.

RecA-зависимый гидролиз АТФ Измерение гидролиза АТФ, катализируемого белками RecA, проводили с помощью спектофотометрического метода, связывающего гидролиз АТФ с окислением NADH (Kowalczykowski et al., 1987). Появление одного эквивалента АДФ (гидролиз 1 молекулы АТФ) ферментативно сопряжено с окислением одного эквивалента молекулы NADH до NAD^+ , регистрируемого спектрофотометрически при 380 нм. Коэффициент экстинкции NADH $\epsilon_{380} = 1.21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Реакция переноса нити ДНК Реакции переноса нити проводили и визуализировали в агарозном геле согласно методике, предложенной Коксом (Cox et al., 1981). Реакционная смесь указанные количества белков RecA и SSB, кольцевой оцДНК фага M13mp18 (плюс-нить) и линейной формы днДНК того же фага. Положение ДНК в геле анализировали с помощью системы Kodak DC120 и программного обеспечения KDSID 2.0 (Amersham).

Взаимодействия белков RecA с этеноДНК Ассоциацию и диссоциацию RecA от этеноДНК характеризовали по изменению флюоресценции. Процесс получения оцДНК, модифицированной хлороацетоальдегидом, описан ранее в работе (Alexseyev et al., 1997). Измерения проводили при длинах волн возбуждения и эмиссии 305 и 410 нм, соответственно, на спектрофотометре Hitachi HPF-4, как описано в работе (Menetski & Kowalczykowski, 1985). Реакцию связывания с этеноДНК инициировали добавлением белка в кювету с реакционной смесью, а поли(дТ) добавляли спустя 5 минут после увеличения флюоресцентного сигнала для регистрации кинетики диссоциации. Кинетику ассоциации белка к этеноДНК измеряли в присутствии указанного количества хлорида натрия.

Анализ переноса гомологичной нити ДНК методом FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). В ходе RecA-зависимого переноса одной из

цепей дцДНК на оцДНК, содержащуюся внутри филамента, происходило пространственное разделение флуоресцеина и дабсила и, как следствие, увеличение флуоресцентного сигнала. Филаменты белка RecA формировались на оцДНК в течение 5 минут в присутствии АТРγS и белка SSB. Реакция инициировалась добавлением меченой дцДНК, которая была мечена по 5' и 3' концам нитей соответственно флуоресцеином и дабсилом. Интенсивность флуоресценции определялась с помощью флуориметра Hitachi F-4000, либо с помощью Typhoon 9410 Variable Mode Imager и программного обеспечения TotalLab v1.10 (Phoretix).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Некоторые бактериальные рекомбиназы при экспрессии в *Escherichia coli* способны частично комплементировать при отсутствии белка RecA его функции. Это может быть комплементация не только резистентности к УФ-излучению, но так же комплементация таких свойств как натуральная трансформация или конъюгационная рекомбинация (Sano, 1993; Stohl et al., 2002). Комбинирование, как отдельных аминокислот, так и целых аминокислотных блоков в пределах одной и той же полипептидной цепи помогает установить пути и возможности гомологической рекомбинации. Согласно имеющимся в литературе данным химерные рекомбиназы, имеющие даже лишь несколько замен в RecA могут значительно изменить его рекомбиногенный потенциал (Chervyakova et al., 2001). Это привело нас к вопросу о поиске верхнего предела для рекомбиназной активности. Кроме того задача состояла в исследовании и сопоставлении различных путей дерепрессии конъюгационной рекомбинации. С другой стороны, ряд белков участвующих в метаболизме ДНК в свою очередь так же могут активировать либо наоборот подавлять гомологическую рекомбинацию. В таблице 1 представлены значения ЧРО для химерного белка RecAX53, который характеризуется наибольшей рекомбиногенностью относительно, как других

химерных рекомбиназ, полученных от комбинаций RecAEc и RecAPa, так и исходных белков RecA. Кроме того, выявлено значение С-конца на рекомбиногенность RecAEc и RecAPa. Известно, что С-концевой субдомен белка RecAEc имеет значение для активности рекомбиназы в биохимических опытах. В отсутствие С-конца белок RecAEc активнее конкурирует с белком SSB за оцДНК. Одновременно замечено, что *recAΔC17Ec* в отличие от белка дикого типа способен активироваться при низкой концентрации ионов магния в обмене нитей ДНК *in vitro* (Lusetti et al., 2003; Eggler et al., 2003). Однако, как было показано, обнаруженные преимущества *in vitro* почему-то не реализуются в ответ на действие УФ облучения. Из таблицы видно, что в условиях конъюгационной рекомбинации *recAΔC17Ec* увеличивает ЧРО более чем в четыре раза. Делеция 11 аминокислот в белке RecAPa приводит к аналогичному эффекту, что свидетельствует об универсальности данного явления. Предполагается, что избыток отрицательно заряженных аминокислот на С-конце белка препятствуют его взаимодействию с отрицательно заряженной ДНК. Другим подтверждением важности С-концевого субдомена в регуляции активности рекомбиназы служит пример взаимодействия с таким регуляторным белком как DinI (Galkin et al., 2011). Сочетание большинства рекомбиназ с инактивацией гена *mutS* значительно стимулирует рекомбиногенность. С одной стороны эта стимуляция является вполне ожидаемой, так как давно известно, что активность mismatch репарации подавляет гомологическую рекомбинацию. Однако, в результатах представленных в таблице 1, в случаях с различными рекомбиназами, обнаруживается разнонаправленный эффект. Рекомбиногенность природных рекомбиназ RecAEc и RecAPa стимулируется мутацией *mutS215*. Генетический анализ мутантов, проведенный в более ранних работах, демонстрирует, что разные варианты рекомбиназ могут приводить к увеличению ЧРО, как по SOS-зависимому механизму (RecA E38K) (Cazaux et al., 1993; Lanzov, 2003), так и по SOS-независимому. Конститутивная коэкспрессия белков SOS ответа совместно с белком RecA обычно

значительно затрудняет анализ рекомбиногенной активности мутантных белков. Поэтому варианты белка RecA, представленные в таблице 1 (RecAX53, RecAΔC17Ec, RecAPa, RecAD112R), активирующие гиперрекомбиногенный фенотип по SOS-независимому механизму представляют особый интерес для исследования.

Таблица 1. Действие вариантов RecA на ЧРО

<i>recA</i> или <i>mutS</i> генотип реципиента ^a	Выход Thr ⁺ Str ^r или Ara ⁺ Str ^r рекомбинантов	Сцепленность μ (selected - unselected markers)		ЧРО	ΔЧРО
		<i>thr</i> ⁺ - <i>leu</i> ⁺	<i>ara</i> ⁺ - <i>leu</i> ⁺		
Природные белки					
<i>EcRecA</i> ⁺	3.7±0.8		0.986±0.007(600)	5.0±0.1	1.0
<i>EcRecA</i> ⁺ <i>mutS215</i>	3.1±0.8		0.923±0.017(900)	30.0±0.5	6.0
<i>PaRecA</i> ⁺	4.5±1.0		0.896±0.032(900)	41.6±1.5	8.3
<i>PaRecA</i> ⁺ <i>mutS215</i>	2.9±0.6		0.801±0.015(1300)	90.9±1.7	18.1
Белки с делецией					
<i>recAΔC17Ec</i>	0.16±0.01	0.747±0.061(1220)		21.6±2.1	4.3
<i>recAΔC17Ec</i> <i>mutS215</i>	0.17±0.01	0.820±0.005(600)		13.2±0.5	2.6
<i>recAΔC11Pa</i>	1.8±0.1		0.754±0.020(1200)	119.3±8.7	23.9
<i>recAΔC11Pa</i> <i>mutS215</i>	4.6±0.5	0.757±0.067(1450)		20.4±7.5	4.1
<i>recAX53</i>	1.4±0.3		0.883±0.025(600)		8.9
<i>recAX53</i> <i>mutS215</i>	0.8±0.2		0.951±0.006(900)		3.4
<i>EcRecAD112R</i>	2.4±0.2	0.616±0.054 (700)		263±27.3	52.6

Наибольшее изменение ЧРО вызвали замены аспарагиновой кислоты на аргинин в 112 позиции, сопровождающееся увеличением ЧРО более чем в 50 раз. Данная замена обнаружена нами в области мономер-мономерного взаимодействия белка RecA, которая была ранее локализована несколькими научными группами (Nguyen et al., 1993; Masui et al., 1997; Zaitsev et al., 1999; Eldin et al., 2000). Кроме аминокислотной замены D112R, значительное влияние на частоту рекомбинационных обменов оказывает замена аргинина на аланин в позиции 28 (ЧРО увеличивается в 27 раз). Комбинация R28D + D112R не увеличивает значение ЧРО, указывая на то, что ΔЧРО = 41 – 50 может быть максимально возможным увеличением ЧРО, которое все же еще

совместимо с выживаемостью клетки. Однако как свидетельствует компьютерное моделирование, эти мутации более вероятно разрушают одни и те же межсубъединичные взаимодействия в филаменте и поэтому их совместный эффект неаддитивный.

Биохимические особенности белков RecAPa и RecA53. В ходе бактериальной конъюгации у *E.coli* донор передает в реципиент фрагмент хромосомы, которая интегрируется в хромосому реципиента. Входящий 5'-конец конвертируется в дцДНК, тогда как внутренние участки ДНК достраиваются позже. До тех пор, пока донорная ДНК полностью не достроена до двунитевого состояния, она имеет смешанный характер, то есть состоит из дцДНК с однонитевыми пробелами (фрагменты Оказаки). Роль белка SSB в конъюгации заключена в активном взаимодействии с однонитевыми участками донорной ДНК. Последовательно, белок SSB взаимодействует с донорной ДНК раньше, чем белок RecA. Таким образом, SSB является основным медиаторным белком, который необходимо учитывать при анализе активности рекомбиназ (Jones et al., 1992). Перед нуклеацией RecA, белок SSB представляет собой препятствие к образованию филаментов. Вытеснение SSB с ДНК *in vitro* регистрируют по изменению АТФазной активности RecA, которая отражает количество RecA на оцДНК.

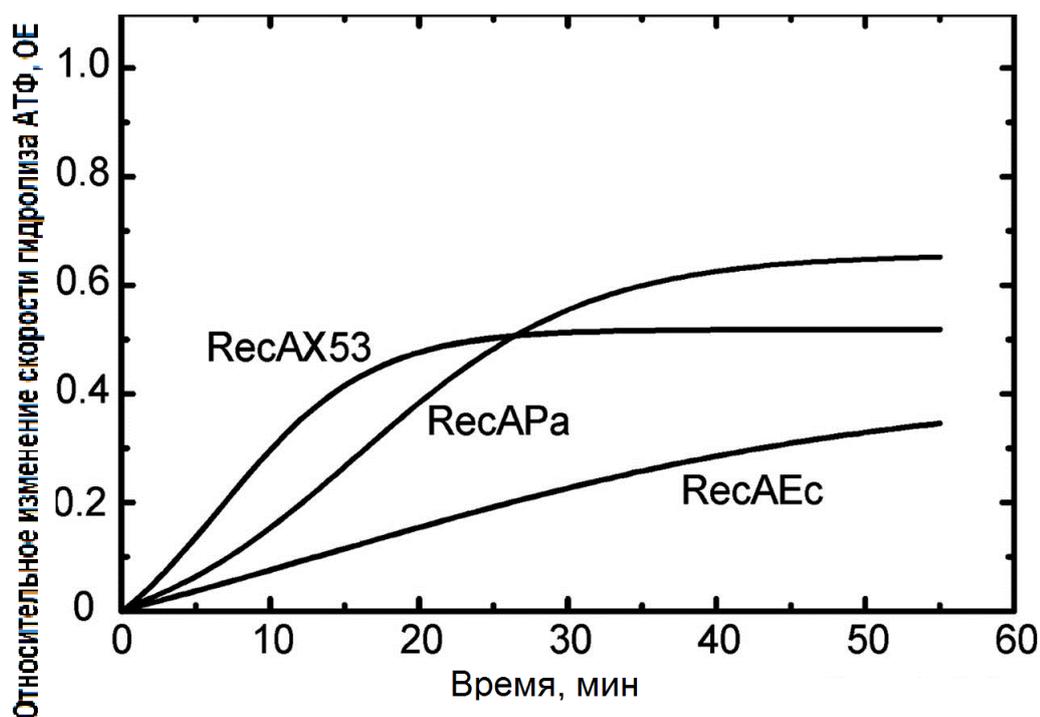


Рисунок 1. Кинетика замещения белка SSB на онДНК белками RecAЕс, RecAPa, RecAX53. Реакция измерялась в режиме реального времени по изменению RecA-зависимого гидролиза АТФ. Белок SSB предварительно инкубировался в течение 2 минут в присутствии оцДНК. Реакция инициировалась добавлением белка RecA в измерительную кювету. Относительное изменение АТФазы выведено путем деления скорости гидролиза АТФ в данный момент времени на максимальную скорость гидролиза АТФ. Максимальная скорость гидролиза АТФ каждым из белков RecA получена в условиях добавления белка SSB в реакцию после RecA и онДНК.

