

НИЦ «Курчатовский институт»
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова

На правах рукописи

Байтин Дмитрий Михайлович

Молекулярные механизмы регуляции активности белка ResA

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Центральная роль белка RecA в гомологической рекомбинации	13
1. 2. Структурные особенности белка RecA	15
1.3.1 Афинность RecA к оцДНК	20
1.3.2 Взаимодействие белка RecA с дцДНК	23
1.3.3 Сборка и разборка мономеров RecA в филаменте	26
1.4. ДНК-зависимый гидролиз АТФ	32
1.5. Перенос гомологичной нити ДНК	37
1.6.1 Метаболизм клетки в ходе SOS ответа	42
1.6.2 Белки RecBCD и RecFOR систем рекомбинации	45
1.6.3 Конститутивный SOS-ответ	49
1.6.4 Белок RecX и его роль в гомологической рекомбинации	51
1.7.1 Конъюгационная рекомбинация	55
1.7.2 Направленная эволюция рекомбиногенности в ходе конъюгации	58
1.7.3 Роль RecA в радиорезистентности и направленная эволюция	61
1.8. RecA из экстремофильной бактерии <i>Deinococcus radiodurans</i>	67
1.9. Антибактериальные препараты на основе ингибиторов SOS ответа	69
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды	73
2.12 Среды	74
2.13 Ферменты и реактивы	74
2.14 Манипуляции с ДНК	75
2.2. Рекомбинационный тест	75
2.21 Определение частоты рекомбинационных обменов	77
2.22 SOS-хроматест	78

2.23 Выживаемости клеток в зависимости от дозы УФ-излучения	79
2.4. Подготовка ДНК для исследования рекомбиназных активностей	80
2.5. Трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК	81
2.6. Подготовка хроматографических носителей к выделению белков	81
2.6.1 Выделение и очистка белков	85
2.7. Реакции, катализируемые белками RecA	87
2.8. Статистическая обработка результатов	90
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
3.1. Конъюгационная гиперрекомбинация	91
3.1.2 Связь рекомбиногенности и экспрессии SOS-функции	98
3.1.3 Биохимические особенности белков RecAPa и RecA53	100
3.1.4 RecAD112R зависимая рекомбиногенность	110
3.2. Негативная селекция гиперрекомбиногенного фенотипа	112
3.3.1 Белок RecX – индуцируемая гипорекомбиногенность	123
3.3.2 Молекулярные механизмы подавления рекомбинации белком RecX	128
3.3.3 Сопоставление данных механизма подавления с данными компьютерного моделирования комплекса RecA::оцДНК::RecX	137
3.3.4 Комплементация белков RecXDr и RecXEc in vitro и in vivo	139
3.3.5 Исследование ДНК-RecADr комплекса с помощью одномолекулярной техники	144
3.4.1 Молекулярная структура RecX-RecA-ДНК комплекса	148
3.4.2 Анализ функциональной активности модифицированных α -спиральных участков белка RecX	149
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	164
ВЫВОДЫ	167
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	169
ЛИТЕРАТУРА	173
БЛАГОДАРНОСТИ	205

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АК – аминокислота

АП - аминопептид

АТФ – аденозинтрифосфат

АТФ- γ -S - аденозин-5'-О-(3-тиотрифосфат), слабо гидролизуемый аналог АТФ

АДФ- AlF_4 - аденозин-5'-О- AlF_4 , негидролизуемый аналог АТФ

ГР – гомологическая рекомбинация

ГТФ – гуанозинтрифосфат

дАТФ – дезоксиаденозин-5'-О-(3-тиотрифосфат)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дУТФ - дезоксиуридин-5'-О-(3-тиотрифосфат)

дЦТФ - дезоксицитидин-5'-О-(3-тиотрифосфат)

ИТФ - ионзинтрифосфат

кп – конечный продукт реакции переноса нити (кольцевая никированная дцДНК)

н. - нуклеотид

ОНФГ - *o*-нитрофенил- β -D-галактозид

п. н. – пара нуклеотидов

ПТФ – пуринтрифосфат

см – сцепленные молекулы, интермедиаты (в реакции переноса нити)

СХ – соединение Холидея

тцДНК – триплексная ДНК

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

УТФ – уридинтрифосфат

УФ – ультрафиолетовый свет

ЦТФ – цитидинтрифосфат

АМРPNP – аденилимидодифосфат

DTT – дитиотрейтол

E. coli – бактерии вида *Escherichia coli*

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

IPTG – **ИПТГ** – изопропил- β -D-тиогалактозид

JM – joint molecule – сцепленная молекула ДНК, интермедиат

k_{cat} – кинетический параметр, характеризующий скорость гидролиза АТФ

данном белком RecA, приходящуюся на единицу концентрации фермента

LD – лактат дегидрогеназа

NADH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид

PEP – фосфоенолпируват

PK – пируваткиназа

RecAEc– белок RecA из *Escherichia coli*

RecAPa– белок RecA из *Pseudomonas areuginosa*

SDS – ДСН – додецилсульфат натрия

оцДНК – одноцепочечная ДНК

дцДНК– двуцепочечная ДНК

SSB – оцДНК- связующий белок из *Escherichia coli*

Tris - Трис – трис(гидрооксиметил)аминометан (2-амино-2-гидрооксиметил-пропан-1,3-диол)

ВВЕДЕНИЕ

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 только из 20 природных аминокислот, построенных на основе белка RecX.

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.

Научно-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 мутантных белков RecA, с усиленной рекомбиназной 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.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на следующих отечественных и международных конгрессах, конференциях, симпозиумах, совещаниях и школах: “Keystone symposia”, 2007, Colorado, USA; политехнический симпозиум «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона», 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».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных статей в рецензируемых журналах, рекомендованных перечнем ВАК, 1 патент на изобретение и 7 тезисов докладов на российских и международных форумах, 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).

Личный вклад автора

Автор принимал самое непосредственное участие в получении представленных результатов, проводил анализ полученных результатов и координировал деятельность соавторов. Автор представлен в рецензируемых публикациях преимущественно на первом либо последнем месте в перечне соавторов. Значительная часть полученных результатов была поддержана грантами РФФИ, руководство которых принадлежит автору.

Достоверность полученных результатов

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

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Центральная роль белка RecA в гомологичной рекомбинации

Началом молекулярно-генетического изучения гомологической рекомбинации у прокариот стал 1965 год, когда А. Маргулис и А. Кларк описали гена *recA* у *Escherichia coli* (Clark and Margulies, 1965). Ими была показана абсолютная взаимосвязь между гомологической рекомбинации и присутствием этого гена. С тех пор RecA - является наиболее интенсивно изучаемым белком гомологической рекомбинации у прокариот.

Белок RecA задействован не только в рекомбинационном процессе, но также в процессах репарации, мутагенеза, клеточного деления, регуляции экспрессии ряда репарационных генов, натуральной трансформации экзогенной ДНК и в других процессах жизнеобеспечения клетки (Ланцов, 2007; Galletto et al., 2007). RecA-подобные белки выявлены во всех трех царствах живой природы: Archaea, Eukarya и Bacteria (Roca and Cox, 1997; Brendel et al., 1997). Такая удивительная консервативность белка в ходе эволюции объясняется его фундаментальной ролью в регуляции клеточных процессов. Ген *recA* был клонирован в 1976 г. МакЭнти (McEntee, 1976), а его белок был выделен одновременно несколькими группами (Ogawa et al., 1979; Shibata et al., 1979; Weinstock et al., 1979). Активная конформация белка RecA представлена филаментом на ДНК (рисунок 1) и необходима для реализации его основных функций в клетке: рекомбинации, SOS-индукции и SOS-мутагенеза (Bork et al., 2001).

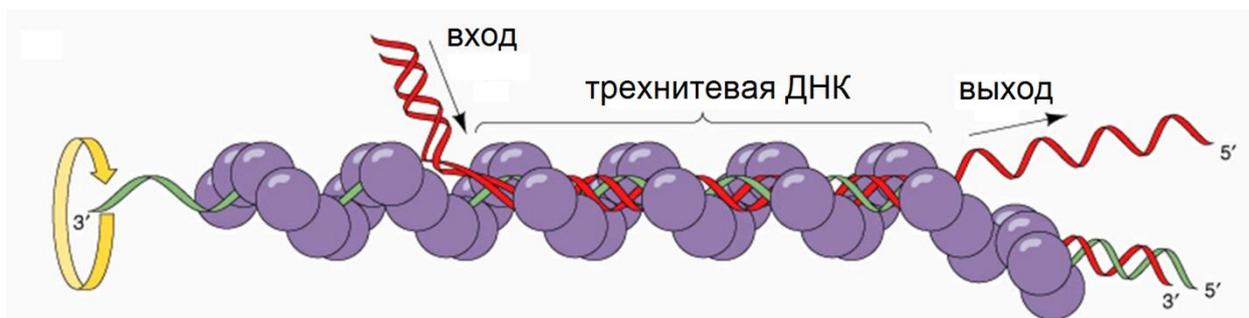


Рисунок 1. Нуклеопротеиновый комплекс: филамент RecA, привходящая нить ДНК, выходящая нить ДНК (Roca and Cox, 1990).

В ходе нормального клеточного роста белок RecA необходим при вынужденной остановке репликации, что сопровождается коллапсом репликативной вилки вблизи повреждения на оцДНК (Robu et al., 2001). При воздействии ионизирующей радиации на клетку, RecA может участвовать в репарации двунитевых разрывов. Главная функция белка RecA – поиски гомологии между двумя молекулами ДНК и обмен гомологичных нитей (Roca and Cox, 1990; Menetski et al., 1988; Ланцов, 2007; Cox, 2007; Kowalczykowski 2000; Cox et al., 2000). Этому этапу предшествует пресинаптическая стадия, в ходе которой RecA, в присутствии молекулы АТФ и магния, кооперативно мультимеризуется вдоль оцДНК. В стрессовой для клетки ситуации количество филаментов на поврежденных участках ДНК возрастает, что инициирует так называемую SOS-функцию белка. В норме SOS состояние клетки контролируется репрессорным белком LexA, который при взаимодействии с филаментом RecA начинает интенсивно саморасщепляться, и по мере того, как концентрация LexA в клетке уменьшается, промоторы генов SOS ответа открываются (Horii et al., 1981). При этом изменяется экспрессия более 40 генов, в том числе и самого гена *recA* (рисунок 2). Белки, которые экспрессируются в ходе SOS ответа, участвуют почти во всех аспектах метаболизма клетки (Courcelle et al., 2001; Schoemaker et al., 1984; Glazebrook et al., 1983). Среди них есть такие, которые участвуют в регуляции клеточного деления (SfiA), инициируют экзотоксический эффект на другие бактерии (collicin). Другие белки, такие как хеликазы и нуклеазы, преобразуют ДНК. Большая группа белков задействована в регуляции активности филамента RecA. К настоящему времени открыто более десятка медиаторных белков, непосредственно участвующих в регуляции активности филамента RecA. Это RecF, RecR, RecO, RecX, PsiB, DinI, RecN, DprA, SSB, UvrD и некоторые другие. Все эти белки могут быть подразделены на группы негативных и позитивных регуляторов. Это деление достаточно условно, поскольку некоторые из них, подавляя одни функции филамента, активируют другие (Petrova et al., 2009;

Bagdasarian et al., 1992; Courcelle et al., 1997; Shan et al., 1997; Lusetti et al., 2004; Renzette et al., 2007; Venkatesh et al., 2002; Stohl et al., 2003; Drees et al., 2004; Ragone et al., 2008).

Многочисленные попытки использования рекомбиназ в биотехнологиях или генной инженерии имели лишь ограниченный успех (Zhumabayeva et al., 2001; Wang et al., 2006; Ronayne et al., 2016).