Из кривых изменения гидролитической активности рекомбиназ следует, что RecAPa и RecA53 вытесняют белок SSB значительно быстрее, чем белок RecAЕс (рисунок 1). В целом эти данные полностью коррелируют с данными по частоте рекомбинационных обменов, полученных из генетических экспериментов. Вместе с различием в кинетике вытеснения SSB из графика видно, что каждая кривая достигает индивидуальное плато, где скорость гидролиза АТФ перестает возрастать. Относительный уровень плато отражает количество рекомбиназы находящейся на ДНК в присутствии заданного количества SSB по достижении равновесия. В ходе постепенной конкуренции с SSB за сайты ДНК, мономеры RecA ассоциируют к 5' концу и диссоциируют от 3' конца филамента. Кинетика рециркуляции потенциально

может быть лимитирована как скоростью ассоциации мономера заряженного молекулой АТФ к ДНК, так и скоростью диссоциации мономера связанного с молекулой АДФ от ДНК. Для измерения сравнительной скорости диссоциации рекомбиназ от ДНК использовали этеноДНК и двадцатикратный избыток поли(дТ). Однако известно, что этеноДНК может занимать и первичный и вторичный сайты связывания. При этом флуоресцентный сигнал, исходящий от этеноДНК из обоих сайтов связывания будет неразличим (Zlotnick et al., 1993). Поэтому в реакции использовался избыток RecA относительно этеноДНК. В таком случае все количество этеноДНК полностью распределено только в первичном сайте связывания филамента, тогда как вторичный сайт связывания остается незаполнен. Благодаря такому подходу кинетика распада нуклеопротеинового комплекса отражает разборку филамента, как процесс последовательной диссоциации мономеров RecA от одноцепочечной ДНК.

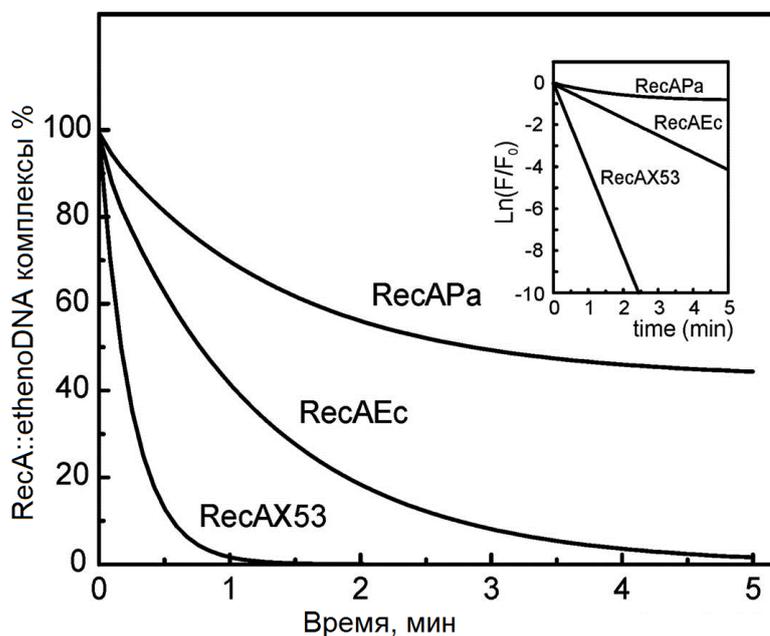


Рисунок 2. Кинетика распада нуклеопротеинового комплекса, образованного белками RecA и этеноДНК. Эксперименты проведены при 37°C, в буфере содержащем: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 12 мМ MgCl₂, 3 мкМ этеноДНК, 2.5 мкМ RecA, 1 мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему. Реакция инициировалась добавлением 50 мкМ поли(дТ) в точке 0 на оси абсцисс.

Диссоциируя от этеноДНК мономеры взаимодействуют с поли(дТ) и как правило уже не реассоциируют к этеноДНК, что регистрируется по падению флуоресцентного сигнала (Рисунок 2). Несмотря на то, что в эксперименте задействована не природная ДНК, данный опыт позволил сравнить между собой скорости диссоциации всех трех рекомбиназ. Время полураспада флуоресцентного сигнала в ряду RecAЕс/RecAPa/RecAX53 соответствует значениям 1:3:0,2. Данные означают, что филамент RecAPa в большей степени занимает 5' конец оцДНК, чем остальные рекомбиназы. Однако эффективность конкуренции RecAX53 с белком SSB является самой высокой среди остальных белков. Чтобы разрешить это противоречие, проведен анализ скорости ассоциации RecAX53 к этеноДНК.

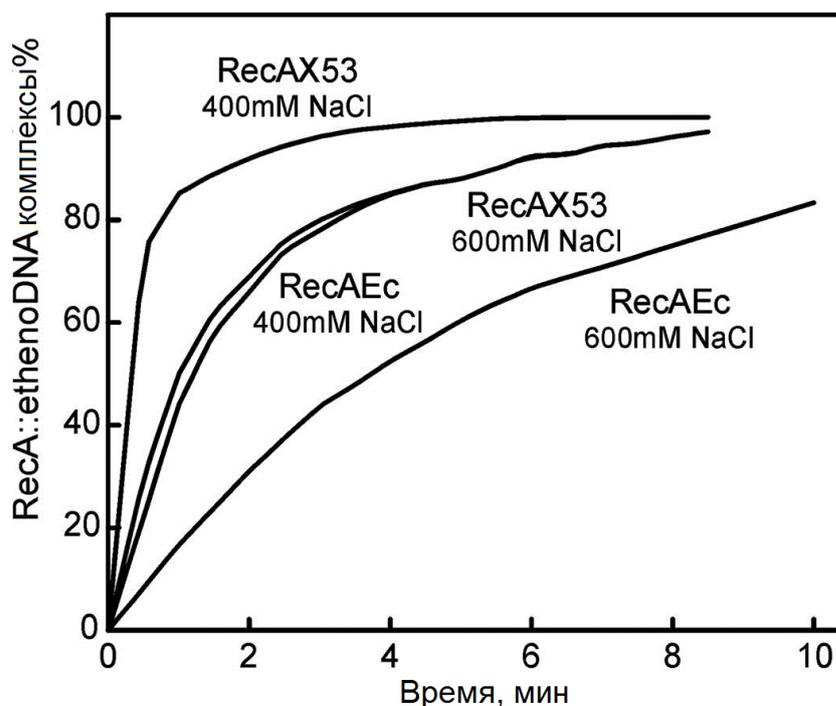


Рисунок 3. Кинетика образования нуклеопротеинового комплекса между RecA и этеноДНК. Эксперименты проведены при 37°C, в буфере содержащем: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 12 мМ MgCl₂, 1.9 мкМ этеноДНК, 0.8 мкМ RecAЕс или RecAX53, 0.1 мМ АТФγS и указанные концентрации NaCl. Реакция инициировалась добавлением RecA в точке 0 на оси абсцисс.

Сравнительная скорость ассоциации RecA к ДНК может быть так же измерена с помощью этеноДНК. Однако процесс представляется слишком быстрым, чтобы быть зафиксированным обычными приборами. Ранее было

продемонстрировано, что ионы одновалентных металлов ингибируют мультимеризацию RecA на ДНК. Чтобы сравнить скорость ассоциации рекомбиназ к этеноДНК в реакционную смесь добавлялся хлорид натрия. Однако принимая во внимание то, что RecAPa значительно менее чувствителен к ионной силе раствора, чем остальные белки, RecAPa в эксперименте не анализировался. Из рисунка 3 следует, что RecAX53 значительно быстрее ассоциирует к этеноДНК, чем рекомбиназа дикого типа. Принимая во внимание так же ускоренную разборку RecAX53 относительно остальных белков, можно заключить, что RecAX53 образует наиболее динамичный филамент.

RecAD112R- зависимая рекомбиногенность. Действительно, белок SSB является единственным активным конкурентным белком для RecA на одноцепочечной ДНК при конъюгации, так как исходная концентрация SSB в клетке выше относительно многих других регуляторных белков. В продолжение этой логики, чем длиннее область филамента, тем выше вероятность спаривания гомологичных цепей ДНК. Однако такая функция белка RecA как поиск гомологии и переключение спаренности оснований цепи ДНК по нашим наблюдениям также может быть источником гиперрекомбиногенности. Как известно, основными этапами реакции переноса цепи ДНК между нуклеопротеиновым филаментом RecA и гомологичной дцДНК являются спаривание и процесс обмена гомологичными цепями ДНК. Мы сравнили способность белка дикого типа и белка RecAD112R проводить синаптазную реакцию обмена гомологичными цепями ДНК *in vitro*. Кинетика реакции регистрировалась с помощью апробированного ранее метода FRET (Gupta et al., 1998). С этой целью филаменты RecA были собраны на одноцепочечной ДНК длиной 102 основания и негидролизующего аналога АТФ – АТФ γ S. Так как известно, что в присутствии АТФ γ S скорость диссоциации белка RecA от ДНК на несколько порядков ниже, чем в присутствии АТФ, влияние динамики связывания белка с оцДНК на ход синаптазной реакции в этих условиях

полностью исключается (Menetski and Kowalczykowski, 1985). Реакцию инициировали добавлением двунитевых олигонуклеотидов длиной 34 пары оснований. Двухцепочечный олигонуклеотид мечен по 5'-концу одной из цепей флуоресцеином (FAM) и по 3'-концу комплементарной цепи молекулой гасителя, дабсиллом (dabsyl). В ходе RecA-зависимого переноса одной из цепей дцДНК на оцДНК, содержащуюся внутри филамента, происходит пространственное разделение флуоресцеина и дабсила и, как следствие, увеличение флуоресцентного сигнала (Рисунок 4). Однонаправленный характер реакции обеспечивается исходным избытком оцДНК, содержащейся в филаменте, относительно двухцепочечного олигонуклеотида, либо присутствием белка SSB. Для замедления кинетики реакции и, следовательно, более удобного измерения, эксперимент проводился при 27°C вместо 37°C. По кривым увеличения флуоресценции в зависимости от времени видно, что скорость образования соединенных молекул белком RecAD112R значительно выше, чем в реакции, проводимой белком RecA дикого типа и RecAE38K.

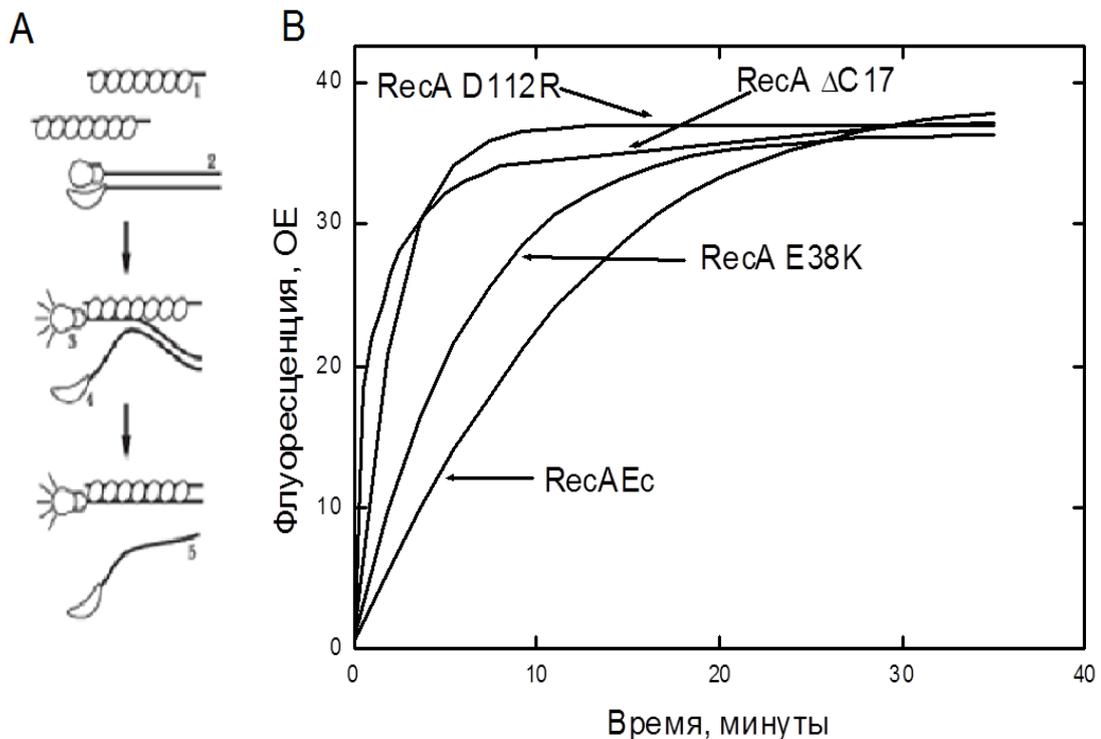


Рисунок 4. Проведение синаптной реакции белками RecA.