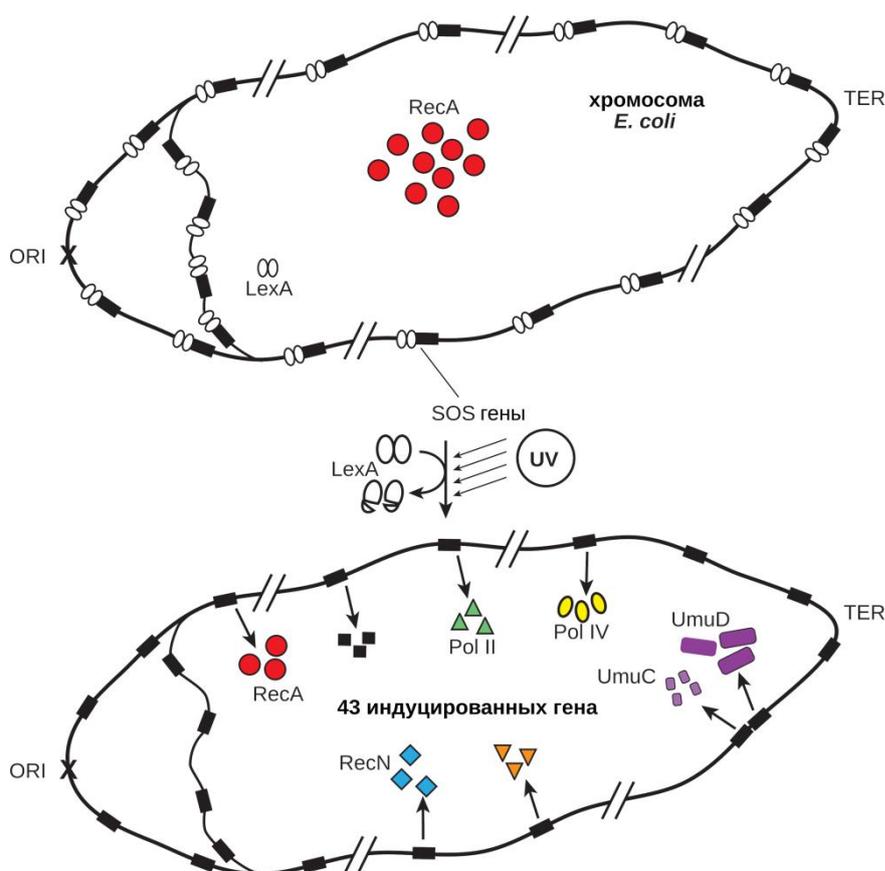


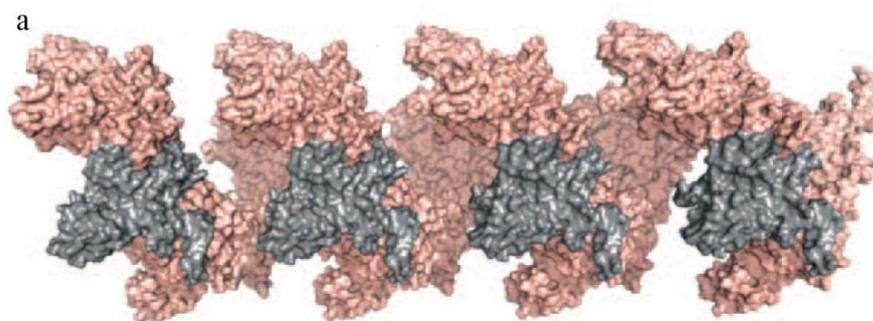
Рисунок 2. Схема экспрессии белков SOS ответа на бактериальной хромосоме. (Patel et al., 2010)

1. 2. Структурные особенности белка RecA

Впервые структура кристалла RecA была получена с помощью рентгеноструктурного анализа в 1992 году (Story et al., 1992). Однако полученный кристалл был представлен неактивным филаментом RecA. Структура белка RecA была разрешена с точностью 2.3 Å. При этом оба варианта структуры имели существенные недостатки: одна в отсутствие ДНК

и в присутствии АДФ (рисунок 3, б), а другая – без нуклеотидного кофактора (Story et al., 1992; Story and Steitz, 1992). Кристалл белка RecA в «сжатой» конформации представляет собой спиральный филамент с 6 мономерами RecA, приходящимися на один поворот спирали оцДНК (DiCarua et al., 1990; Story et al., 1992; Story and Steitz, 1992) (рисунок 3, а).

Мономер RecA состоит из 352 аминокислот, которые разделяют на три субдомена: N-концевой субдомен (позиции а. к. 1-36), центральный субдомен (позиции 36-266) и С-концевой субдомен, охватывающий отрезок от 266 а.к по 352 а.к. (Story et al., 1992). Аминокислоты располагаются в виде десяти α -спиралей, одиннадцати β -нитей и нескольких неструктурированных петель, из которых наиболее длинными являются L1 и L2. N-конец белка RecA составляют α -спираль А и β -слой, а центральный домен - восемь β -слоев (с 1 по 8) и шесть α -спиралей (с В по G), а так же две петли L1 и L2, плохо разрешенные при рентгеноструктурном анализе. С-конец образуют α -спирали H, I, J и β -слои №9, №10. Центральный субдомен (АТФазный сайт) белка RecA является высоко консервативным среди многих бактерий (Story et al., 1992; Story and Steitz, 1992).



б

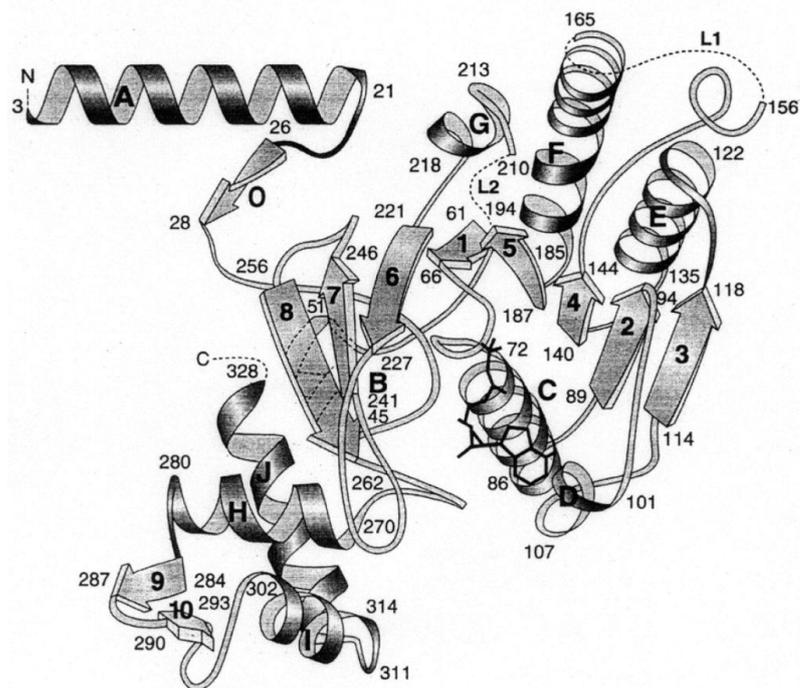


Рисунок 3. Кристаллическая структура белка RecA *E. coli*. а. Структура филамента RecA, темно-серым выделены отдельные субъединицы белка. **б.** Структура мономера RecA, связанного с молекулой АДФ (Story et al., 1992; Story and Steitz, 1992).

Наиболее консервативными элементами среди бактериальных и эукариотических гомологов белка RecA являются несколько структурных компонентов, представляющие сайт связывания с АТФ. В частности, это так называемый «Уолкер мотив А», представленный консенсусной последовательностью GPESGKT с 66 по 73 а. к. (Saraste et al., 1990), консенсусная последовательность VIVVD с 140 по 144 а. к., называемая «мотивом Уолкера В»; последовательность MAW с 42 по 65 а. к. (Rosa and Cox, 1997), а также а. к. остаток E96. В связывании с ДНК, согласно структуре, принимают участие два консервативных участка белка RecA: петли L1 (157-164 а. к.) и L2 (190-227 а. к.), а также аминокислоты Y103, K183 и некоторые а. к. из фрагмента 233-243 (Morimatsu et al., 1995; Rehrauer et al., 1996; Shinohara et al., 2015).

Показано, что С-концевой субдомен белка RecA обладает высокой подвижностью относительно других субдоменов. Он участвует во взаимодействии с дополнительной молекулой магния и отвечает за переход белка из неактивной конформации в активную. С-концевой субдомен содержит много отрицательно заряженных а. к. (Yu et al., 2001; Roca and Cox, 1997), предположительно влияющих на связывание с дцДНК (Tateishi et al., 1992). Исследование биохимических свойств вариантов белка подтвердило, что в геликазной активности белка RecA и в его связывании с дцДНК принимают участие предположительно K286 и R243 (Kurumizaka et al., 2000). Интересно, что аминокислоты K248 и K250 каким-то образом задействованы в активации гидролиза АТФ (VanLoock et al., 2003). Эксперименты по измерению активности вариантов RecA с нарушенной копротеазной активностью привели к заключению, что сайт связывания репрессора LexA находится в области с 229 по 243 а. к. В кристалле белка RecA данная область расположена в глубине кармана, образуемого N- и С- концевыми субдоменами на внешней стороне белкового филамента. Изучение нуклеопротеинового комплекса RecA-АТФ γ S-дцДНК, взаимодействующего с нерасщепляемым вариантом репрессора LexA, продемонстрировало, что взаимодействие RecA-LexA происходит со стороны большой бороздки филамента на внешней поверхности белка, выступающей внутрь бороздки (Yu and Egelman, 1993). Область белка RecA с 241 по 259 а. к. рассматривали как один из возможных сайтов связывания с дцДНК. Было продемонстрировано, что протеолиз белка LexA ингибируется присутствием дцДНК или избытком оцДНК (Rehrauer et al., 1996), что предполагает возможность перекрывания сайтов связывания LexA и дцДНК. О частичном перекрытии сайтов связывания LexA и дцДНК свидетельствует также тот факт, что химерные варианты RecA из *Pseudomonas aeruginosa*, при увеличенной рекомбиногенности и увеличенной аффинности к дцДНК, не индуцирует SOS ответ в *E.coli* (Chervyakova et al., 2001).

Кристалл активного филамента был получен в 2008 году из 6 искусственно соединенных мономеров RecA на олигодезокситимидиновой ДНК (dT)₁₈. Эти мономеры образовывали комплекс с 6 молекулами негидролизуемого аналога АТФ, АДФ-AlF₄-Mg (Chen et al., 2008). При получении кристалла был сделан ряд допущений. Все шесть мономеров были экспрессированы в виде единой полипептидной цепи. Для предотвращения полимеризации в более длинные филаменты, в интерфейс первого и последнего мономеры RecA были введены аминокислотные замены. Несмотря на этот артефакт, полученный филамент из 6 искусственно соединенных мономеров RecA, обладал сходной с RecAEc ДНК-связывающей, ДНК-зависимой АТФазной и рекомбинационной (определяемой в реакции переноса нити ДНК) активностями (Chen et al., 2008). Структура пресинаптического филамента, так же как предыдущая структура имела разрешение с точностью 2.8 Å. На один поворот спирали приходится шесть мономеров RecA, а размер мономера составляет 93.96 Å. Согласно ранее полученным данным (Stasiak et al., 1992; Yu et al., 2001), стехиометрия связывания RecA с оцДНК составляет один мономер на три нуклеотида. При этом на поворот спирали приходится 18.5 нуклеотидов с 5.08 Å на один нуклеотид. Основания нуклеотидного триплета локально организованы в более сжатую структуру, подобную В-конформации ДНК. В нуклеопротеиновом комплексе, поворот между 5'-концевым основанием нуклеотидного триплета и соседним с ним основанием составляет угол 42°. Следующий поворот, в сторону 3'-концевого основания, осуществляется ещё на величину 60°, с шагом по оси 4.2 Å. Наличие конформации ДНК, подобной ее В-форме, в составе нуклеотидного триплета, компенсируется большим расстоянием (7.8 Å по оси филамента) и левоспиральным поворотом (-42°) между последним основанием одного и первым основанием следующего нуклеотидного триплета. Как и предполагалось в ранних работах, в активном филаменте оцДНК связывается с петлями L1 и L2 (McGrew et al., 2003; Wang et al., 1996; Malkov et al., 1995) и с N-концевыми

фрагментами α -спиралей F и G, следующими за петлями L1 и L2, соответственно (рисунок 3). Петли L1 и L2, неупорядоченные в «сжатом» или неактивном филаменте (Story et al., 1992; 1992a), организуются в структурные элементы: L1 – в короткую α -спираль (α L1), поворот и протяженный сегмент, а L2 – в β -шпильку (β_{1L2} - β_{2L2}).