А. Схематическое изображение реакции: 1- филамент RecA на однонитевой ДНК; 2- двунитевая ДНК; 3- флуоресцеин (FAM); 4- дабсил (dabsyl); 5- однонитевая ДНК, меченная дабсилом. В. Реакцию проводили при 27°C. В состав реакционной смеси входили: 25 mM трис-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 0.7 mM АТФγS, 3 мкМ однонитевого олигонуклеотида, 1.2 мкМ указанного белка RecA, 0.3 мкМ SSB и 1.5 мкМ меченого двунитевого олигонуклеотида. Филаменты белка RecA были сформированы на онДНК в течение 5 минут преинкубации в присутствии АТФγS и белка SSB. Спаривание олигонуклеотидов инициировалось при добавлении меченой онДНК в момент времени, соответствующий точке 0 на оси абсцисс.

На сегодняшний день белок RecAD112R является единственным из исследованных вариантов RecA, характеризующихся повышенной рекомбиногенностью, где показано, что молекулярный механизм усиления рекомбинационной активности связан с качественным изменением такой функции филамента, как поиск гомологичной цепи ДНК для инициирования синаптной реакции.

Негативная селекция гиперрекомбиногенного фенотипа. Столь высокое значение ЧРО не является естественным для клетки, что подтверждается утерей рекомбинационного фенотипа. Было выдвинуто предположение, что столь несвойственный для бактерии уровень рекомбиногенности может активировать механизмы, способные супрессировать ЧРО в ряду генераций и привести к ее понижению. Для проверки этой гипотезы клетки долгое время поддерживались в состоянии экспоненциального роста, при этом отбирая аликвоты через некоторые промежутки времени с целью измерения ЧРО. Как показано на графике, популяция клеток *E.coli* с предельно высоким уровнем ЧРО «деэволюционирует» к нормальному уровню рекомбинационной активности (Рисунок 5).

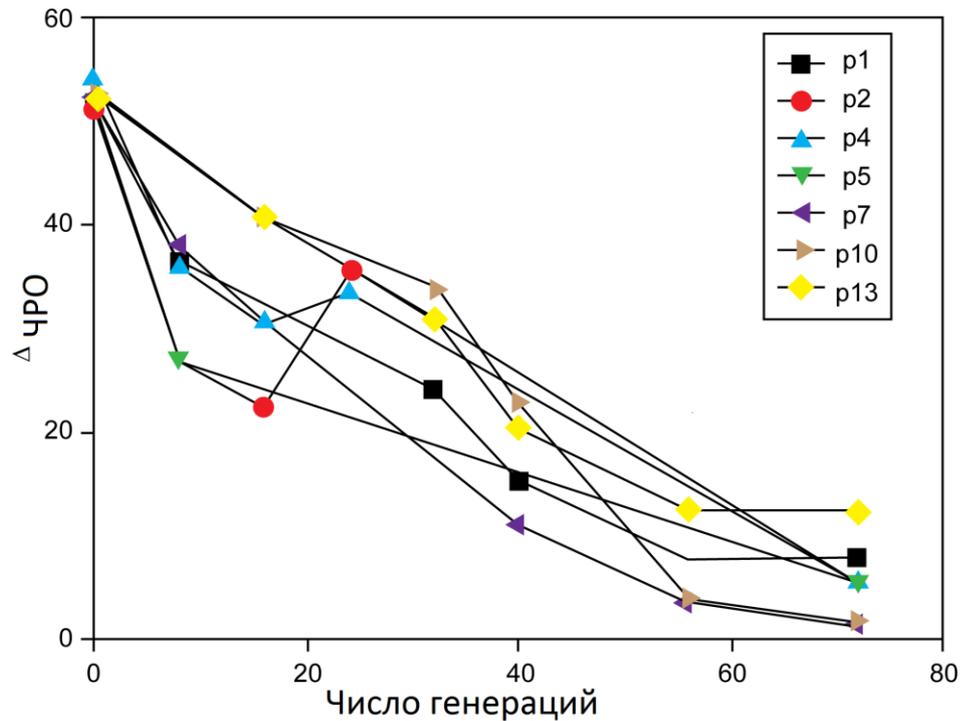


Рисунок 5. Кинетика нормализации ЧРО для 7 независимых штаммов, происходящих из одной клетки, в которой продуцируется гиперрекомбиногенный белок ResA D112R. Штаммы экспрессирующие ResAD112R с плазмиды pResAD112R анализировались на протяжении 70 поколений в штамме JC10289. После достижения плотности насыщенной культуры, бактериальные клетки разбавлялись до плотности экспоненциальной фазы роста. В указанное время аликвоты растущей культуры отбирались для измерения Δ ЧРО. Значение Δ ЧРО определялось как соотношение ЧРО модифицированной культуры, экспрессирующей ResAD112R, к ЧРО экспрессирующей белок дикого типа.

Иммунологический анализ бактериальных линий с мутациями на хромосоме, показал, что селекция рекомбиногенности осуществляется точно таким же способом, за счет снижения уровня экспрессии белка ResAD112R в клетке (Рисунок 6). Как и в случае с плазмидной мутацией, данные по хромосомным мутациям свидетельствуют о корреляции между падением количества экспрессируемого белка и снижением ЧРО.

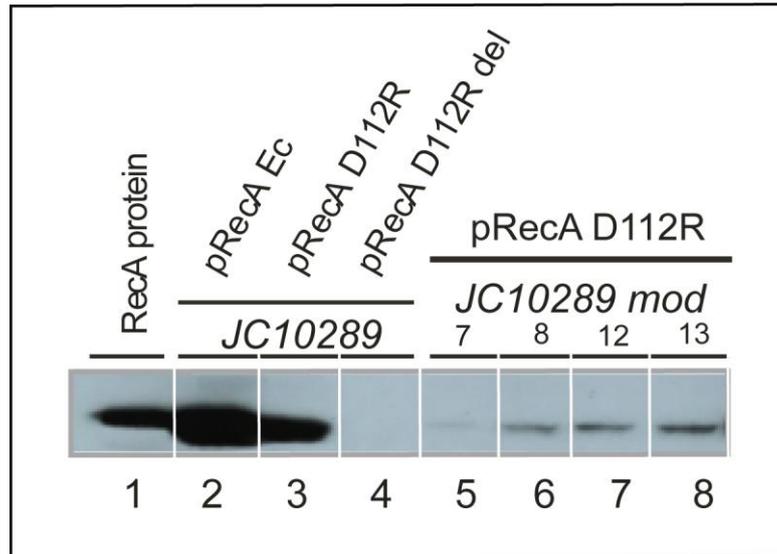


Рисунок 6. Экспрессия белка *RecAD112R* в клетках утративших гиперрекомбиногенный фенотип. Количество экспрессируемого белка измерялось с помощью иммуноблота, как указано в материалах и методах. Отбор образцов производился при плотности клеточных культур 5×10^7 клеток. Образцы под номерами 2 и 3 отображают исходный уровень экспрессии белка. Образцы под номерами 5, 6, 7, 8 отбирались у культур экспрессирующих *RecAD112R* в модифицированных штаммах 7, 8, 12, 13.

Секвенирование трех плазмид не выявило мутаций в кодирующей области гена *recAD112R*, но выявило делецию участка длиной 633 п.н., захватывающего промоторную область гена *recAD112R*. Данная делеция могла возникнуть только в результате рекомбинации по прямым повторам, представленных зоной 37 п.н. на флангах участка. С помощью иммунологического анализа было показано, что делеция приводила к падению синтеза белка *RecAD112R* в бактерии. Тем не менее, присутствие альтернативного промотора обеспечивало синтез некоторого количества белка *RecAD112R*, хотя в значительно меньших количествах, чем при трансляции белка с исходной плазмиды.

Микрочиповый анализ с последующим секвенированием генов, выявил точечную нуклеотидную замену в гене *pcnB*, кодирующем поли(А) полимеразу. Ген *pcnB*, как известно, влияет на копияность плазмид, имеющих ColE1 репликон (Masters et al., 1993).

Замещение бактериальных клеток с гиперрекомбинационным фенотипом на клетки с пониженной экспрессией RecAD112R происходит постепенно в течение более чем семидесяти генераций. Для того чтобы выяснить механизм негативной селекции, сравнивалась динамика роста бактерий несущих ген *recA* дикого типа и ген *recAD112R*.

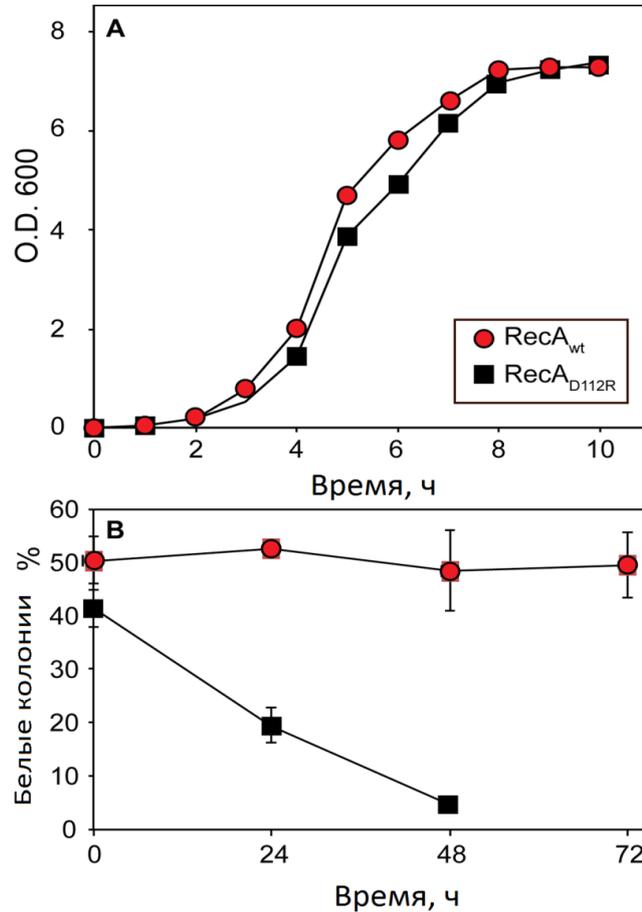


Рисунок 7. Снижение скорости роста бактериального штамма экспрессирующего RecAD112R. А. Сравнительная динамика роста клеток экспрессирующих RecA дикого типа (красные кружки) либо RecAD112R (черные квадраты). В. Верхняя кривая обозначает динамику количественного соотношения штаммов, каждый из которых экспрессирует белок RecA дикого типа. Один из штаммов имеет мутацию *Ara*⁻ (красные значки), которая сама по себе не несет преимущества для роста бактерий. Штаммы предварительно смешивались в соотношении 50% на 50%. Нижняя кривая обозначает соотношение штамма экспрессирующего RecAD112R к штамму с RecA дикого типа. Оба варианта гена *recA* находятся на хромосоме под своим природным промотором. Мутация *Ara*⁻ придающая колониям красный цвет находится в штамме с геном *recA* дикого типа.

Как видно из рисунка 7А наблюдалось небольшое, но воспроизводимое отставание роста бактериальных клеток несущих ген *recAD112R*. Для подтверждения обнаруженного результата был предпринят дополнительный эксперимент, предполагающий непосредственную конкуренцию в росте между обеими линиями. Обе линии были смешаны в соотношении 50/50, где бактерии дикого типа несли дополнительную мутацию *Ara⁻*, которая придает красный цвет колониям рассеянных на чашке с тетразолиум арабинозой (ТА). Та же самая линия дикого типа с мутацией *Ara⁻* смешивалась с подобной линией дикого типа, но в отсутствии данной мутации для контрольного измерения (Рис. 7В). Падение доли колоний белого цвета в смешанной популяции однозначно свидетельствует о процессе негативной селекции, в ходе которой гиперрекомбиногенный фенотип утрачивается за счет пониженной скорости деления клеток.

Сопоставление биохимических свойств варианта белка RecAD112R и кинетики клеточного роста бактерий экспрессирующих этот белок вызывает модель, в которой замедление роста бактерий возможно вследствие изменения метаболизма репликации, вызванного повышенной аффинностью RecAD112R к ДНК. Действительно выше было продемонстрировано, что RecAD112R образует устойчивые комплексы не только с оцДНК, но и с дцДНК. Ранее в литературе уже дискутировалась идея о том, что перегруженность репликативных вилок рекомбиназой может вызывать проблему возобновления репликации (Campbell and Davis, 1999; Moore et al., 2003). Другой пример, обнаруженный еще в 1993 году, демонстрирует, что гиперэкспрессия *recAPa* в штамме *P.aeruginosa* приводит к подобному эффекту, когда рост и деление клеток останавливается (Sano, 1993).

Белок RecX – индуцируемая гипорекомбиногенность. Интересно, что комплексы образованные белком RecAD112R с гетеродуплексной дцДНК были столь же устойчивы к действию RecX как и комплексы с оцДНК. Для разрушения нуклеопротеиновых комплексов образованных белком RecAD112R требуется на порядок больше белка RecX, чем для

нуклеопротеиновых комплексов образованных белком RecA дикого типа (Рисунок 8).

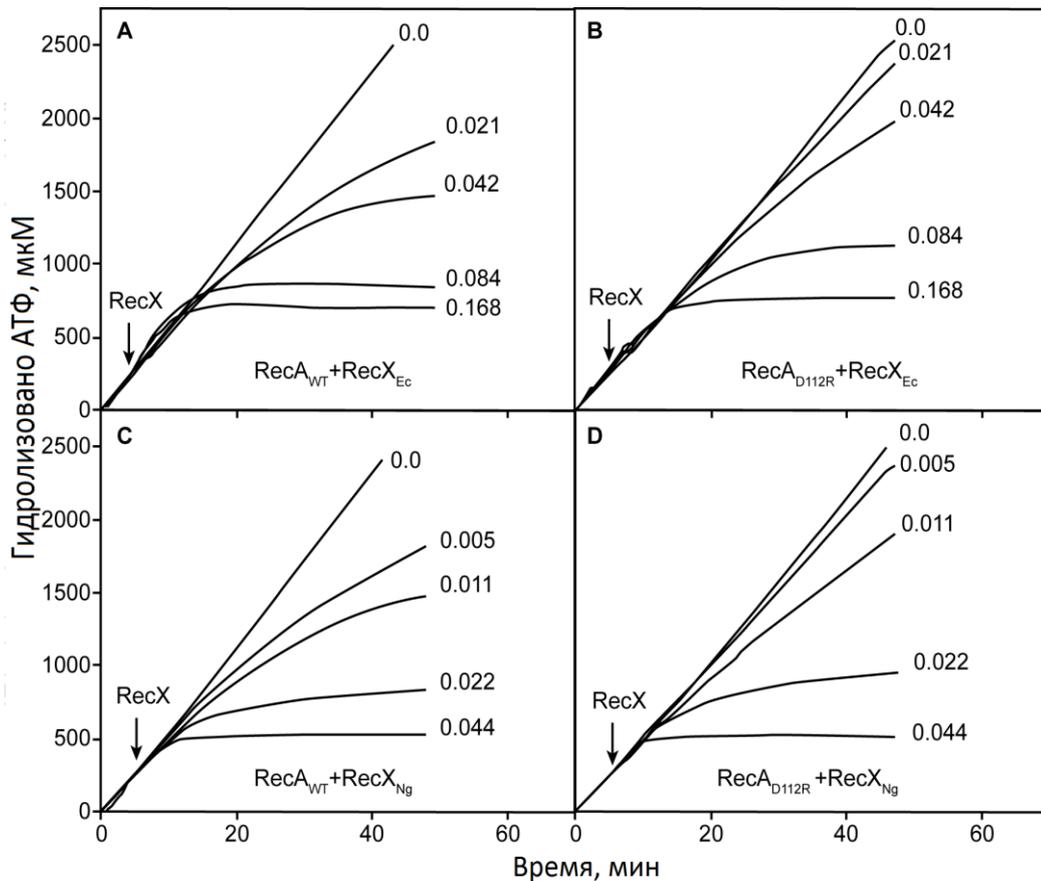


Рисунок 8. Ингибирование оцДНК-зависимой АТФазы белка RecA после добавления различных концентраций RecX.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ оцДНК фага M13, 3 мкМ RecA_{Ec} или RecA_{D112R}, 0.5 мкМ белка SSB и указанная на рисунке концентрация белка RecX (нМ). Кольцевую оцДНК инкубировали с белком RecA дикого типа или с белком RecA_{D112R} в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 0.5 мкМ белка SSB и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 5$ мин в реакционную смесь добавляли белок RecX_{Ec} либо RecX_{Ng}.

На рисунке 8 показана кинетика ингибирования ДНК-зависимой АТФазы белка RecA после добавления различных концентраций белка RecX. В реакционную смесь добавлялась оцДНК фага M13, затем белок RecA в указанной под рисунком концентрации и через 3 минуты - белок SSB, делающий вторичные структуры на оцДНК доступными для белка RecA. При этом скорость гидролиза АТФ достигала своего максимального значения,

после чего происходило добавление белка RecX в реакционную смесь (в точке 5 мин по оси абсцисс). Скорость гидролиза АТФ белком RecA падает пропорционально используемой концентрации белка RecX, достигая стационарного уровня. При концентрациях RecX равных 44 и 84 нМ, скорость гидролиза белка RecA_{Ec} падает до нуля, что свидетельствует о полной диссоциации RecA из комплекса с ДНК. Данные свидетельствуют о том, что мутантный белок устойчивее к действию белка RecX примерно в два раза, чем белок RecA дикого типа. В реакции ингибирования АТФазы также был задействован белок RecX из *Neisseria gonorea*. Ранее было продемонстрировано, что его активность в четыре раза выше, чем белка RecX_{Ec}. Эта же тенденция подтвердилась при сочетании RecAD112R и RecXNg. При смене белка RecX различие между RecAD112R и RecA_{wt} сохраняется полностью. В рамках кэппинг-модели взаимодействия, данный результат может интерпретироваться так, что филамент RecAD112R содержит столько же брешей сколько филамент RecA_{wt}, но характеризуется иной динамикой разборки. С другой стороны, если степень ингибирования зависит лишь от числа брешей в филаменте, то различие между эффектами RecXNg и RecX_{Ec} невозможно объяснить. Все основные закономерности этих экспериментов *in vitro* нашли свое подтверждение *in vivo* в экспериментах с конъюгацией (таблица 2).

Таблица 2. Действие белка RecX на ЧРО

RecA	RecX <i>Ec</i>		RecX <i>Gc</i>		None	
	wt	D112R	wt	D112R	wt	D112R
0.0% ara	2.4%* 0.935±0.016 (600)** ЧРО=24.8***	5.3% 0.548±0.017 (600) ЧРО=416.7	0.67% 0.943±0.005(900) ЧРО=21.7	0.26% 0.554±0.032(900) ЧРО=400.0	4.5% 0.939±0.007 (800) ЧРО=23.2	0.82% 0.560±0.006 (600) ЧРО=384.6
0.01 % ara	4.6% 0.928±0.011(1200) ЧРО=27.8	4.1% 0.642±0.020(900) ЧРО=227.3	0.68% 0.960±0.003(1200) ЧРО=14.8	0.85% 0.763±0.073(600) ЧРО=114.7		
0.1% ara	5.5% 0.981±0.009 (900) ЧРО=6.9	7.8% 0.843±0.032 (900) ЧРО=67.3	0.48% 0.993±0.007 (500) ЧРО=2.5	0.61% 0.900±0.020 (600) ЧРО=41.1		
1% ara	4.5% 0.986±0.008(1200) ЧРО=5.0	4.3% 0.944±0.017 (1220) ЧРО=21.3	0.11% 0.996±0.004 (900) ЧРО=1.5	0.09% 0.984±0.008(700) ЧРО=5.8		

С помощью тонкой регуляции арабинозного промотора выявлена зависимость ингибирующего эффекта от уровня экспрессии белков RecX. Белок RecXNg действительно в 2-4 раза эффективнее подавляет рекомбиногенность любого из белков RecA, чем белок RecXEс.

Молекулярные механизмы подавления рекомбинации белком RecX.

Белок SSB обязательно используется *in vitro* в ходе реакции обмена нитей ДНК, так как он сопровождает фактически все этапы реакции. Таким образом, с учетом этих обстоятельств, становится актуальным исследование роли белка SSB в процессе ингибирования активности белка RecA белком RecX. Нуклеация RecA сильно замедляется в исходном присутствии избытка SSB на ДНК (Рисунок 9). Добавление в реакцию белка RecX ожидаемо приводит к еще большему замедлению нуклеации каждого из белков RecA. Однако роль белка SSB неожиданно теперь становится стимулирующей (Рисунок 10). Увеличение концентрации SSB приводит к многократному ускорению нуклеации филамента. Обнаруженный эффект распространяется на оба белка RecA. Вместе с тем по достижении какого-то баланса стимулирующий эффект SSB достигает своего предела, так как SSB в свою очередь сам является ингибитором. Иными словами комбинация двух ингибиторов неожиданно дала эффект стимуляции.

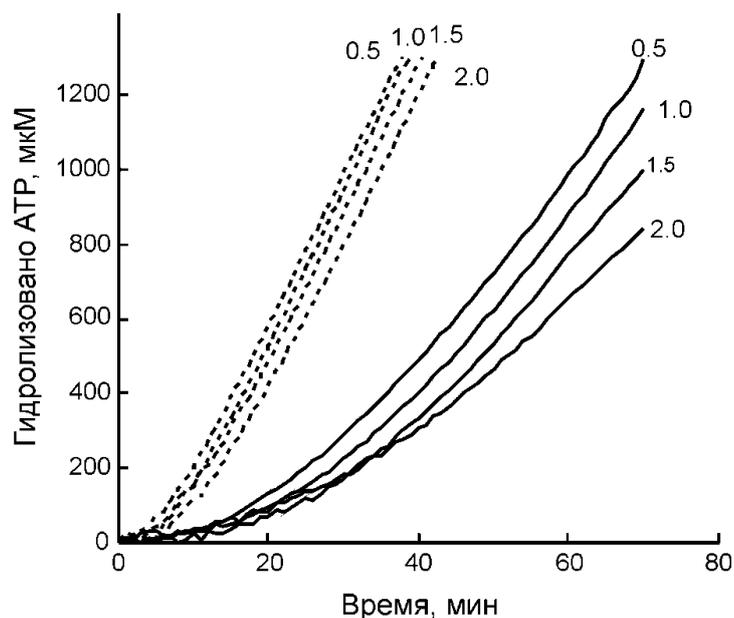


Рисунок 9. Вытеснение белка SSB белком RecA в отсутствие RecX.

В состав реакционной смеси входили: 5 мкМ оцДНК M13, 3 мкМ *RecA*Ec или *RecA* D112R и указанная на рисунке концентрация белка *SSB* (мкМ). Кольцевую оцДНК инкубировали с указанным количеством белка *SSB* в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли указанный белок *RecA* (начало реакции соответствует точке 0 по оси абсцисс). Гидролиз АТФ белком *RecA*Ec отмечен сплошной линией, *RecA*D112R- пунктирной линией.

Данный эксперимент имеет два вытекающих из него важных вывода: 1) белок *SSB* является антагонистом *RecX* 2) *RecA*D112R не только устойчив к действию *RecX*, но и *SSB*. Совместно, оба вывода автоматически инициируют гипотезу, что повышенная устойчивость *RecA*D112R к *RecX* потенциально может являться опосредованной и осуществляться благодаря его способности более эффективно конкурировать с белком *SSB* за сайты на оцДНК. Данное предположение для своей проверки требует такие экспериментальные условия, в которых возможно использование в реакции *RecA* и *RecX* в отсутствии *SSB*. Одновременно необходимо установить возможность существования или отсутствия специфических *RecX* – *SSB* взаимодействий, которые могли бы так же лежать в основе наблюдаемого эффекта.