1.3.1 Аффинность RecA к оцДНК

Процессу гомологической рекомбинации молекул ДНК предшествует стадия образования пресинаптического комплекса - протяженного филамента RecA на оцДНК (Cox et al., 1981). Биохимические и структурные свойства нуклеопротеинового комплекса строго зависят от того, входит ли в состав комплекса АТФ или АДФ. В отсутствие какого-либо нуклеотидного кофактора или в присутствии АДФ, дестабилизирующего активную конформацию белка, нуклеопротеиновый комплекс представляет собой «сжатую» компактную спиральную структуру с шагом спирали 74.95 Å (Chen et al., 2008), диаметром спирали около 12 нм (Heuser and Griffith, 1989) и расстоянием между нуклеотидами 1.8-2.1 Å (Egelman and Stasiak, 1988). Такой филамент не способен инициировать реакцию обмена гомологичных цепей ДНК. Замещение молекулы АДФ на АТФ (либо другой трифосфат) приводит к значительному изменению структурных параметров филамента: шаг спирали увеличивается до 93.96 Å (Chen et al., 2008), межу нуклеотидное расстояние до 5 Å, а диаметр образуемого филамента уменьшается до 10 нм (Chen et al., 2008). Белок RecA взаимодействует с сахарофосфатным остовом ДНК таким образом, что молекула ДНК оказывается расположенной вдоль оси филамента, при этом нуклеотидные основания остаются доступными со стороны большой бороздки филамента. ОцДНК в таком комплексе растягивается в 1.5 раза относительно своей исходной длины. На один виток спирали приходится шесть молекул белка RecA и 18.5 нуклеотидов ДНК, т.е. 3 основания на 1 мономер белка (Chen et al., 2008). Образование такой «растянутой» структуры является необходимым условием инициации

синаптической фазы реакции обмена гомологичных цепей ДНК. Обнаружено, что конформационный переход филамента из «сжатой» структуры в «растянутую» сопровождается предварительным разрушением и последующей сборкой комплекса заново (Lee and Cox, 1990). Интересно, что «растянутая» форма нуклеопротеинового филамента характеризуется не только иной пространственной организацией, но также и большей стабильностью. Стабильность филамента выражается в более высокой устойчивости «растянутого» комплекса с АТФ, по сравнению со «сжатым» комплексом, к дестабилизирующему воздействию солей одновалентных металлов (Menetski and Kowalczykowski, 1985).

Ранние исследования по влиянию солей одновалентных металлов на стабильность филамента выявили, что при взаимодействии белка RecA с оцДНК образуется до пяти ионных контактов на мономер. Интересно, что действие солей одновалентных металлов сказывается на изменении только истинной константы связывания белка RecA, но не затрагивает параметр кооперативности связывания (Menetski and Kowalczykowski, 1985). Дестабилизирующий эффект солей зависит как от их концентрации, так и от природы аниона: так, наиболее разрушительное действие на филамент оказывает анион хлора, в то время как влияние глютаматного или ацетатного анионов носит более умеренный характер (Menetski et al., 1992).

Эффективность взаимодействия белка RecA с оцДНК зависит от ее нуклеотидного состава: природные полинуклеотиды, имеющие разнообразную вторичную структуру, являются неудобным субстратом для филамента RecA. Шпильчатые структуры ДНК, стабилизированные ионами магния, остаются за пределами филамента. По степени эффективности связывания с белком полинуклеотиды можно расположить в следующем порядке убывания: поли(дЦ), поли(дТ), этеноДНК, М13оцДНК, поли(дА) (Weinstock et al., 1981). Известно, что природная оцДНК как и поли(дА) в растворе принимают вторичную структуру (B_p конформацию), для которой характерно образование особых стэкинг-взаимодействий между соседними

основаниями. Изменение конформации B_p на конформацию B , более типичную для полинуклеотидов поли(дЦ) и поли(дТ), возможно только после взаимодействия с белком RecA (Kato and Kuramitsu, 1999).

Ограничительным фактором для взаимодействия полинуклеотида с белком является не только нуклеотидный состав полинуклеотида, но и его недостаточная протяженность. В случае использования олигонуклеотидов длиной менее пятидесяти оснований, ДНК-связывающая активность белка RecA ограничена. При этом, ДНК протяженностью менее 30 оснований не вызывает гидролиз АТФ совсем, из чего следует, что филамент RecA на ней отсутствует. Показано, что минимально возможный филамент должен включать десять мономеров RecA (Bianco and Weinstock, 1998). Использование вместо АТФ такого кофактора, как АТФ γ S (слабо гидролизуемый аналог АТФ) позволяет снизить длину олигонуклеотида до девяти оснований, что регистрировалось методом по связыванию комплексов на нитроцеллюлозном фильтре (Leahy and Radding, 1986). При анализе экспериментальных данных, важно учитывать, что стехиометрия связывания белка RecA с оцДНК может составлять как три, так и шесть нуклеотидов на мономер, в зависимости от условий эксперимента (Lauder and Kowalczykowski, 1991). Этот парадокс объясняется классической моделью, согласно которой в состав филамента могут входить как одна, так и две отдельные цепи оцДНК. В ходе эксперимента добавлялся избыток радиоактивно немеченой оцДНК в реакционную смесь, где белок RecA исходно уже находился в комплексе с радиоактивно меченой оцДНК. При этом было зафиксировано, что меченая ДНК диссоциирует из нуклеопротеинового комплекса в два этапа: одна ее часть диссоциирует относительно быстро, тогда как другая - значительно медленнее, чем предыдущая. При этом каждая из диссоциировавших частей содержала равное количество радиоактивно меченой оцДНК (Zlotnik et al., 1990). В другой подобной работе по выяснению стехиометрии белка RecA и оцДНК измеряли интенсивность флуоресцентного сигнала от этеноДНК,

позволяющего количественно оценить соотношение между белком RecA и оцДНК в нуклеопротеиновом комплексе. В основе этого метода лежит оценка флуоресценции этеноДНК (оцДНК, модифицированной хлорацетоальдегидом), которая, как известно, увеличивается пропорционально количеству образовавшихся связей между белком RecA и этеноДНК (Cazenave et al., 1983). Варьируя порядок титрования белка и ДНК в реакционной смеси, показано, что в случае, когда на один мономер белка RecA приходится три нуклеотида оцДНК, то в филаменте содержится только одна цепь оцДНК. Если же на один мономер белка приходится сразу шесть нуклеотидов оцДНК, то это означает, что в филаменте содержится одновременно две цепи оцДНК, которые расположены параллельно друг другу. Эти данные сопоставлялись с АТФазной активностью, которая сама по себе свидетельствует о заполнении исключительно первичного сайта связывания. Таким образом, первым при добавлении ДНК заполняется сайт связывания, который принято называть первичным, а при избытке оцДНК относительно образованных филаментов RecA, осуществляется заполнение и вторичного сайта (Zlotnick et al., 1990; Zlotnick et al., 1993). Результаты, представленные Злотником, были позже подтверждены наблюдениями, полученными с помощью электронно-микроскопического имидж-анализа структуры комплекса RecA::оцДНК, а так же с применением метода химической сшивки (Egelman et al., 1988; Ogawa et al., 1993; Wang, Adzuma, 1996). Подытоживая, процесс мультимеризации белка RecA на оцДНК в другой терминологии можно обозначить как заполнением первичного сайта, которое регистрируют не только по увеличению флуоресценции этеноДНК, но также и по возникновению гидролиза АТФ. Взаимодействие между оцДНК и вторичным сайтом значительно слабее, чем с первичным, и не сопровождается гидролизом АТФ (Zlotnick et al., 1993).

1.3.2 Взаимодействие белка RecA с дцДНК

Взаимодействие белка RecA_{Eс} с дцДНК происходит только в присутствии АТФ или ее аналогов, таких как АТФγS, что качественно отличается от процесса мультимеризации на оцДНК (Pugh et al., 1988). В результате при анализе комплекса белка RecA с дцДНК можно обнаружить только "растянутую" конформацию филамента. Нуклеация белка RecA на дцДНК происходит таким образом, что нуклеотидные основания, как и в случае с оцДНК, располагаются почти перпендикулярно оси филамента, при этом шаг спирали ДНК увеличивается до 100 Å, а межнуклеотидное расстояние - до 5.1 Å. Один виток филамента представлен 18.6 парами оснований и 6.2 мономеров RecA. Длина дцДНК в составе комплекса с RecA и АТФ увеличена на 39,6% (Pugh et al., 1989), а с АТФγS - на 43%, но такая деформация еще не приводит к разделению цепей (Pugh et al., 1988, 1989; Galletto, 2006)

Основное различие между взаимодействиями белка RecA_{Eс} с дцДНК или оцДНК состоит в кинетике образования нуклеопротеиновых комплексов. В отличие от кинетики связывания с оцДНК, образованию комплекса с дцДНК предшествует характерный процесс медленной нуклеации, продолжительность которого может достигать нескольких часов. Этот этап сильно зависит от рН и быстрее протекает при уровне рН около шести. Нуклеация характеризуется ослабленным взаимодействием белка RecA с дцДНК и больше зависима от температуры и длины дцДНК. Предполагается, что этот этап начинается с локального раскручивания дцДНК мономерами RecA, что не сопровождается гидролизом АТФ. Однажды начавшись, удлинение или «элонгация» филамента происходит быстро и завершается образованием протяженного нуклеопротеинового филамента (Pugh et al., 1988, 1989). Данное правило имеет свое исключение. В отличие от RecA_{Eс} и большинства других рекомбиназ, белок RecA_{Dr} из *D. radiodurans* имеет предпочтительное связывание к дцДНК. Как показали исследования *in vitro*, молекулярный механизм обмена гомологичных цепей ДНК, катализируемый белком RecA_{Dr}, имеет ряд специфических свойств. Обмен цепей ДНК

инициируется филаментом на дцДНК. В отличие от белка RecAEс, белок RecADг имеет предпочтительное сродство к дцДНК (Kim, 2002). Более того, в присутствии белка SSB (как варианта SSBес, так и «родного» DdrB) и достаточного избытка дцДНК в реакционной смеси, белок RecADг переходит на дцДНК, оставляя оцДНК конкурирующему с ним белку SSB (Eggington et al., 2004). В отсутствие дцДНК кинетика вытеснения белка SSB белком RecADг с оцДНК во много раз медленнее, чем в случае с белком RecAEс.

Так как процесс нуклеации RecAEс сопровождается локальным раскручиванием дцДНК, то любые условия, которые понижают стабильность ДНК: негативная суперскрученность, ДНК сшивки, одностранные участки, повышенная температура, пониженная концентрация ионов Mg^{2+} , изменение pH, интеркаляция в дцДНК бромистого этидия, увеличивают скорость нуклеации (Pugh et al., 1987, 1989). Исходя из этих сведений, данные о более эффективном взаимодействии белка RecA с дцДНК, имеющей сшивки, свидетельствуют отнюдь не о повышенной аффинности белка RecA к ДНК сшивкам. Напротив, они укладываются в общую модель связывания белка RecA с дцДНК, в которой структурные нарушения в дцДНК, вызванные сшивками, представляют собой платформу для нуклеации (Pugh et al., 1987, 1989; Kojima et al., 1990). Данные о том, что белок RecA легче взаимодействует с «Z-формой» ДНК объясняются кинетическими изменениями в общем механизме связывания RecA с дцДНК (Vlaho et al., 1989; Kim et al., 1989). Филаменты, сформировавшиеся при связывании рекомбиназы с «Z-формой» ДНК, сохраняют правосторонне спиральную структуру (Vlaho et al., 1989). Использование дцДНК молекул с 5'-выступающими одностранными концами или внутренними брешами длиной более 30 оснований ускоряет этап нуклеации при связывании RecAEс с дцДНК при физиологическом значении pH. При этом нуклеация инициируется в сайтах оцДНК, а филамент значительно легче распространяется на соседние сайты дцДНК. Сформированный при таких условиях, филамент демонстрирует структурную полярность, которая

является следствием ориентации цепи расположенной в исходном участке ДНК. Две цепи дцДНК также связываются асимметрично: одноцепочечный фрагмент дцДНК, очевидно, связывается в сайте, обычно занимаемом оцДНК, – в первичном сайте связывания ДНК. Цепь ДНК, связанная в первичном сайте, лучше защищена от расщепления нуклеазами, чем связанная во вторичном сайте комплементарная ей цепь. Это является подтверждением того, что во время обмена цепями ДНК, связанная в первичном сайте цепь остается внутри филамента, тогда как комплементарная ей цепь вытесняется из филамента (Lindsley et al., 1989).