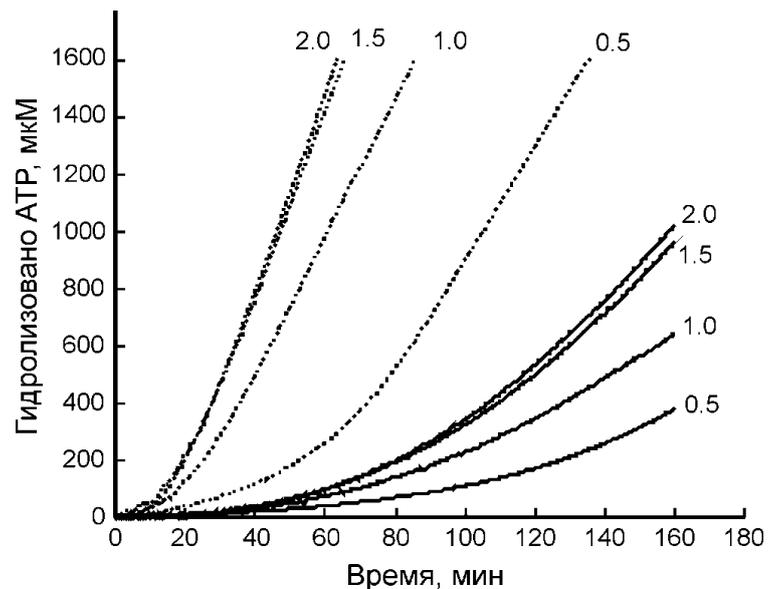


Рисунок 10. Кинетика смещения белка *SSB* с оцДНК белками *RecA* и *RecA* D112R в присутствии *RecX*.

В состав реакционной смеси входили: 5 мкМ оцДНК M13, 3 мкМ *RecA*Ec или *RecA*D112R, 75 нМ *RecX* и указанная на рисунке концентрация белка *SSB*

(μM). Кольцевую оцДНК преинкубировали с указанным белком *RecX* в течение 5 минут. После этого в реакционную смесь добавляли белок *SSB* и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 0$ в реакционную смесь добавляли белок *RecA*. Гидролиз АТФ белком *RecAEc* отмечен сплошной линией, *RecAD112R*- пунктирной линией.

Поскольку известно, что *SSB* не образует межмолекулярных взаимодействий с белком *RecA*, то его роль *in vitro* может выполнять функциональный гомолог – белок *RPA*. Известно, что белок *RPA* взаимодействует с оцДНК и способен расплавлять вторичную структуру ДНК. Белок *RPA* имеет эукариотическое происхождение, при этом не является родственным белку *SSB* и поэтому не несет гомологичных аминокислотных участков. Вместе с тем, при добавлении к *RecA* и оцДНК, *RPA* стимулирует филаментацию на участки ДНК со вторичной структурой. При этом, поскольку количество *RecA* на ДНК увеличивается, то скорость гидролиза АТФ возрастает до своего максимального значения так же как в случае с белком *SSB*. Как следует из рисунка 11, белок *RecX* ингибирует эту АТФазную активность. Однако использование дополнительной концентрации *RPA* восстанавливает скорость гидролиза АТФ до прежнего уровня. Таким образом белок *RPA* так же как и белок *SSB* является функциональным антагонистом белка *RecX*. Данный эксперимент доказывает отсутствие специфических межбелковых взаимодействий между *SSB* и *RecX*, которые могли бы повлиять на ход АТФазной реакции.

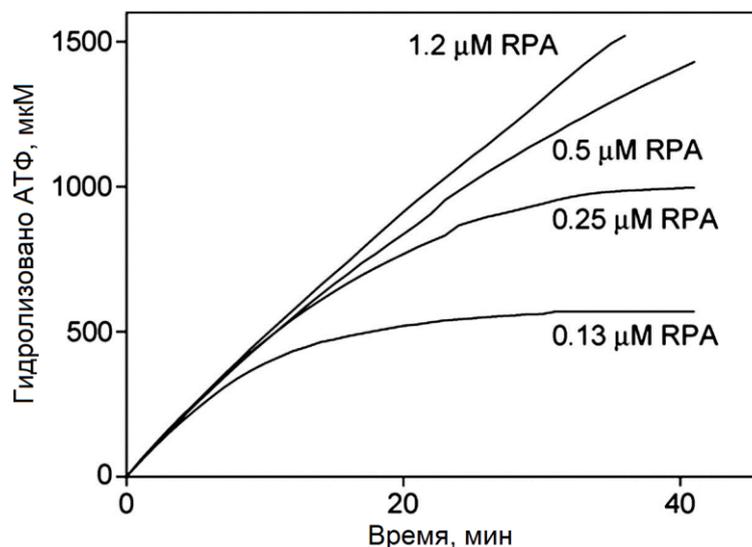


Рисунок 11. Белок RPA антагонист белка RecX.

В состав реакционной смеси входили: 5 мкМ оцДНК фага M13, 3 мкМ RecAЕс, 42 нМ белка RecX и указанная на рисунке концентрация белка RPA (мкМ). Кольцевую оцДНК инкубировали с белком RecA дикого типа в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли белок RPA и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 0$ мин в реакционную смесь добавляли белок RecXЕс.

Сопоставление данных механизма подавления с данными компьютерного моделирования комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX.

Воспроизведение структуры комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX (Рисунок 12) с использованием методов молекулярного моделирования и докинга позволило нам определить положение мутации D112R в белке RecA относительно белка RecX. В пространственных структурах этого комплекса RecX образует непосредственный контакт с шестью мономерами RecA либо с тремя мономерами RecA и оцДНК. Из этих моделей можно заключить, что минимальное расстояние от RecX до аминокислотного остатка в положении 112 в комплексе RecA::оцДНК::АТФ::RecX составляет около 28 Å, что фактически исключает возможность прямого влияния замены D112R на взаимодействие с белком RecX. Более того, ни при каких конформационных изменениях, не нарушающих структуру филамента белка RecA, аминокислотный остаток в положении 112 не может приблизиться к RecX на расстояние менее 25 - 28 Å, т.е. прямой контакт между этим аминокислотным остатком и RecX невозможен. Исходя из полученных данных, мы заключили, что в основе повышенной устойчивости RecA D112R к RecX вероятнее всего лежит изменение динамики взаимодействия филамента с оцДНК. На сегодняшний день существуют две модели, описывающие механизм ингибирования филамента белком RecX: согласно первой из них, белок RecX связывается с растущим концом филамента, который граничит с брешью, блокируя присоединение следующего мономера. Согласно второй модели, белок RecX вызывает диссоциацию мономеров от всего филамента в местах случайного связывания с RecA. Обе модели исключают активное связывание

RecX с ДНК (Drees et al., 2004b; Ragone et al., 2008). Наши результаты предполагают, что положение RecX относительно филамента и межмономерным интерфейсом RecA сильно уменьшают вероятность существования первого из описанных механизмов или кэппинг модели. С другой стороны доказательство присутствия в тройном комплекса RecX-RecA-ДНК взаимодействия выводит модель механизма ингибирования на новый уровень. Однако так как мутация D112R расположена в зоне интерфейса, не затрагивая область взаимодействий с ДНК, то эффект устойчивости к RecX может определяться лишь динамикой сборки/разборки филамента. При этом механизм конкуренции с RecX может осуществляться наподобие того, как осуществляется конкуренция с белком SSB за сайты ДНК. Тогда различие заключается лишь в том, что белок SSB конкурирует за сайты ДНК, находящейся непосредственно перед растущим концом филамента, тогда как белок RecX конкурирует за сайты ДНК расположенные внутри филамента. При этом доступ к ДНК в ходе такой конкуренции может осуществляться через большую бороздку филамента.

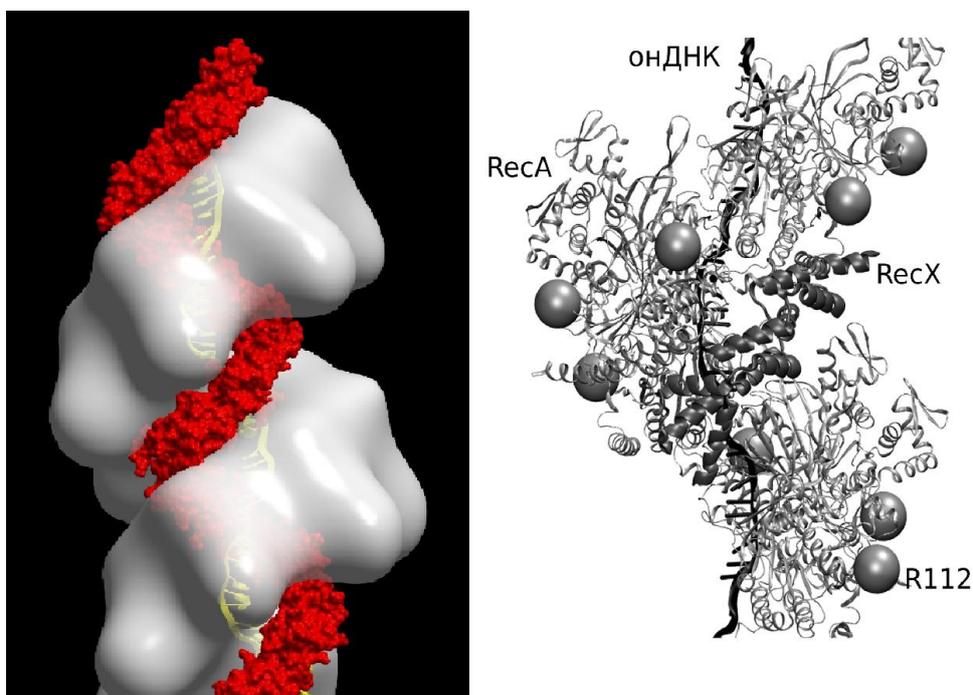


Рисунок 12. Модель комплекса RecA::оцДНК::RecX.

А. Общий вид: филамент ResA показан белым цветом, ДНК – желтый, ResX – красный. В. Расположение аминокислоты R112 относительно белка ResX и ДНК.

Молекулярная структура ResX-ResA-ДНК комплекса. В соавторстве с коллективом лаборатории биофизики макромолекул проводилось моделирование тройного комплекса белков ResA, ResX и онДНК и комплексов ResX -онДНК. Конформационная подвижность ResA, его комплексов с олигонуклеотидами и белком-регулятором изучалась путем моделирования молекулярной динамики в периодическом водном боксе с помощью пакета программ GROMACS. Полученные МД модели были оценены на соответствие с результатами измерений малоуглового рассеяния нейтронов. Кроме того, для верификации молекулярно-динамических моделей были использованы прямые измерения динамики филаментов нуклеопротеидных комплексов белка ResA на временах от наносекунд до десятков наносекунд методом нейтронного спин-эхо. В ходе работ был впервые предложен и экспериментально верифицирован комплекс белка ResX с оцДНК в виде сэндвич подобной структуры.

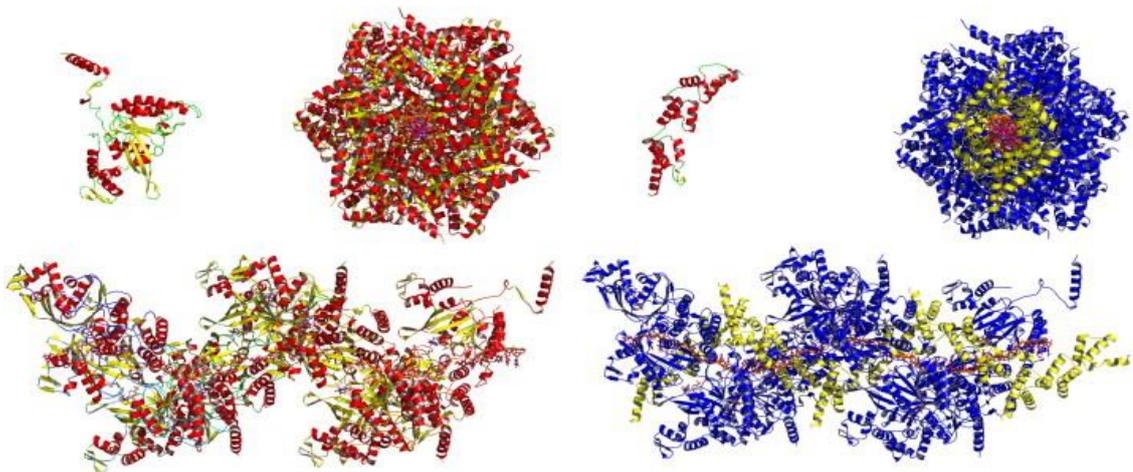


Рисунок 13. Реконструкция полноатомной структуры нуклеопротеинового комплекса в продольной и поперечной проекции. Слева представлен комплекс ResA-онДНК, справа ResA-ResX-оцДНК. Белок ResX обозначен желтым цветом, ResA синим, а ДНК красным. Сверху показаны мономеры белков, тогда как нуклеопротеиновый комплекс, представленный в обеих проекциях, включает 5 мономеров ResX и 12

мономеров *RecA*.