Диссоциация мономеров RecAЕс от дцДНК следует в том же направлении, что и сборка, в 5'→3' относительно цепи ДНК, расположенной в первичном сайте. Кинетика разборки филамента сильно зависит от уровня рН: при значениях рН ниже 6.5 процесс разборки не регистрируется совсем, тогда как при значениях рН выше 8.1 скорость разборки может достигать 200 мономеров в минуту (Lindsley et al., 1989; Galletto, 2006). В одномолекулярных экспериментах продемонстрировано, что умеренное приложение силы к концам дцДНК (40 pN) провоцирует сборку филамента так же и в присутствии низких значений рН. Такая стимуляция сборки филамента происходит за счет вынужденного расплетения цепей ДНК, где спонтанно образуются места нуклеации для мономеров RecA (Hongxia et al., 2013).

1.3.3 Сборка и разборка филамента RecA

Комплекс RecA с оцДНК представляет собой протяженный нуклеопротеиновый комплекс. ОцДНК в таком комплексе «растянута» в 1.5 раза относительно своей исходной длины. Процесс филаментации RecA вдоль оцДНК инициируется случайно по всей оцДНК, при этом для завершения мультимеризации на оцДНК длиной около 8000 оснований достаточно всего одной-двух минут (Cox, 1999). Мономеры RecA образует протяженный филамент вдоль дцДНК с коротким выступающим 5'-концом

оцДНК, по крайней мере, в пять раз быстрее, чем в случае, когда в качестве субстрата используется дцДНК с выступающим 3'-концом. Так как 5'-конец задает направление для полимеризации белка RecA в сторону сегмента дцДНК, то был сделан вывод о 5'→3' порядке сборки мономеров (Register et al., 1985; Lindsley and Cox, 1990). Диссоциация белка RecA от ДНК протекает в том же направлении, что и сборка – 5'→3' относительно оцДНК (Shan et al., 1997). Альтернативным методом в исследовании направления разборки филамента был эксперимент по замещению сайтов ДНК одного белка другим белком. Данные наблюдали на линейаризованной оцДНК фага M13, с помощью белка SSB, который конкурентно связывался с оцДНК, высвобождаемой белком RecA в ходе диссоциации. Замещение белка RecA белком SSB на оцДНК регистрировали по падению скорости гидролиза АТФ. Было показано, что кинетика вытеснения изменяется пропорционально количеству свободных 5'-концов, что свидетельствует о том, что 5'-зависимая разборка филамента есть единственный способ диссоциации белка RecA и оцДНК. На кольцевой форме оцДНК фага M13 процесс разборки зарегистрировать не возможно, так как в этом случае филамент представляет собой замкнутую кольцевую структуру, лишенную концов. По данным электронной микроскопии белок SSB был обнаружен так же на 5'-конце оцДНК, что подтверждает 5'→3' направление разборки филамента RecA (Shan et al., 1997).

До появления одномолекулярных методов исследования рекомбиназ, изучение диссоциации белка RecA и оцДНК проводили по измерению кинетике переноса белка с этеноДНК на поли(дТ). Данные, полученные из этих экспериментов, подтверждают, что диссоциация сопряжена с гидролизом АТФ, хотя эти события не являются строго взаимосвязанными, поскольку далеко не каждый акт гидролиза АТФ сопровождается диссоциацией мономера RecA (Menetski and Kowalczykowski, 1987). Действительно, мономер RecA отделяется от филамента после завершения гидролиза АТФ, в АДФ-связующей форме, для

которой характерно низкое сродство к ДНК (Menetski et al., 1985). В присутствии АТФ γ S для перетекания всего белка RecA с этеноДНК на молекулы поли(дТ) требуется более двадцати часов, тогда как в присутствии АТФ требуется всего четыре минуты. В целом, использование в качестве кофактора АДФ вместо АТФ сокращает время жизни нуклеопротеинового комплекса до 30 секунд (Menetski and Kowalczykowski, 1987).

Различают два основных этапа мультимеризации RecA на ДНК. Первый – инициация образования филамента, или нуклеация, при которой нескольких первых мономеров RecA «салятся» на оцДНК. Для этого достаточно пяти мономеров. На один мономер RecA приходится три нуклеотида оцДНК. Второй этап – удлинение филамента, или элонгация, в ходе которой новые мономеры RecA последовательно присоединяются к исходным мономерам на 3'-конце растущей цепи. По достижении филаментом длины в 6–10 мономеров начинается гидролиз АТР, причем его скорость вдоль всего филамента одинакова ($k_{cat} = 30 \text{ мин}^{-1}$). Гидролиз АТР координирован и осуществляется в виде организованной волны, в которой с некоторой периодичностью задействованы все мономеры филамента. Разборка филамента происходит в том же направлении, что и сборка: мономеры RecA диссоциируют от филамента с 5'-конца относительно оцДНК с константой скорости $k_{off} = 123$ мономеров в минуту на один конец филамента. При этом момент диссоциации концевого мономера непосредственно сопряжен с гидролизом молекулы АТР (Cox et al., 2005; Joo et al., 2006; Galletto et al., 2006).

Рекомбиназы RecA различного происхождения часто отличаются по своим биохимическим свойствам друг от друга. Иногда достаточно присутствия одной аминокислотной замены, чтобы кардинально изменить активность белка дикого типа. Усиление выраженности какого-либо из свойств белка называют гиперактивностью. При этом процесс полимеризации филамента на ДНК чаще всего отслеживают по кривой АТФазной активности. Исследователей давно волнует вопрос, насколько

коррелирует АТФ-азная активность того или иного мутантного RecA с изменения скорости диссоциации мономеров от ДНК. Экспериментальные факты указывают на то, что не очень коррелирует. Аминокислотная замена E38K приводит к тому, что скорость диссоциации RecA от ДНК существенно уменьшается. При этом взаимообмен между пулом свободных мономеров, находящихся вне ДНК, и пулом мономеров, связанных с ДНК, происходит значительно медленнее, чем в случае белка RecA дикого типа из *E. coli*. Однако скорость RecAE38K зависимого гидролиза АТФ не отличается от контроля (Britt et al., 2010). Другой пример – стабилизация филамента RecA в присутствии дАТФ. Скорость гидролиза дАТФ белком RecAEc на 20% выше, чем гидролиза АТФ, тогда как скорость диссоциации от ДНК, при замещении кофактора, в несколько раз медленнее (Shan et al., 1997). Парадоксально, что скорость гидролиза АТФ независима от значений pH, тогда как стабильность филамента возрастает при снижении pH. Показано, что при значении pH равном 6.3 филамент фактически перестает разбираться. Таким образом, хотя момент диссоциации концевых мономеров действительно сопряжен с гидролизом молекулы АТФ, по-видимому, не каждый гидролитический акт приводит к высвобождению этого мономера от филамента. Наконец, вероятно, может происходить смыкание 3'- и 5'-концевых мономеров соседних кластеров, если длина бреши между кластерами кратна трем основаниям ДНК (van Loenhout et al., 2009). Интересно, что при одновременной инициации нескольких независимых кластеров в случайных участках ДНК, их состыковке между собой в большей части случаев должны мешать короткие бреши длиной в один или два нуклеотида. Так как эти бреши, длиной один или два нуклеотида, остаются недоступными для связывания мономером RecA, они служат естественными ограничителями длины кластера. Из этого следует, что при сравнении различных вариантов RecA, корректнее всего было бы сравнивать скорости разборки с учетом прерывистости филамента. Однако литературных данных о корреляции скорости разборки, длины кластера и АТФазы не обнаружено.

На практике большую информацию о рекомбиназе может дать не столько значение k_{cat} АТФазы, сколько изменение относительной скорости АТФазы в процессе достижения динамического равновесия. У гиперрекомбиназ скорость сборки филамента, может отличаться в любую сторону от контроля (Britt et al., 2010). Подобные изменения скорости филаментации можно симулировать *in vitro* и на белке дикого типа. Так, замещение кофактора белка АТР на дАТФ приводит к значительному изменению кинетики филаментации, в ходе которой белок дикого типа проявляет себя необычно и становится подобен гиперактивному варианту RecA при конкуренции с белком SSB за сайты ДНК (Shan et al., 1997; Gruenig et al., 2010). Однако, в связи с тем, что концентрация дАТФ в бактериальной клетке недостаточна для рекомбиназы, этот результат невозможно применить для моделирования гиперрекомбинагенности *in vivo*, и он остается лишь биохимическим трюком. Таким образом, группа последовательно соединенных друг с другом мономеров, отделенных с обоих концов брешами от остальной цепи филамента, представляют собой отдельный кластер. Длина его должна варьировать в зависимости от соотношения кинетики нуклеации на ДНК и кинетики элонгации. Показано, что в присутствии негидролизуемого аналога АТР – АТР γ S – частота нуклеации в пять раз выше, чем в присутствии АТР (Galletto et al., 2006). Скорости элонгации и нуклеации могут варьировать не только в зависимости от кофактора, но и от природы самого RecA. Например, скорость элонгации RecA из микроорганизма *Deinococcus radiodurans* ниже, чем скорость элонгации RecA из *E. coli*, тогда как частота возникновения точек его нуклеации на ДНК выше (Hsu et al., 2011). Вместе с тем, существует гипотеза, что, спустя некоторое время после инициации кластеров, число брешей значительно уменьшается и кластеры сливаются между собой, образуя сплошной филамент. Теоретическая основа для этого явления не найдена (van Loenhout et al., 2010). В свою очередь, методы компьютерного моделирования в исследовании динамики филаментации RecA пока не способны объяснить исчезновение или появление новых

брешей (van der Heijden et al., 2008). По данным Кокса (Drees et al., 2004), на филамент, заключающий в себе молекулу оцДНК длиной 8 т.п.н., приходится всего 3–4 бреши. Здесь следует отметить, что результаты исследований в разных лабораториях несколько отличаются и зависят от использованного метода, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Если такой метод, как «method single molecule», позволяет напрямую регистрировать изменение физических параметров филамента RecA, то метод, основанный на конкурентном связывании с ДНК регуляторных белков, дает лишь косвенные данные о кинетике филаментации RecA так требует много умозрительных допущений. Как правило, эти данные основаны на таком рутинном методе, как регистрация изменения скорости гидролиза АТФ. Действительно, если конкурирующий за ДНК какой-либо регуляторный белок приводит к падению скорости RecA-зависимого гидролиза АТФ, то это свидетельствует лишь о разборке филамента RecA в целом. Несмотря на доступность такого метода, результаты сложно интерпретировать с учетом межбелковых взаимодействий, стехеометрий связывания с ДНК для разных белков. Например, данные анализа кривых ингибирования RecA-зависимой АТФазы белком RecX могут быть верны только в том случае, если белок RecX взаимодействует с филаментом исключительно в месте, где расположена брешь, согласно ранее предложенной модели (Drees et al., 2004). Детальное обсуждение этой модели будет представлено в главе, посвященной регуляторным белкам. Но сам подход содержит в себе серьезные противоречия. Этот факт, на наш взгляд, свидетельствует о том, что метод анализа разборки с использованием RecX мало объективен, либо следует признать, что RecX из других организмов ингибируют активность RecA каким-то иным способом. Применение белка SSB, чья стехеометрия связывания к ДНК равна 36 нуклеотидов, представляется невозможным для измерения кинетики разборки мономеров RecA из короткой бреши между кластерами. Ввиду своего размера, длинной всего 1-2 нуклеотида, бреши в филаменте должны быть для белка SSB полностью недоступны.

Несмотря на явные преимущества одномолекулярных методов в исследовании рекомбиназ, все они тоже имеют ряд недостатков. В подавляющем большинстве одномолекулярные эксперименты используют двунитевую ДНК, что придает модели некоторую условность, поскольку дцДНК не является природным субстратом для RecA. Второе неудобство заключается в том, что флуоресцентно меченный RecA частично теряет свою активность.

Таким образом, динамика связывания RecA с ДНК, в большой степени, определяются такими факторами, как частота нуклеации, скорость сборки, соотношение скоростей сборки и разборки, прерывности и другим характеристикам филамента. Все эти параметры в свою очередь могут определяться заменой кофактора, изменением каталитической активности АТР-азного домена, присутствием регуляторных белков. Регуляция кинетики филаментации RecA непосредственно в клетке осуществляется через стимуляцию регуляторами либо сборки, либо разборки филамента на ДНК. При этом сборка мономеров RecA чаще стимулируется регуляторными белками на этапе нуклеации, чем на этапе элонгации (Umezumi et al., 1993; Umezumi and Kolodner, 1994). Подытоживая раздел, можно заключить, что согласно литературным источникам, динамика взаимодействия RecA с ДНК является одним из ключевых факторов, определяющих протяженность филамента и, как следствие, его активность в поиске гомологии.

1.4. Гидролиз АТФ

Гидролизу АТФ предшествует связывание мономером RecA одной молекулы АТФ и иона магния. Связывание может осуществляться как свободной формой мономера, так и мономерами, находящимися в составе филамента. Для взаимодействия с ДНК и инициации обмена цепей ДНК достаточно одного только взаимодействия с АТФ без последующего гидролиза. Для того чтобы изучить роль гидролиза АТФ применяется множество подходов. Часто значение гидролиза АТФ белком RecA

исследуют, замещая АТФ негидролизуемыми аналогами. Наиболее часто из негидролизуемых аналогов используют АТФ γ S. В других случаях используется необычный вариант белка RecAK72R, который хотя эффективно взаимодействует с АТФ, но не гидролизует его (Rehrauer, Kowalczykowski, 1993). Гидролиз АТФ необходим при осуществлении большинства функций проводимых белком RecA. Это однонаправленный перенос цепи (Konforti et al., 1992), преодоление структурных препятствий в ДНК при переносе цепи (Shan and Cox, 1996), четырехнитевой обмен цепей между двумя молекулами дцДНК (Shan and Cox, 1996), геликазная активность (Cox, 2007), диссоциация мономеров RecA с 5'-концов филаментов (Arenson et al., 1999). Все это требуют гидролиза АТФ.

В отсутствие молекул ДНК белок RecA практически не гидролизует АТФ: k_{cat} составляет не более 0.015 мин^{-1} . Однако сверхвысокие концентрации солей одновалентных металлов (1.5 - 2 М) индуцируют конформационный переход белка RecA в активную форму. При этих искусственных условиях рекомбиназы самоагрегируют в структуры, в которых RecA характеризуется значениями k_{cat} , эквивалентными соответствующим величинам k_{cat} , полученным в присутствии оцДНК (Pugh et al., 1988). С помощью методов кругового дихроизма выявлено, что высокие концентрации солей способствует переходу белка RecA в конформационное состояние, сходное с тем, которое наблюдается при взаимодействии его с оцДНК (Wittung et al., 1995).

Нуклеопротеиновый филамент RecA, сформированный на молекулах оцДНК, сохраняет неизменную скорость гидролиза АТФ при любых значениях рН от 5.5 до 8.5 (Weinstock et al., 1981). Использование в качестве лиганда дцДНК вместо оцДНК приводит к падению скорости гидролиза АТФ при высоких значениях рН. Гидролитическая активность (k_{cat}) для условий в случае оцДНК составляет около 30 молекул АТФ, а для дцДНК - 20 молекул АТФ в минуту на один мономер белка (Cox, 2007).

В присутствии молекул АТФ белок RecA связывает ДНК в «растянутой» конформации, характеризующейся высокоаффинным к оцДНК состоянием и большим шагом спирали филамента. В присутствии молекул АДФ, белок RecA характеризуется низкоаффинным состоянием к оцДНК. Это состояние белка часто называют компактной конформацией, находясь в которой невозможны функции поиска гомологии или протеолизаа белка LexA. Гидролиз АТФ связан с конформационным переходом в субъединице RecA (Pugh et al., 1989; Roca and Cox, 1997; Logan et al., 2001). По достижении концентрации АДФ в растворе выше 10-15% филамент полностью разбирается. Взаимопревращение растянутой и компактной конформаций требует разборки филамента (Yu et al., 1992).

Молекулы АТФ гидролизуются белком RecA равновероятно вдоль всей длины филамента, без изменений гидролитической активности вблизи концов филамента (Brenner et al., 1987). Помимо АТФ, существует ряд других нуклеотидтрифосфатов, которые гидролизуются белком RecA в присутствии оцДНК. В их число входят молекулы дАТФ, УТФ, дУТФ и ПТФ, которые отчасти способны замещать АТФ, по крайней мере, в большинстве реакций, проводимых белком RecA. Другие, а именно ИТФ, ЦТФ, дЦТФ и ГТФ, несмотря на то, что подвергаются активному гидролизу, не активируют белок RecA на проведение основной функции, обмен цепей ДНК (Weinstock et al., 1981; Menge and Bryant, 1992). Исследования, проведенные группой Брайнта, выявили, что эффективность того или иного кофактора в реакции обмена гомологичных цепей ДНК коррелирует со значением S_{05} для этого кофактора (Menge and Bryant, 1992). Этот показатель по своему смыслу аналогичен константе Михаэлиса, однако, так как взаимодействие белка RecA с АТФ носит кооперативный характер (Weinstock et al., 1981), то его использование более правомерно при определении сродства белка RecA к АТФ. Было показано, что реакция обмена цепями ДНК происходит при добавлении только тех нуклеотидтрифосфатов, величина S_{05} для которых оказывается ниже 100 мкМ

(Menge and Bryant, 1992). Другой важный параметр, описывающий уровень активности RecA, является коэффициент Хилла n_H , который характеризует меру кооперативности сайта связывания к субстрату и показывает число смежных субъединиц белка, в которых происходят структурные изменения, индуцированные связыванием молекулы субстрата одним протомером белка (Weinlock et al., 1981; Silver and Fersht, 1983; Mikawa et al., 1998). Значения коэффициента Хилла находится в зависимости от природы используемого полинуклеотида и нуклеотидтрифосфата. По данным Микавы (Mikawa et al., 1998), максимальное значение коэффициента Хилла для АТФ составляет 11.6. Это значение параметра кооперативности связывания RecA с АТФ получают из наклона графика зависимости $\log (V/V_{\max} - V)$ от \log АТФ. Оно означает, что двенадцать смежных мономеров RecA производят взаимосвязанные структурные изменения в ответ на взаимодействие АТФ с одним из них и, следовательно, все мономеры функционируют как единый аллостерический фермент (Mikawa et al., 1998). Параметр кооперативности связывания АТФ белком RecA почти не варьирует в зависимости от изменений температуры, концентрации белка, а также концентрации солей одновалентных металлов (Mikawa et al., 1998).

Филамент RecA, заряженный негидролизуемым аналогом АТФ, молекулой АТФ γ S, способен осуществлять поиск гомологичной нити ДНК. При этом длина переносимой нити ограничена по протяженности. По некоторым данным переносится максимум 1 т.п.н. Преодоление филаментом гетерологичных вставок заключенных в одной из нитей ДНК возможно только при гидролизе АТФ. Присутствие даже одного негомологичного основания серьезно замедляет кинетику переноса нити. Три негомологичных основания, расположенных по соседству уже полностью блокируют реакцию (Gamper et al., 2003). Кроме того 5'→3' направленность процесса «миграции ветви» обеспечивается тоже гидролизом АТФ. Действительно, при использовании вместо АТФ его негидролизуемого аналога, АТФ γ S, обмен нитей протекает как в 5'→3', так и в 3'→5' направлении (Konforti et al., 1990).

Назначение гидролиза АТФ на молекулярном уровне до конца не исследовано. В литературе присутствует несколько моделей. Две из них «перераспределительная» модель и модель «Говарда-Фландерса» объясняют роль гидролиза АТФ необходимостью диссоциации мономеров ResA от ДНК. Третья, «ротационная» модель предполагает, что роль АТФазы заключена в обеспечении вращения мономеров в ходе чего привходящая ДНК наматывается на филамент. Однако каждая из моделей имеет свои недостатки. Модель «перераспределения», предложенная Ковальчиковским (Kowalczykowski, 1991; Bianco et al., 1998), основывается на предположении, что гидролиз АТФ необходим для диссоциации мономеров ResA в месте, непосредственно перед движущейся структурой Холлидея, где происходит переключение спаренности нитей. В первоначальном виде модель не объясняла преодоления структурных препятствий во время переноса цепи ДНК, а подразумевала восстановление целостности филамента по ходу миграции ветви ДНК. В последующем варианте модель была дополнена предположением о том, что структурные барьеры, оказывающиеся на пути филамента ResA, останавливают АТФ-независимый перенос цепи. Гидролиз АТФ необходим в этом случае исключительно для заполнения мономерами ResA брешей в филаменте (Kowalczykowski, 1991). По усовершенствованной модели Говарда-Фландерса диссоциация мономеров от ДНК в ходе АТФазы является непосредственным двигателем миграции ветвей ДНК. Диссоциация провоцирует конформационные изменения в мономере, передающиеся на сайт взаимодействия с ДНК, который в свою очередь обеспечивают переключение связи между нитями ДНК (Cox, 2007).

Согласно ротационной модели, предложенной Коксом (Cox, 1994), для полного переноса цепи ДНК требуется вращение обоих ДНКовых субстратов друг вокруг друга. Вращение, в свою очередь, является следствием гидролиза АТФ. Так как на один шаг спирали филамента приходится шесть мономеров белка ResA, то гидролиз АТФ приводит к повороту каждого мономера на 60°. Поскольку на шаг спирали ДНК, в составе филамента ResA, приходится

18 пар нуклеотидов, то каждое полное вращение приведет к миграции ветви на 18 п.н. Поступательное вращение мономеров, относительно цепи ДНК, должно приводить к направленному наматыванию второй цепи вокруг первой. Данная модель так же объясняет преодоление структурных барьеров в ДНК: последовательное вращение обмениваемых цепей ДНК в точке барьера приводит к раскручиванию ДНК в этом месте.

Ротационная модель позволяет оценить протяженность гибридной ДНК, образуемой по ходу обмена гомологичных цепей. Поскольку типичный филамент RecA содержащий фаговую ДНК состоит из 2000 мономеров, гидролиз АТФ каждым мономером в составе филамента приведет к повороту на 360° и миграции ветви на 18 п. н., что соответствует 100 гидролизованным молекулам АТФ на каждую п. н. полученного гетеродуплекса. Из ротационной модели следует, что если гидролиз АТФ связан с вращением мономеров вокруг ДНК, скорость переноса цепи должна зависеть от скорости гидролиза АТФ, что отчасти подтверждается экспериментально (Nayak and Bryant, 1999). Однако последние данные ставят под сомнение правомерность «ротационной» модели в ее чистом виде. Двойной вариант E38K/ Δ C17 обладает АТФазой сходной с АТФазой дикого типа. Показано, что этот вариант не диссоциирует от ДНК даже при условиях среднего рН (рН=7,5). При этом процесс переноса гомологичной цепи полностью заблокирован (Britt, 2010). Таким образом, диссоциация мономеров от ДНК видимо является необходимым условием и возможно является непременной составляющей «ротационной» модели.