Молекулярное и компьютерное моделирование подтвердило несколько важных обстоятельств. Белок *RecX* может самостоятельно связываться с оцДНК с помощью электростатических взаимодействий. В нуклеопротеиновом комплексе между белком *RecX* и филаментом, кроме *RecA-RecX* межбелковых взаимодействий сохраняются те же самые электростатические взаимодействия между *RecX* и ДНК. Выделены отдельные альфа спирали белка *RecX* и определено их пространственное расположение относительно ДНК и *RecA* (Рисунок 13). На основе полученных нами данных по структуре комплекса белков *RecA-RecX-оцДНК*, с использованием программного пакета Molsoft ICM Pro, нами были выделены α -спиральные участки белка *RecX*, принимающие участие во взаимодействии как с белком *RecA*, так и оцДНК (Рисунок 14).

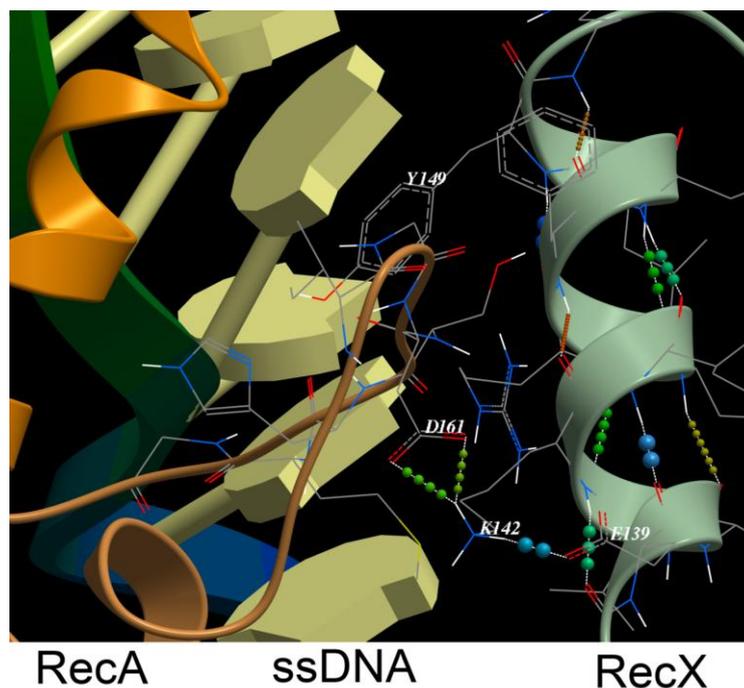


Рисунок 14. Расположение *RecA*, *RecX* о оцДНК относительно друг друга. Анализ функциональной активности модифицированных α -спиральных участков белка *RecX*.

Небольшие пептидные фрагменты, представляющие функциональные участки природных ингибиторов являются одними из лучших кандидатов для достижения блокирования SOS-ответа у бактерий (Estieu-Gionnet et al., 2011).

Белок RecX входит в число наиболее очевидных объектов для поиска таких пептидных фрагментов. Наиболее предпочтительным кандидатом был выбран участок RecX с номерами аминокислотных позиций между 137 и 153, имеющий ряд межмолекулярных водородных связей с белком RecA и интеркалирование оснований онДНК (рисунок 14). Однако, короткие аминокислотные последовательности природных альфа-спиралей обычно не обладают достаточной конформационной стабильностью. Поэтому для конструирования пептидов с высокой конформационной стабильностью был использован метод SEQOPT (Petukhov et al., 2009). С помощью этого метода производилась оптимизация аминокислотной последовательности альфа-спирали RecX, содержащей 18 аминокислотных остатков. Остатки E139, K140, V141, K142, I143, R145, L147, L148, Y149 и R150 были зафиксированы неизменными, как в исходном фрагменте белка RecX, а остальные 8 остатков варьировались алгоритмом SEQOPT с целью повышения конформационной стабильности структуры.

Таблица 3. Оптимизация аминокислотной последовательности

#AA	Последовательность а.к.	НС, % (<i>theor.</i>)	НС, % (<i>exp.</i>)
	136-137-138-139-140-141-142-143-144-145-146-147-148-149-150-151-152-153		
RecX	Val-Phe-Ser-Glu-Lys-Val-Lys-Ile-Gln-Arg-Phe-Leu-Leu-Tyr-Arg-Gly-Tyr-Leu	3.9	<i>Non soluble</i>
4E1	Glu-Glu-Glu- <u>Glu-Lys-Val-Lys-Ile</u> -Leu- <u>Arg</u> -Tyr- <u>Leu-Leu-Tyr-Arg</u> -Leu-Ile-Tyr	84.7	76
Pep2	Glu-Arg-Glu- <u>Glu-Lys</u> -Glu- <u>Lys</u> -Arg-Arg- <u>Arg</u> -Glu-Glu-Glu- <u>Tyr-Arg</u> -Arg-Arg-Met	91.1	81
Pep3	Glu-Leu-Glu- <u>Glu-Lys-Val-Lys</u> -Arg-Leu- <u>Arg</u> -Glu-Glu- <u>Leu-Tyr-Arg</u> -Arg-Ile-Met	84.9	81
Pep4	Glu-Glu-Glu- <u>Glu-Lys</u> -Arg- <u>Lys</u> -Arg-Leu- <u>Arg</u> -Glu-Glu- <u>Leu-Tyr-Arg</u> -Arg-Ile-Met	93.1	86

Было проанализировано 279 последовательностей белков RecX из разных бактерий с целью выявления консенсусного мотива, который консервативен в подавляющем большинстве молекул. Такой консенсус мотив был найден. Аминокислоты, входящие в состав консенсус мотива оставлены в пептиде 4E1 неизменными. Одновременно было сгенерировано три дополнительных

контрольных пептида, обладающих хорошей конформационной стабильностью и растворимостью, но имеющих нарушение консенсус мотива (таблица 3). Эти контрольные пептиды тестировались во всех последующих экспериментах одновременно с пептидом 4E1, который обладал ингибирующей активностью по отношению к рекомбиназе (Рисунок 15).

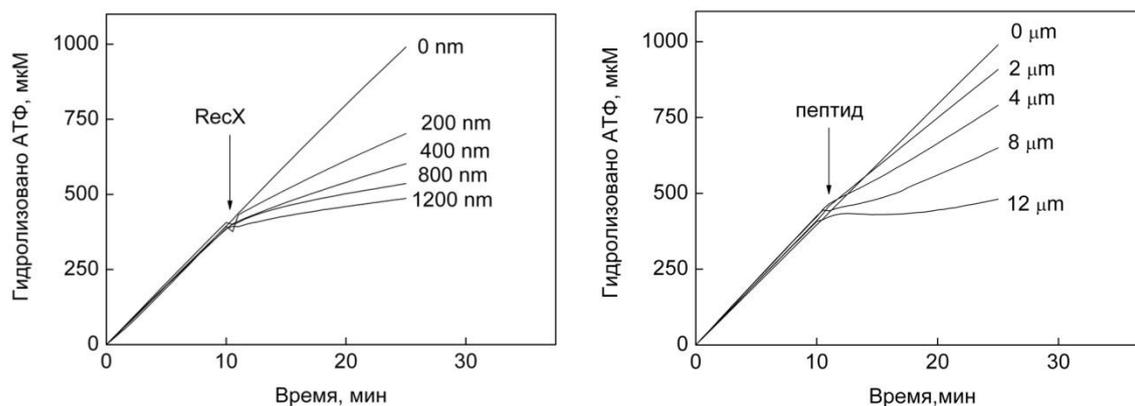


Рисунок 15. Сравнительное влияние белка *RecX* и пептида 4E1 на поли(дТ) зависимую АТФазную активность *RecA*.

В состав реакционной смеси входили: 5 мкМ поли(дТ), 3 мкМ *RecA*Ec и указанная на рисунке концентрация белка *RecX* (нМ) или пептида 4E1 (мкМ). Реакция инициировалась добавлением указанного количества *RecA* в смесь, содержащую поли(дТ). В момент времени $t = 10$ минут в реакционную смесь добавляли белок *RecX* либо пептид.

Выявлена способность пептида ингибировать АТФазную активность белка *RecA* из *Pseudomonas aeruginosa* и *Deinococcus radiodurans* (Рисунок 16). Этот результат хорошо согласуется с предыдущим наблюдением о том, что белки *RecX*Ec и *RecX*Dr способны комплементировать друг друга *in vivo* и *in vitro*.

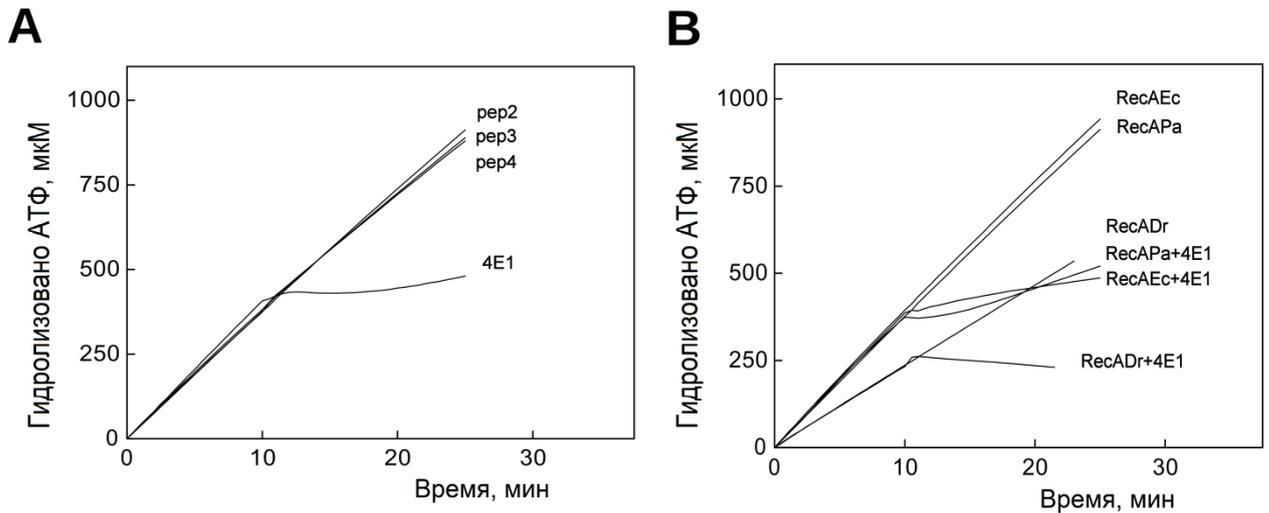


Рисунок 16. Влияние пептида 4E1 на поли(дТ) зависимую АТФазную активность RecA.

Ингибирующие свойства активного пептида подтверждали с помощью одномолекулярной техники. На рисунке 17 представлена полученная экспериментальная зависимость изменения длины молекулы ДНК в присутствии RecA, до и после добавления пептида 4E1 с оптимизированной аминокислотной последовательностью. Так как связывание RecA приводит к увеличению длины ДНК на величину порядка 50% по сравнению с В-формой спирали, в ходе построения филаментов RecA на ДНК происходит постепенное увеличение ее длины. Соответственно, диссоциация RecA приводит к сокращению длины ДНК до исходной величины.

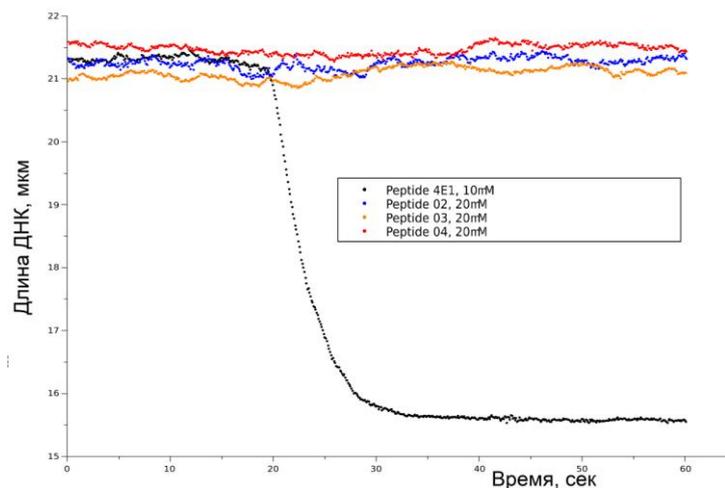


Рисунок 17. Динамика изменения длины ДНК при формировании филаментов RecA и последующей разборки филаментов в результате

добавления пептида 4E1 с оптимизированной аминокислотной последовательностью.