1.5. Перенос гомологичной цепи ДНК

Главной функцией всех рекомбиназ является способность проводить обмен гомологичными нитями ДНК. В реакции переноса нитей ДНК, используемой для изучения функций RecA *in vitro*, можно выделить, как минимум, три основных стадии: это образование пресинаптического комплекса; синаптическая стадия; элонгация гетеродуплексной ДНК и

образование продуктов реакции. (Kowalczykowski et al, 1994; Kowalczykowski and Eggleston, 1994; Roca and Cox, 1997; Lusetti and Cox, 2002; Cox, 2003). Наиболее полно все стадии обмена гомологичными цепями ДНК демонстрирует реакция переноса линейаризованной ДНК фага M13 на кольцевую ДНК того же фага.

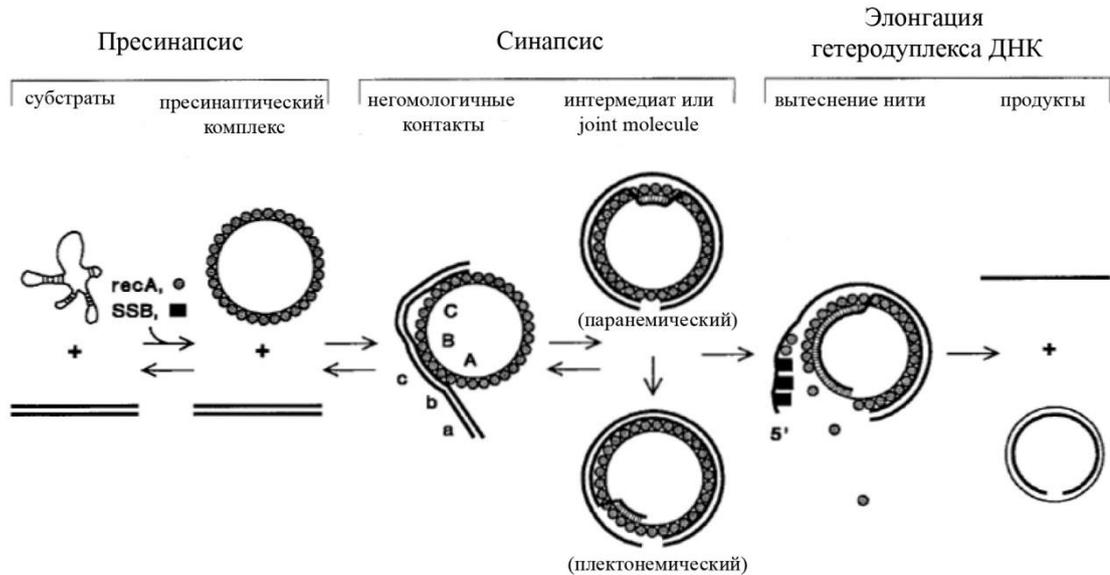


Рисунок 4. Схема реакции переноса нити ДНК *in vitro*, катализируемой белком RecA (Kowalczykowski et al, 1994).

О первой стадии кратко было упомянуто выше. Пресинапсис включает в себя сборку мономеров RecA на оцДНК в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} . В ходе элонгации, растущий конец филамента останавливается на вторичных структурах оцДНК, которые могут быть разрушены оцДНК-связывающим белком SSB (Bujalowski et al., 1987; Shereda et al., 2008). На кольцевых одноцепочечных молекулах ДНК белок RecA, мультимеризуясь вдоль оцДНК в $5' \rightarrow 3'$ направлении, вытесняет белок SSB и создает протяженный филамент по всей кольцевой ДНК, в котором один мономер RecA приходится на 3 нуклеотида. В рутинных экспериментах кинетику замещения одного белка другим регистрируют по изменениям АТФазной активности, так как белок SSB не обладает гидролитической активностью. Напрямую процесс мультимеризации и вытеснения документирован с

помощью прямой визуализации одиночных молекул (Bell, 2012). По завершении мультимеризации, вся оцДНК расположена в так называемом первичном сайте (Roca and Cox, 1997). Присутствие белка SSB на стадии пресинапсиса не является обязательным, если концентрация ионов Mg^{2+} в растворе значительно понижена. Например, при такой низкой концентрации $MgCl_2$ как 1 мМ, вторичных структур на ДНК остается столь мало, что они практически не мешают белку RecA покрыть оцДНК полностью. Однако при столь низкой концентрации ионов Mg^{2+} нуклеопротеиновый комплекс не вступает в следующую стадию - синаптическую. Предполагается, что в этих условиях нуклеопротеиновый филамент теряет способность обнаруживать гомологичные участки в дцДНК (Roman et al., 1986; Lavery et al., 1990; Haruta et al., 2003).

Синаптическая стадия – многоступенчатый процесс, который разделяют на несколько этапов: поиск гомологичной молекулы ДНК среди негомологичных молекул ДНК и затем переключение спаренности оснований и образование гетеродуплекса. Переключению спаренности оснований предшествует образование трехнитевого интермедиата (Schutte and Cox, 1988; Umlauf et al., 1990; Rould et al., 1992; Rao, Radding, 1993). В ходе поиска гомологии, линейная молекула дцДНК неспецифически выстраивается вдоль образовавшегося филамента, взаимодействуя с вторичным сайтом, который расположен в большой бороздке. Такое взаимодействие дцДНК с ДНК-связывающим сайтом нуклеопротеинового филамента не сильное и легко может быть разрушено (Takahashi and Norden, 1994). Этот этап характеризуется образованием коагрегатов ДНК, в состав которых могут входить как гомологичные, так и негомологичные молекулы ДНК (Gonda and Radding, 1986; Tsang et al., 1985; Pinsince and Griffith, 1992). Этап поиска гомологичных молекул может быть описан двумя теоретическими моделями: 1) поиск участков гомологии через проскальзывание одной молекулы ДНК вдоль другой или линейной диффузии, «sliding» 2) перебор комплементарных последовательностей ДНК

в трехмерном пространстве в ходе последовательной ассоциации и диссоциации, «jumping». Однако исследования этого вопроса показали, что в реальности поиск гомологии осуществляется согласно второй модели (Adzuma, 1998; Forget, 2012). Более того согласно последним данным, полученным с помощью одномолекулярных методов, при поиске гомологии важна как трехмерная конформация дцДНК так и протяженность оцДНК в филаменте. При этом слабые временные контакты осуществляются одновременно по всей длине филамента, формируя повышенную локальную концентрацию ДНК в области поиска. (Forget, 2012). С помощью меченных олигонуклеотидов, флуоресцентной техники «FRET» и «stop-flow» флуориметрии были охарактеризованы дискретные фазы переключения спаренности нитей ДНК. В частности удалось разделить кинетику переключения спаренности оснований от кинетики перемещения высвобождаемой нити ДНК из нуклеопротеинового комплекса (Folta-Stogniew, 2004). Различие между этими двумя процессами достигает одного порядка. По самым последним данным минимальный шаг для переключения спаренности оснований ДНК внутри филамента осуществляется в пределах трех последовательных нуклеотидов (Lee et al., 2015). В отсутствие гидролиза АТФ, зона гетеродуплекса может достигать 1000 пар оснований ДНК. Однако такой процесс обязательно требует присутствия АТФ или ее аналогов, хотя и без гидролиза. (Konforti and Davis, 1992; Menetski et al., 1990). Перенос более протяженной нити ДНК непременно требует RecA-зависимого гидролиза АТФ. На следующей стадии реакции обмена нитей происходит элонгация гетеродуплексного участка или «миграция ветви» ДНК, которая длится до полного завершения продукта, гибридной дцДНК, и не ограничена ни временем ни расстоянием. В классической реакции обмена нитей перенос ограничен длиной фагового кольца - примерно 8 т.п.н. Ни одна другая модель *in vitro* не демонстрирует более протяженного участка для переноса нити. Эта стадия, в отличие от предыдущей, характеризуется гидролизом АТФ, который необходим *in vivo* для преодоления

потенциальных препятствий в одной из нитей ДНК, представляющих собой зону гетерологии, сайты пиримидиновых димеров или другие повреждения. Однако как только гомологичная ДНК найдена, скорость гидролиза АТФ несколько падает относительно исходного филамента оцДНК: в ходе элонгации гетеродуплексного участка k_{cat} уменьшается с 30 мин^{-1} до $20\text{-}22 \text{ мин}^{-1}$. (Schutte and Cox, 1987). Элонгация гетеродуплексного участка ДНК происходит в направлении $5' \rightarrow 3'$ (относительно к оцДНК внутри филамента) со скоростью 380 пар нуклеотидов в минуту при 37°C (Cox, 2007). В зону гетеродуплекса могут включаться одиночные замены, пиримидиновые димеры, а так же вставки и делеции длиной до сотен пар оснований (Mitchell and West, 1994; Marrione and Cox, 1995).

Не только преодоление гетерологичных вставок, но также $5' \rightarrow 3'$ однонаправленность процесса «миграции ветви» обеспечивается гидролизом АТФ. Действительно, при использовании вместо АТФ его негидролизуемого аналога, АТФ γ S, направление обмена цепей ДНК может равновероятно протекать как в $5' \rightarrow 3'$, так и в $3' \rightarrow 5'$ направлении (Konforti et al., 1990). Данное наблюдение легло в основу «ротационной» модели, предложенной Майком Коксом. Предполагается, что во время гидролиза АТФ происходит конформационное изменение мономеров RecA, которое вызывает направленное вращение цепи ДНК, находящейся в филаменте, вокруг своей оси, вследствие чего происходит втягивание гомологичной ей цепи ДНК в бороздку филамента. Пространственное изменение положения одной цепи ДНК относительно другой приводит к расплетению исходной дцДНК и обеспечивает направление переноса цепи в одну сторону (Cox, 1994). Одновременно с этим $5'$ -конец вытесняемой из филамента цепи ДНК связывается белком SSB и теряет способность спонтанно атаковать образовавшийся гетеродуплекс (Lavery and Kowalczykowski, 1992). Для анализа наших исследований, приведенных в главе «результаты», представляется важным, что гибридная дцДНК остается внутри филамента RecA по завершении обмена цепей ДНК (Ullsperger et al., 1995).

1.6.1 Метаболизм клетки в ходе SOS ответа

Главная функция белка RecA – поиски гомологии между двумя молекулами ДНК и обмен гомологичных нитей. В отсутствие SOS-ответа в одной бактериальной клетке содержится до 10 тысяч молекул RecA (Little, et al., 1982). В ходе нормального клеточного роста, присутствие белка RecA необходимо в случае спонтанной остановки репликации или коллапса репликативной вилки вблизи повреждения на оцДНК. Филаменты RecA обнаружены в 15% бактериальной популяции, не испытывающей воздействия ДНК повреждающих агентов (Long, Sandler, 2008). Тем не менее, бактериальная популяция способна расти и размножаться в отсутствие гена *recA*, хотя и несколько медленнее. Началу рекомбинационной репарации предшествует пресинаптическая стадия, в ходе которой RecA, в присутствии молекулы АТФ и магния, кооперативно мультимеризуется вдоль оцДНК (Menetski et al., 1988). В момент стресса, количество филаментов возрастает пропорционально количеству поврежденных участков ДНК. При этом, инициируется так называемая SOS-функция белка RecA, которая выражается в индукции большой группы специфических для этого состояния белков. В клетках *E.coli*, SOS-состояние контролируется репрессорным белком LexA, который при контакте с многочисленными филаментами RecA начинает интенсивно саморасщепляться (Slilaty et al., 1986). По мере того, как концентрация LexA в клетке падает, промоторные участки генов SOS-ответа постепенно открываются. При этом изменяется уровень экспрессии более чем 40 генов, в том числе, – и самого гена *recA* (рисунок 2). Количество молекул RecA возрастает до 100 тысяч копий на одну бактериальную клетку (Stohl et al., 2003). Однако, даже при значительном среднем значении SOS ответа, до 25% клеток может оставаться в неиндуцированном состоянии (Gruenig, Sandler, 2008). Константа диссоциации белка LexA для операторной последовательности различных генов может отличаться в десятки раз (Little

et al., 1982). Благодаря этому отличию в константе, различные белки экспрессируются в разной степени, в зависимости от времени индукции и интенсивности SOS ответа. Данные о внутриклеточном количестве экспрессируемых белков варьируют в литературе и находятся в зависимости от метода измерения. Кроме широко используемого метода иммуноблота, экспрессию определяют по количеству бета-галактозидазы, ген которой встроен под интересующий промотор. Тогда полученные данные представляют собой среднее по бактериальной популяции (Kenyon and Walker, 1980). С использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP), активность любого из SOS индуцированных промоторов может быть измерена с помощью флуоресцентной микроскопии. В этом случае доступно определение экспрессии в конкретной клетке. Одним из самых активных промоторов является промотор гена *sulA*, чья экспрессия может увеличиваться в 80-130 раз (McCool, Sandler, 2004). Благодаря этому наблюдению для индуцируемой экспрессии белков чаще всего интересующий ген клонируют именно под этот промотор. Белки, экспрессируемые в ходе SOS ответа, задействованы почти во всех аспектах метаболизма бактериальной клетки. Среди них есть такие, которые участвуют в регуляции клеточного деления (SfiA), преобразуют ДНК в ходе репликации и репарации (SSB, polV, UvrD), обеспечивают экзотоксический эффект на окружающие бактерии другого вида (collicin) (Schoemaker et al., 1984; Glazebrook et al., 1983; Simmons et al., 2008). Некоторые SOS индуцируемые белки участвуют в конверсии структуры Холлидея. В частности белковый комплекс RuvAB без участия RecA взаимодействует со структурой Холлидея и способен смещать ее на тысячи пар оснований от места исходного возникновения. При этом возможно преодоление гетерологичных барьеров в сотни пар оснований (Parsons et al., 1995, Adams and West, 1995). Финальная структура Холлидея разрешается с помощью эндонуклеазной функции белка RuvC (Shah et al., 1997). Другим из важнейших ферментов экспрессируемых в ходе SOS ответа является полимеразы PolV. Эта полимеразы состоит из двух субъединиц

UmuD и одной субъединицы UmuC (Frank et al., 1993; Sutton et al., 2000). Полимераза PolV относится к классу «error prone» полимераз, которые характеризуются низкой точностью синтеза ДНК. Вследствие того, что полимеразы PolV проходя сайт повреждения, часто подставляют ошибочный нуклеотид в цепь ДНК, она является источником вынужденного мутагенеза. Известно, что полимеразы PolV (UmuD²C) является главным поставщиком мутантов для эволюционного отбора, хотя наверно не единственным. Полимераза PolV работает в едином комплексе с RecA, что возможно ограничивает потенциальную изменчивость рекомбиназ в ходе селекции (Schlacher et al., 2006; Gruber et al., 2015). Одновременно, полимеразы PolV забирает на себя исправление значительной части повреждений ДНК в местах брешей, которые могли быть исправлены филаментом RecA в ходе рекомбинации (Sommer et al., 2003; Foster, 2005). В отсутствие SOS- ответа лишь 1% повреждений ДНК корректируется с помощью полимеразы PolV. Тогда как в условиях стресса до 40% повреждений корректируется полимеразой по механизму "translesion synthesis" и 60% рекомбинацией (Naiman et al., 2016). Это соотношение может сильно сдвигаться в сторону механизма "translesion synthesis", если рекомбинация проводится ослабленным мутантом RecA.

Некоторые белки и белковые комплексы входят в непосредственное межбелковое взаимодействие с филаментом RecA и участвуют в регуляции его активности. Эти белки регулируют активность филамента RecA посредством прямых межбелковых взаимодействий. В настоящее время известно более десятка медиаторных белков, непосредственно участвующих в регуляции активности филамента RecA на пресинаптической и синаптической стадиях рекомбинации. Это RecO, RecR, RecF, RecN, RecX, PsiB, DinI, LexA и некоторые другие. Белки можно разделить на группы позитивных и негативных регуляторов. Это деление достаточно условно, поскольку некоторые из них, подавляя синаптическую функцию филамента, активируют пресинаптический этап. Известно, что белки LexA, DinI, UmuD и

RecX конкурируют между собой за сайт связывания в бороздке филамента. Поочередное замещение регуляторов друг на друга, в бороздке филамента, определяет смену фаз: от пресинаптической к синаптической и далее к мутагенезу, который индуцируется в самом конце SOS- ответа (Yasuda et al., 1998; Petrova et al., 2009; Bagdasarian et al., 1992; Shan et al., 1997; Lusetti et al., 2004; Renzette et al., 2007; Venkatesh et al., 2002; Stohl et al., 2003; Drees et al., 2004; Ragone et al., 2008).

1.6.2 Белки RecBCD и RecFOR систем рекомбинации

В зависимости от природы повреждения ДНК, в *E.coli* активируется одна из двух вспомогательных систем. В случае возникновения двуцепочечного разрыва, включается RecBCD система, тогда как в случае одноцепочечного повреждения – реализуется путь RecFOR (Clark, Sandler 1994). Раскручивание и последующая экзонуклеазная деградация двуцепочечной донорной ДНК гексамером RecBCD приводит к появлению молекулы ДНК с 3'-выступающим одноцепочечным концом (Dixon and Kowalczykowski, 1993). Комплекс RecBCD представляет собой полифункциональный гексамер, состоящий из шести субъединиц RecB, RecC и RecD. Он обладает ДНК-зависимой АТФазной, ДНК-геликазной, а также эндо- и экзонуклеазной активностями. Комплекс RecBCD прочно связывается со свободным концом дцДНК и расплетает его в реакции, требующей гидролиза АТФ. По ходу перемещения вдоль ДНК, комплекс разрушает каждую из цепей ДНК таким образом, что происходит образование коротких и длинных одноцепочечных «хвостов». Приблизившись к последовательности «*chi*», находящейся в строго определенной ориентации (3'-GGTGGTCG-5'), комплекс RecBCD останавливается, субъединица RecD модифицируется, что приводит к потере 3'- и к активации 5'-экзонуклеазной активности. Таким образом, последующее раскручивание ДНК приводит к образованию одноцепочечного 3'-конца, который затем используется белком RecA для инициации

рекомбинации (Arnold, Kowalczykowski, 2000; Churchill, Kowalczykowski, 2000; Cromie, Leach, 2000).

Интересно, что RecBCD- и RecFOR-пути рекомбинационного процесса не разделены между собой полностью, в значительной степени они перекрываются, и при инактивации RecBCD-пути, система RecFOR способна компенсировать его функцию (Amundsen and Smith, 2003). Независимо от того, что в каждом из указанных случаев в процесс формирования интермедиата подключаются разные регуляторные системы, оба рекомбинационных пути имеют одно общее свойство – они подготавливают 3'-выступающий конец оцДНК, предназначенный для взаимодействия с филаментом RecA. Подавляющее число рекомбинационных событий инициируется именно 3'-концом оцДНК, и только при исключительных условиях может инициироваться 5'-концом (Razavy et al., 1996; Cromie et al., 2000).

Большинство вспомогательных белков, непосредственно участвующих в регуляции активности филамента RecA, таких как RecO, RecF, RecR, RecX, DinI, SSB, UvrD, DprA, взаимодействуют только с собранным на ДНК нуклеопротеиновым комплексом RecA. Единственный из регуляторных белков, белок PsiB, связывается в растворе с мономером RecA вне ДНК, но не взаимодействует – сколько-нибудь заметно – с ДНК, LexA или SSB. Природный промотор гена *psiB*, который расположен на F-плазмиде, открывается только в ходе бактериальной конъюгации в клетке реципиента (Bagdasarian et al., 1992; Petrova et al., 2009). Таким образом, назначение белка PsiB – это предотвращение SOS-ответа клетки во время конъюгации, когда образуются протяженные участки оцДНК. Взаимодействуя с белком RecA, белок PsiB переводит его в неактивное состояние, оставляя оцДНК интактной.

Одновременно, в отсутствие SOS-ответа, доступ мономеров RecA к оцДНК заблокирован белком SSB. Белок SSB – один из самых важных участников метаболизма бактериальной ДНК. Его экспрессия в клетке в

значительной степени осуществляется по SOS-независимому механизму. Только один из трех промоторов гена *ssb* является индуцибельным (Brandsma et al., 1985; Meyer, Laine, 1990). При этом концентрация белка SSB в клетке увеличивается только в два раза. Длительное время считалось, что белки SSB и RecA взаимодействуют непосредственно друг с другом. Однако, несмотря на важную роль, которая, по-видимому, присуща белку SSB в рекомбинационном процессе, их взаимодействие осуществляется опосредованно – через ДНК либо другие медиаторные белки. Белок SSB, связывает оцДНК, представляя естественное препятствие для нуклеации мономеров RecA (Lohman et al., 1988). В силу особенностей его взаимодействия с оцДНК, процесс элонгации филамента RecA вдоль оцДНК, напротив, не встречает препятствия в виде белка SSB. Более того, белок SSB расплетает вторичную структуру оцДНК, позволяя RecA занять все свободные сайты на оцДНК (Kowalczykowski and Krupp, 1987; Roy et al., 2009). На более поздних стадиях рекомбинационного процесса белок SSB катализирует финальную стадию процесса обмена гомологичных цепей ДНК. Взаимодействуя с 5'-концом высвобождаемой из рекомбинационного комплекса цепи, он препятствует реинициации синапсиса и обеспечивает направленный ход миграции ветвей ДНК с последующим их полным разделением (Mazin and Kowalczykowski, 1998).

Таким образом, на каждом из этапов рекомбинационного процесса присутствует опосредованная функциональная взаимосвязь белков SSB и RecA. Большинство же других регуляторных белков, воздействуя прямо на эпитопы филамента RecA, осуществляют регуляцию этого взаимодействия. Так, белки RecF, RecO и RecR, направляя белок RecA, помогают ему инициировать филамент на оцДНК, занятой белком SSB. Эти активаторы многократно изменяют кинетику нуклеации RecA (Beernink and Morrical, 1990; Sancar, Hearst, 1993). Примечательно, что различают два типа белковых комплекса: RecFOR и RecOR. Комплекс RecOR стимулирует нуклеацию филамента RecA на любых сайтах, расположенных вдоль всей поверхности

оцДНК, занятой белком SSB. Функция комплекса RecFOR куда более определена с точки зрения ее роли в клетке. Он стимулирует инициацию филамента в местах перехода оцДНК в дцДНК. Подобные смешанные структуры ДНК образуются в клетке непосредственно после 5'-нуклеазной деградации одной из комплементарных цепей ДНК белком RecJ. При этом необходимо участие геликазы RecQ, которая расплетает двуцепочечный участок ДНК, позволяя экзонуклеазе обработать протяженный участок одной из цепей ДНК. Исходно, комплекс RecFOR находит в ДНК место перехода оц- в дцДНК. После этого комплекс привлекает мономеры RecA, играя роль платформы, от которой филамент RecA интенсивно расширяется в сторону оцДНК, занятой белком SSB. Скорость расширения филамента при таком взаимодействии максимальна, относительно скорости при всех других известных условиях. С другой стороны, комплекс RecFOR препятствует реверсивному направлению мономеров в зону дцДНК, играя роль своеобразного клапана (Shan et al., 1997; Morimatsu, 2003; Handa et al., 2009).

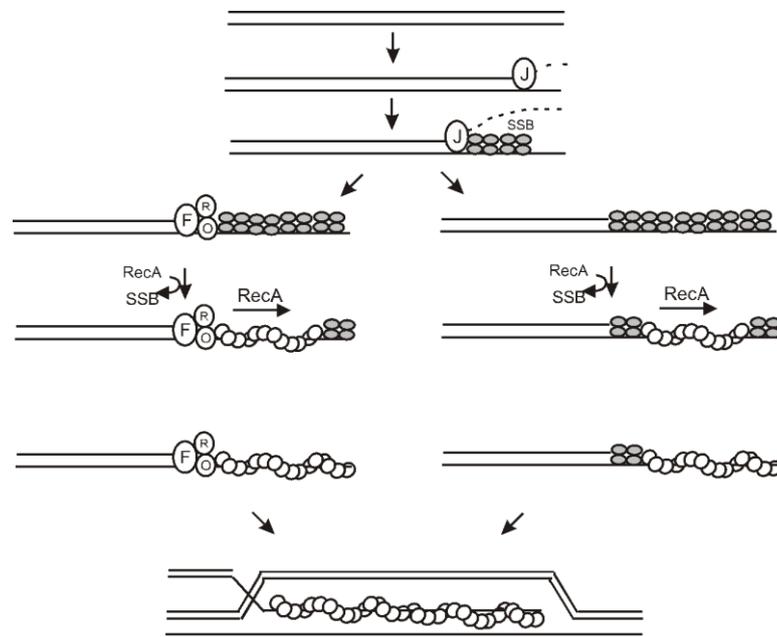


Рисунок 5. Схема загрузки филамента на ДНК с помощью комплекса RecFOR.