В присутствии данного пептида рост филаментов RecA прекращался. При этом наблюдалось постепенное уменьшение длины ДНК до исходной, что свидетельствует о том, что исследуемый пептид 4E1 препятствует связыванию RecA с ДНК и стимулирует диссоциацию RecA от ДНК. Данное наблюдение указывает на то, что полученный пептид 4E1 способен ингибировать активность RecA на стадии формирования пресинаптического комплекса, препятствуя связыванию RecA с ДНК. Однако чтобы доказать, что ингибирование пептидом проходит специфически по сайту взаимодействия белка RecX с бороздкой филамента был проведен эксперимент по конкурентному связыванию (Рисунок 18). Ранее было показано, что взаимодействия белка DinI либо белка RecX с филаментом являются взаимоисключающими. Оба регуляторных белка взаимодействуют по одному и тому же сайту в бороздке филамента. Предпочтение зависит от соотношений концентраций. При достаточном избытке белка DinI в бороздке филамента, места для связывания белка RecX либо его небольшой пептидной части не остается. При этом ингибирующий эффект пептида нивелируется полностью.

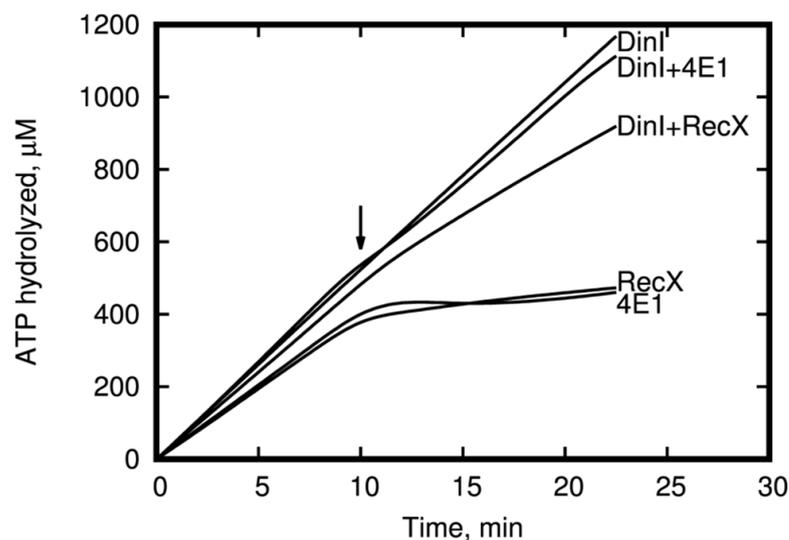


Рисунок 18. Антагонистическое влияние белка DinI на ингибирующий эффект белка RecX либо пептида 4E1.

Чтобы доказать способность пептида 4E1 функционировать в бактериальных клетках, были проведены эксперименты в естественных условиях. Известно, что супрессия рекомбиназной активности зависит от уровня экспрессии в белка RecX в клетках *E.coli*. Высокая концентрация RecX резко снижает способность клеток к выживанию под воздействием больших доз ультрафиолетового излучения, а так же снижает SOS-ответ (Stohl et al., 2003). Для измерения SOS-ответа в присутствие активного пептида использовали тот же метод, что и для мутантов *recA*, описанных выше. Ген бета-галактозидазы встроен под промотор *sfiA* таким образом, что о силе SOS-ответа можно судить по количеству выработанной бета-галактозидазы. Промотор *sfiA* (*sulA*) гена является наиболее чувствительным промотором в ходе индуцируемого SOS-ответа.

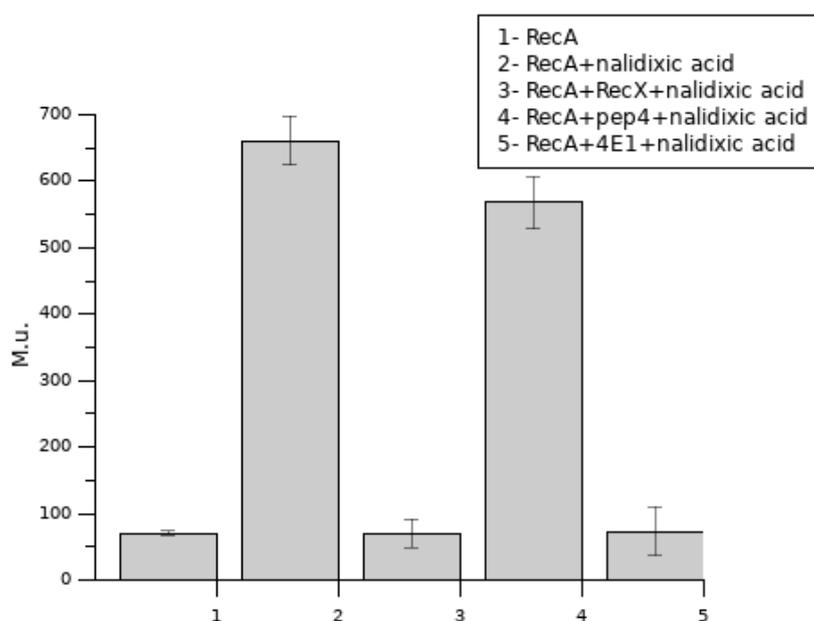


Рисунок 19. Величина SOS-ответа при воздействии на бактериальные клетки налидиксовой кислоты.

Активность белка рассчитывали в условных единицах в соответствии со стандартными рекомендациями (Miller, 1972)

Экспрессия белка RecX либо пептида 4E1 подавляет активность RecA и приводит к ингибированию SOS-ответа почти до базовых значений (Рисунок 19). Из этого следует, что пептид 4E1 подавляет SOS-ответ, а вместе с ним и экспрессию всех генов SOS-ответа, включая полимеразу PolV. Полимераза

PoIV является причиной множественного мутагенеза, то есть образует мутации, которые в свою очередь являются материалом для селективного отбора новых генов и последующей адаптации бактерии к антибиотикам. Процесс трансформации экзогенной ДНК в хромосому, который предопределяет горизонтальную передачу генов резистентности от бактерии к бактерии, так же является RecA- зависимым (Le et al., 2017).

Так как модифицированный пептид взаимодействует с нитью ДНК таким же образом, что аминокислотный сегмент 139-150 белка RecX, то согласно структуре межмономерная зона интерфейса остается незатронутой. Этот факт предполагает более высокий уровень сложности модели регуляции филамента белком RecX, чем просто терминация полимеризации в 5'-3' направлении. По крайней мере, ясно, что пептид 4E1 находится достаточно далеко от межмономерного пространства, чтобы препятствовать ассоциации нового мономера к концевому мономеру. Таким образом, наши данные ставят под сомнение господствующие в литературе представления о том, что белок RecX препятствует сборке филамента с 3'-растущего конца. Полученный результат предполагает, что связывание α -спиральных пептидов в большую бороздку филамента достаточно, чтобы существенно дестабилизировать нуклеопротеиновый комплекс. При этом, теоретически, дестабилизация может быть так же результатом того, что ингибитор прерывает волну кооперативного гидролиза АТФ вдоль филамента. Действительно, количества белка RecX для того чтобы развалить филамент RecA требуется на два или три порядка меньше, чем самого RecA. Если предположить, что в процессе взаимодействия филамента с RecX нарушается кооперативная передача межмономерных конформационных превращений далее вдоль по филаменту, то можно допустить сбой АТФазного цикла теми мономерами RecA, которые не входят в непосредственный контакт с RecX. В свою очередь падение афинности к АТФ либо накопление мономеров заряженных молекулами АДФ должно неизбежно приводить к разваливанию филамента. Молекулярное моделирование в совокупности с экспериментами

по малоугловому рассеянию подтверждают, что взаимодействие RecX с ДНК носит специфический характер. Кроме того, эксперименты выявили, что белок SSB является антагонистом белка RecX при видимом отсутствии специфических белок-белковых взаимодействий между ними. В совокупности, эти данные позволяют делать вывод о том, что RecX-ДНК взаимодействия являются важным элементом молекулярного механизма ингибирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рекомбиногенный потенциал бактериальных клеток зависит от множества факторов, среди которых наиболее важными являются рекомбинационные функции, присущие самому белку RecA. Точечные мутации в RecA, особенно в области высоко консервативных аминокислотных остатков, могут оказывать значительное влияние на наблюдаемую частоту рекомбинационных обменов *in vivo*. Увеличение рекомбиногенности, достижимое благодаря некоторым мутантным белкам RecA, оказалось существенно бóльшим в абсолютных величинах, чем эффект, налагаемый любым из вспомогательных белков или даже всем SOS регулоном сразу. Неожиданно, эффект одного из негативных регуляторов рекомбинации, белка RecX, оказался также очень значительным. Данное наблюдение заставило задуматься о назначении этого белка в клетке и молекулярном механизме его действия. Отличительной особенностью большинства гиперрекомбиназ оказалась повышенное свойство мультимеризоваться на однонитевой ДНК, вытесняя при этом белок SSB. В действительности белок SSB является единственным активным конкурентом белку RecA при конъюгации, так как его внутриклеточная концентрация в этот момент близка к максимальной (Meyer, Laine, 1990). Инициация рекомбинационных событий требует, чтобы RecA мог преодолеть барьер в виде SSB. Таким образом, сложившаяся у большинства исследователей точка зрения на гиперрекомбиногенный потенциал RecA сводится главным образом к способности RecA филаментировать или, иначе говоря, афинности к ДНК. Наши наблюдения впервые свидетельствуют о том, что такая функция белка RecA как поиск гомологии и переключение спаренности оснований цепи ДНК также может быть источником гиперрекомбиногенности. Мутация D112R приводящая к пятидесятикратному увеличению рекомбиногенности, является примером того, что рекомбинационный потенциал RecA не ограничен лишь способностью белка филаментировать на однонитевой ДНК. Однако

стремительное вырождение гиперрекомбиногенного фенотипа наблюдается в течение всего нескольких десятков поколений. Важным результатом исследования являются данные о том, что большинство супрессорных мутаций возникает не в самом гене *recA*, а в регуляторных участках хромосомы оказывающих влияние на величину экспрессии белка. Причиной негативной селекции гиперрекомбиногенного фенотипа является избыточная ДНК-связывающая активность мутантного белка, которая приводит к задержке метаболизма ДНК и как следствие задержке роста бактериальной популяции. Таким образом, эволюция поддерживает баланс между различными аспектами метаболизма ДНК находя компромисс между уровнем активности сразу многих белков рекомбинации и репарации. Интересно, что восстановление скорости роста бактерий, испытывающих гиперрекомбинацию, оказалось возможным при коэкспрессии белка RecX с белком RecA. Данное наблюдение проливает свет на роль или назначение этого невероятно эффективного ингибитора во внутриклеточных процессах. В соавторстве с коллективом лаборатории биофизики макромолекул проведено моделирование тройного комплекса белков RecA, RecX и оцДНК и комплексов RecX -оцДНК. Конформационная подвижность RecA, его комплексов с олигонуклеотидами и белком-регулятором изучалась путем моделирования молекулярной динамики в периодическом водном боксе с помощью пакета программ GROMACS. Был проведен структурно-функциональный анализ белка RecX, благодаря чему удалось выявить функционально-активный центр белка RecX. Впервые с помощью программы SEQOPT разработан биотехнологический подход, благодаря которому этот функционально-активный фрагмент белка RecX может быть использован как ингибитор белков RecA и SOS ответа бактериальной клетки. Последнее десятилетие характеризуется экспоненциально повышающимся интересом к небольшим молекулам, которые могли бы на генетическом уровне остановить адаптацию бактерий к разрабатываемым антибиотикам. Возможно, что этот или подобные пептидные фрагменты смогут остановить

бесконечное состязание между адаптацией бактерий и индустрией антибиотиков. В работе впервые продемонстрировано, что такие молекулы могут эффективно функционировать *in vivo*. Более того, используя накопленную информацию о других негативных регуляторах, таких как DinI, UmuD, LexA, и λ – репрессор, представляется перспективным расширение накопленного в этой работе опыта для повышения практической значимости подобных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы аминокислотные замены в участке 170-250 аминокислоты, С-концевого субдомена, а также участка межмономерного взаимодействия белка RecA, которые влияют на увеличение частоты рекомбинационных обменов. Определен верхний предел гиперрекомбинационности 37-50 раз, вызванный аминокислотными заменами – D112R и R28A.
2. Показано, что гиперрекомбинация может являться следствием не только уровня SOS ответа, но так же следствием измененных свойств рекомбиназы либо регуляторных белков. Гены *recF*, *recO*, *recR*, *dinI* *recX*, *mutS* оказывают влияние на конъюгационную рекомбинационность, изменяя частоту рекомбинационных обменов.
3. Показано, что активность гиперфункциональных вариантов RecA является следствием динамика полимеризации мономеров на ДНК либо увеличению синаптной активности филамента.
4. Установлено, что гиперрекомбинационный фенотип вырождается в ряду клеточных генераций. Определено, что механизм негативной селекции основан на замедлении роста клеток. Выявлен механизм генетической адаптации клеток в ходе селекции, который сопровождается падением экспрессии RecA из-за мутаций в регуляторных участках ДНК.
5. Показана роль белка RecX в восстановлении клеточного роста благодаря вытеснению рекомбиназы с хромосомной ДНК. Предложен механизм,

благодаря которому белок SSB регулирует функциональную активность белка RecX через конкуренцию за сайты на оцДНК.

6. Предложена модель ингибирования филамента RecA белком RecX. На основании новой модели выделен участок 139-150 а.к. белка RecX, который участвует во взаимодействии с ДНК и является ключевым для подавления активности RecA. Функционально-активный фрагмент белка RecX может быть использован как ингибитор белков RecA и SOS ответа бактериальной клетки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Alexseyev A.A., **Baitin D.M.**, Kuramitsu S., Ogawa T., Ogawa H., & Lanzov V.A. A recombinational defect un the C-terminal domain of *Escherichia coli* RecA2278-5 protein is compemsated by protein binding to ATP // *Moleculat Microbiology*. 1997. – V. 23. – N. 2. – P. 255–265.
- 2) Namsaraev E.A., **Baitin D.**, Bakhlanova I.V., Alexseyev A.A., Ogawa H. and Lanzov V.A. Biochemical basis of hyper-recombinogenic activity of *Pseudomonas aeruginosa* RecA protein in *Escherichia coli* cells // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 27. – P. 727–738.
- 3) Петухов М.Г., **Байтин Д.М.**, Киль Ю.В., Ланцов В.А. Оптимальная жесткость белковой структуры: три класса жесткости у семейства белков RecA эубактерий // *Доклады Академии наук.* – 1998. – Т. 362. – № 1. С. 118–121.
- 4) **Байтин Д.М.**, Ланцов В.А. Рекомбиногенность бактериального белка RecA сопряжена со стабильностью его нуклеопротеинового комплекса // *Доклады Академии наук.* – 2000. – Т. 371. – № 2. С.248–250.
- 5) **Baitin D. M.**, Zaitsev E. N., Lanzov V. A. Hyper-recombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* with enhanced activity of its primary DNA binding site // *Journal of molecular biology.* – 2003. – V. 328. – P. 1–7.

- 6) **Baitin D.M.**, Bakhlanova I.V., Kil Y.V., Cox M.M., Lanzov V.A.
Distinguishing characteristics of hyperrecombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* acting in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. –2006. – V. 188. –P. 5812–5820.
- 7) **Baitin D.M.**, Bakhlanova I.V., Chervyakova D.V., Kil Y.V., Lanzov V.A., Cox M.M. Two RecA protein types that mediate different modes of hyperrecombination // J. Bacteriol. – 2008. –V. 190. – P. 3036–3045.
- 8) **Baitin D.M.**, Gruenig M.C., Cox M.M. SSB antagonizes RecX-RecA interaction <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385131> // J. Biol. Chem. –2008–V. 283. –P. 14198–14204.
- 9) Дудкина А.В., Бахланова И.В., **Байтин Д.М.** Новый механизм увеличения частоты рекомбинационных обменов путем повышения синаптной активности белка RecA из *E. coli* // Доклады Академии наук. 2010. – Т. 432. – № 5. – С. 702–704.
- 10) Bakhlanova I.V., Dudkina A.V., **Baitin D.M.**, Knight K.L., Cox M.M., Lanzov V.A. Modulating cellular recombination potential through alterations in RecA structure and regulation // Mol. Microbiol. – 2010. – V. 78. – P. 1523–1538.
- 11) Дудкина А.В., Швецов А.В., Бахланова И.В., **Байтин Д.М.** Изменение динамики филаментации белка RecA, вызванное аминокислотной заменой D112R либо замещением АТР на dАТР, приводит к устойчивости филамента к действию белка RecX // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. – С.546–553.
- 12) Бахланова И.В., Дудкина А.В., **Байтин Д.М.** Энзиматический контроль гомологической рекомбинации и гиперрекомбинации в клетке *E. coli* // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – № 2. – С. 205–217.
- 13) Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Chervyakova D.B., Bakhlanova I.V., Yung I.A., Kuklin A.I., Radulescu A., **Baitin D.M.**, Isaev-Ivanov V.V. Structure of RecX protein complex with the presynaptic RecA filament: Molecular dynamics

- simulations and small angle neutron scattering // FEBS Letters. – 2014. – V. 588. – P. 948–955.
- 14) Pobegalov G., Cherevatenko G., Alekseev A., Sabantsev A., Kovaleva O., Vedyaykin A., Morozova N., **Baitin D.**, Khodorkovskii M. *Deinococcus radiodurans* RecA nucleoprotein filaments characterized at the single-molecule level with optical tweezers. Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2015. – V. 466(3). – P. 426–30.
- 15) Bakhlanova I.V., Dudkina A.V., Wood E.A., Lanzov V.A., Cox M.M., **Baitin D.M.** DNA Metabolism in Balance: Rapid Loss of a RecA-Based Hyperrec Phenotype // PLoS One. – 2016. – V. 11(4): e0154137.
- 16) Бахланова И.В., **Байтин Д.М.** Белки RecX *Deinococcus radiodurans* и RecX *Escherichia coli* способны замещать друг друга *in vivo* и *in vitro* // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 3. – С. 1–7.
- 17) Бахланова И.В., **Байтин Д.М.** Рекомбиногенный потенциал белков RecA: эволюционные возможности и последствия для бактериальной клетки // Цитология. – 2016. – Т. 58. – С. 817–824.
- 18) Yakimov A., Pobegalov G., Bakhlanova I., Khodorkovskii M., Petukhov M. and **Baitin D.** Blocking the RecA activity and SOS-response in bacteria with a short -helical peptide // Nucleic Acids Research. –2017. – V. 45. – P. 9788–9796.
- 19) **Байтин Д.М.**, Бахланова И.В., Петухов М.Г., Побегалов Г.Е., Ходорковский М.А., Якимов А.П. Патент 2016127595/10(043247). Семейство пептидов ингибиторов активности белка RecA, блокирующих SOS ответ у бактерий

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campbell M.J., Davis R.W. 1999. Toxic mutations in the *recA* gene of *E. coli* prevent proper chromosome segregation. *J. Mol. Biol.* **286**, 417–435.
2. Cazaux C., Mazard A.M. and Defais M. Inducibility of the SOS response in a *recA730* or *recA441* strain is restored by transformation with a new *recA* allele // *Mol. Gen. Genet.* – 1993. – V.240. – P.296–301.
3. Chen Z., Yang H. and Pavletich N.P. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures // *Nature.* – 2008. – V.453. – P.489–454.
4. Chervyakova D., Kagansky A., Petukhov M. and Lanzov V. [L29M] substitution in the interface of subunit-subunit interactions enhances *Escherichia coli* RecA protein properties important for its recombinogenic activity. // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V.314. – P.923–935.
5. Clark A.J. and Margulies A.D. Isolation and characterisation of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K12 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1965. – V.53. – P.451–459.
6. Cox M.M. and Lehman I.R. Directionality and polarity in RecA protein-promoted branch migration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – V.78. – P.6018–6022.
7. Drees J.C., Lusetti S.L., Chitteni-Pattu S., Inman R.B., and Cox M.M. A RecA filament capping mechanism for RecX protein. // *Mol. Cell.* – 2004b. – V.15. – P.789–798.
8. Egger A.L., Lusetti S.L. and Cox M.M. The C terminus of the *Escherichia coli* RecA protein modulates the DNA binding competition with single-stranded DNA-binding protein // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.16389–16396.
9. Eldin S., Forget A.L., Lindenmuth D.M., Logan K.M. and Knight K.L. Mutations in the N-terminal region of RecA that disrupt the stability of free protein oligomers but not RecA-DNA complexes // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V.299. – P.91–101.

10. Estieu-Gionnet K, Guichard G. Stabilized helical peptides: overview of the technologies and therapeutic promises // *Expert Opin Drug Discov.* –2011. – V.6. –P.937–63.
11. Galkin V.E., Britt R.L., Bane L.B., Yu X., Cox M.M., Egelman E.H. Two modes of binding of DinI to RecA filament provide a new insight into the regulation of SOS response by DinI protein // *J. Mol. Biol.* –2011. –V. 408. – P.815–824.
12. Galletto R. and Kowalczykowski S.C. RecA // *Curr. Biol.* –2007. –V. 17(11). – P.395–397.
13. Gupta R.C., Golub E.I., Wold M.S. and Radding C.M. Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V.95. – P. 9848–9848.
14. Jones A.L., Barth P.T. and Wilkins B.M. Zygotic induction of plasmid *ssb* and *psiB* genes following conjugative transfer of Inc11 plasmid Collb-P9 // *Mol. Microbiol.* – 1992. – V.6. – P.605–613.
15. Lanzov V.A., Bakhlanova I.V., Clark A.J. Conjugational hyperrecombination achieved by derepressing the LexA regulon, altering the properties of RecA protein and inactivating mismatch repair in *Escherichia coli* K-12 // *Genetics.* – 2003. –V. 163. –P. 1243–1254.
16. Le S., Serrano, E., Kawamura, R., Carrasco, B., Yan, J., & Alonso, J. C. *Bacillus subtilis* RecA with DprA–SsbA antagonizes RecX function during natural transformation // *Nucleic acids research.* – 2017. – T. 45. – №. 15. – C. 8873–8885.
17. Lusetto S.L, Shaw J.J. and Cox M.M. Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.16381–16388.
18. Madiraju M.V., Lavery P.E., Kowalczykowski S.C. and Clark A.J. Enzymatic properties of the RecA803 protein, a partial suppressor of *recF* mutations // *Biochemistry.* – 1992. – V.31. – P.10529–10535.

19. Masters M., Colloms M.D., Oliver I.R., He L., Macnaughton E.J., Charters Y. The *pcnB* gene of *Escherichia coli*, which is required for colE1 copy number maintenance, is dispensable. // J Bacteriol. –1993. –V.175–P.4405–4413.
20. Meyer R.R., Laine P.S. The single-stranded DNA-binding protein in *Escherichia coli* // Molbiol. Rev. – 1990. – V.54. – P.342–380.
21. Petukhov, M. et al. Design of stable alpha-helices using global sequence optimization // J Pept Sci. –2009. –V. 15. –P.359–365.
22. Roca A.I., Cox M.M. The RecA protein: structure and function. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. –1990. –V.25. –P.415–456.
23. Ragone S., Maman J.D., Furnham N., Pellegrini L. Structural basis for inhibition of homologous recombination by the RecX protein // EMBO J. – 2008. – V.27. – P.2259–2269.
24. Sano Y. Role of the *recA*-related gene adjacent to the *recA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 1993. – V.175. – P.2451-2454.
25. Stohl E.A., Brockman J.P., Burkle K.L., Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. and Siefert H.S. *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo* // J. Biol. Chem. – 2003. – V.278. – P.2278.
26. Stohl E. A., Blount L., Seifert H. S. Differential cross-complementation patterns of *Escherichia coli* and *Neisseria gonorrhoeae* RecA proteins //Microbiology. – 2002. – T. 148. – №. 6. – C. 1821–1831.
27. Story R.M., Weber I.T. and Steitz T.A. The structure of the *Escherichia coli* RecA protein monomer and polymer // Nature. – 1992. – V.355. – P.318–325.
28. Zlotnic A., Mitchell R.S., Steed R.K. and Brenner S.L. Analysis of two distinct single-stranded DNA binding sites on the RecA nucleoprotein filament // J. Biol. Chem. - 1993. – V.268. – P.22525–22530.