После того, как мономеры RecA с помощью комплекса RecFOR образовали протяженный филамент вдоль оцДНК, дальнейшая регуляция активности может осуществляться с помощью белков DinI и RecX. Белок DinI попадая в бороздку филамента RecA, замедляет динамику разборки мономеров. Примечательно, что присутствие DinI в бороздке филамента затрудняет процесс поиска гомологичной дцДНК и последующий обмен гомологичных цепей ДНК. Однако не ясно на сколько реализуется такая ситуация в реальности, поскольку полное ингибирование синапсиса требует очень высокой концентрации DinI в клетке. Филамент RecA, провзаимодействовавший с белком DinI, переходит в специфическое состояние. Доступ гомологичной ДНК в бороздку филамента, для переключения спаривания цепей ДНК, заблокирован присутствием там белка DinI. Если работа белков RecO, RecF и RecR никак не угнетает рекомбиназную функцию RecA, то функция белка DinI представляется неоднозначной. Являясь позитивным регулятором филамента RecA на этапе мультимеризации, белок DinI препятствует связыванию филамента не только с гомологичной цепью дцДНК, но и с белками RecX и UmuD (Voloshin et al., 2001; Lusetti et al., 2004; Renzette et al., 2007). Ответить на этот вопрос мы попытались с помощью метода конъюгации в главе «результаты».

1.6.3. Конститутивный SOS-ответ

Данные о взаимосвязи конститутивного SOS-ответа и гиперрекомбиногенности остаются неоднозначными. Ранее предполагалось, что все гиперактивные белки RecA, способные активно конкурировать с белком SSB за участки оцДНК в репликативной вилке, автоматически вызывают конститутивный SOS-ответ (Lavery and Kowalczykowski, 1992; Modiraju et al., 1992). Но как оказалось, такие активные варианты, как RecAV37M, RecAD112R, RecAPa, RecAΔC17, RecAR28D либо совсем не индуцируют SOS-ответ, либо индуцируют такой уровень SOS-ответа, который ниже ожидаемого значения.

Современное представление о возможных механизмах конститутивного SOS-ответа основано на работах группы Сэндлера (Long et al., 2008; Long et al., 2009; Long et al., 2010). Принципиальное утверждение Сэндлера состоит в том, что разные рекомбинационно-активные варианты RecA вовлечены во взаимодействие с разными ДНК субстратами. Сэндлером и соавторами подробно исследованы варианты белков, поддерживающие стабильно высокий уровень конститутивного SOS-ответа – это RecAE38K и RecAF217Y. Уровень SOS-ответа определяли с учетом разного генетического фона. Анализируя влияние на коэкспрессируемых с *recA* генов на SOS-ответ, авторы заключили, что RecAF217Y способен мультимеризоваться *in vivo* не только на оцДНК, но и на дцДНК. При этом указывается, что автопротеолиз репрессорного белка LexA падает в таких условиях лишь частично, а не полностью. Однако эта особенность не характерна для многих других вариантах белка. Показано, что RecAF217Y-зависимый конститутивный SOS-ответ проявляется только одновременно с присутствием белков комплекса RecBCD, который помогает «загрузке» филамента на молекулу ДНК с протяженным двунитевым участком. Действительно, во время реверсивного хода репликативной вилки в обратную сторону может спонтанно возникнуть новая «гетеродуплексная» дцДНК с выступающим однонитевым участком, содержащим RecA. Процессинг такого участка ДНК, обладающей явным сходством со структурой Холлидея, может привести к тому, что филамент RecA автоматически окажется встроенным в зону дцДНК. Гипотеза подтверждается тем, что конститутивный SOS-ответ в большой степени зависит от экспрессии белков комплекса RuvAB, имеющего главенствующую роль в миграции структуры Холлидея. Хотя авторасщепление белка LexA, репрессора SOS-ответа, эффективнее катализируется белком RecA, образованном на оцДНК, филамент сформированный на дцДНК все же сохраняет достаточную каталитическую активность (М. Кокс, личное сообщение). Для обсуждения наших данных представляется важным, что в описанной модели экспрессия белка RecX

приводит к подавлению SOS-ответа. В этом случае, биохимические особенности белка RecX возможно согласуются с его потенциальным назначением *in vivo*. Можно предположить, что основное назначение RecX – это предотвращение непродуктивных взаимодействий филамента с дцДНК в хромосоме или репликативной вилке. Вместе с тем, эта логическая схема получила подтверждение только в наших экспериментах, которые будут представлены ниже в главе результаты.

1.6.4. Белок RecX и его роль в гомологической рекомбинации

Ген *recX* обнаружен у подавляющего числа бактерий и растений. Причем растения обладают модифицированным вариантом *recX*, который по-видимому был когда-то унаследован от бактерий. Однако он отсутствует у архе и эукариот (Lin et al., 2007). Белок RecX – негативный регулятор белка RecA как *in vitro*, так и *in vivo*. Подавляющее действие белка на чувствительность бактерии к УФ излучению и выраженность SOS ответа в большой степени зависит от способа экспрессии RecX. Будучи экспрессированным с хромосомы, где расположена единственная копия его гена, *recX* только незначительно повышает выживаемость *E.coli* во время УФ облучения. В тоже время, при гиперэкспрессии RecX с плазмидного вектора, выживаемость клеток при УФ облучении значительно падает. В норме содержание молекул RecX в *E.coli* достигает всего 50 молекул (Stohl, 2003). При SOS ответе количество молекул RecX возрастает до 800 копий. Другой исследовательской группой было показано, что количество молекул RecX в 500 раз меньше, чем молекул RecA в ходе SOS ответа. Ген *recX* не во всех бактериях является частью SOS системы клетки. Например, в бактерии *Bacillus subtilis* он экспрессируется отдельно от гена *recA* (Vlasik et al., 2014). Интересно, что в условиях делеции гена *recX*, гиперэкспрессия RecA приводит к летальному фенотипу либо остановке роста в таких бактериях как *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptomyces lividans* (Sano, 1993; Vierling et al., 1993; Papavinasasundaram et al., 1997). В то же

время гены *recX* из *E.coli* и *Neisseria gonorrhoea* могут частично комплементировать друг друга, будучи экспрессированными в неродственном штамме. Впервые белок RecX из *Mycobacterium tuberculosis* был исследован *in vitro* в 2002 году, а RecX из *E.coli* в 2003 (Venkatesh et al., 2002; Stohl et al., 2003; Pages et al., 2003). Однако интерпретация молекулярного механизма ингибирования филамента белком RecX остается противоречивой по сегодняшний день. Показано, что RecX, взаимодействуя непосредственно с RecA, препятствует элонгации филамента, «принуждая» его диссоциировать от оцДНК (Venkatesh et al., 2002; Stohl et al., 2003; Drees et al., 2004). Разработано несколько моделей подавления филаментации RecA белком RecX. Согласно одной из них, RecX находит брешь между кластерами мономеров и, связываясь с концевым мономером, прерывает мультимеризацию мономеров далее вдоль цепи оцДНК. При этом динамика разборки мономеров от 5'-конца кластера не нарушается, но останавливается процесс сборки, а именно – этапа достройки кластера с 3'-конца за счет подсоединения новых мономеров (Drees et al., 2004). Исходя из другой модели, RecX взаимодействует с филаментом RecA спонтанно вдоль всей его длины, провоцируя диссоциацию мономеров RecA прямо в местах их взаимодействия (Ragone et al., 2008). Третья модель предполагает связывание RecX с большой бороздкой филамента, где RecX перекрывает сразу три последовательных мономера RecA, объединяя их в единый блок. Вследствие такой блокировки отдельные мономеры RecA утрачивают возможность согласованных конформационных изменений и последующего за ними гидролиза АТФ (VanLoock et al., 2003). С помощью метода «гель-шифт» показано, что белок RecX может взаимодействовать с ДНК. Действительно, возможность взаимодействия RecX с ДНК продемонстрирована в нескольких работах, но величина константы их связывания оказалась незначительной и свидетельствует о том, что сродство RecX к ДНК слишком невелико, чтобы учитывать его при построении модели (Drees et al., 2004). Таким образом, молекулярный механизм, лежащий в основе данного наблюдения, должен

быть уточнен. Остается также непонятным назначение белка RecX в бактериальной клетке. Известно, что актуальность RecX сохраняется в такой радиоустойчивой бактерии как *D. radiodurans*. Ранее белок RecX из *D. radiodurans* изучался лишь единственной научной группой, которая продемонстрировала, что белок RecX в бактериях *D. radiodurans* подавляет радиоустойчивость *in vivo* и ингибирует активность белка RecADr *in vitro*. Методом «гель-шифт» выявлена способность RecX из *D. radiodurans* связываться не только с RecA, но и с ДНК (Sheng et al., 2005; Sheng et al., 2010). Несмотря на функциональное подобие, RecX из *D. radiodurans* отличается по аминокислотному составу и имеет 45 дополнительных аминокислот на N-конце белка, которые отсутствуют в белке из *E. coli*. Молекулярная архитектура RecXD.r и его нуклеопротеинового комплекса не исследовалась. Остается не исследовано, образуются ли какие-либо межбелковые взаимодействия между RecXD.r и другими регуляторными белками в *D. radiodurans*. В *E. coli* с белком RecX из всех регуляторов непосредственно связывается только белок RecF. Белок RecF по своему действию является антагонистом белка RecX *in vivo* и *in vitro*. Количество свободного белка RecX в растворе падает после взаимодействия с белком RecF, в результате чего активность филамента RecA сохраняется (Lusetti et al., 2006). Действие других регуляторов на RecX, таких как DinI и SSB, является опосредованным, так как основано на конкурентном связывании с оцДНК или RecA. Сайт взаимодействия белков RecX и DinI с филаментом представлен большой бороздкой, где связывание обоих белков носит взаимоисключающий характер. При избыточной концентрации DinI, процесс ингибирования филамента белком RecX полностью подавлено (Lusetti et al., 2004; Renzette et al., 2007).

В лаборатории Майка Кокса показано, что активность RecX может быть подавлена *in vitro* не только белком DinI, но и с помощью некоторых вариантов белка RecA, а именно RecAE343K и RecADС17. Оба изменения затрагивают С-субдомен белка RecA. При этом такие основные функции

вариантов как ДНК трансферазная и АТФазная остаются незатронутыми. Действительно, оцДНК-зависимая АТФаза этих вариантов в 2-3 раза устойчивее к действию RecX (Drees, 2004). Наблюдение легло в основу вывода о том, что RecX взаимодействует с С-концевым субдоменом белка RecA. Более того, наблюдение стало дополнительным аргументом в пользу той модели ингибирования, в основе которой лежит так называемый кэппинг-механизм. Позднее, другими научными группами (Ragone et al., 2008) была проведена комплексная реконституция RecA-RecX нуклеопротеинового комплекса на основе данных электронной микроскопии, молекулярного докинга и кристаллической структуры (VanLoock, 2003). Авторы с помощью структурных исследований подтвердили предположение о взаимодействии RecX с С-концевым субдоменом белка RecA. При этом, одновременно связываясь с главной бороздкой филамента, белок RecX теоретически должен препятствовать естественному вращению С-конца мономера относительно ДНК.

С помощью одномолекулярной техники была предпринята попытка уточнить функциональный механизм ингибирования. В эксперименте задействовали RecX из *Mycobacterium tuberculosis*. Однако к существующим вопросам регуляции добавились новые. Ингибирующий эффект белка RecX на филамент пропадал в момент приложения силы (≥ 7 pN) к концам молекулы ДНК (Le et al., 2014). Более того, уже разобранные мономеры RecA реполимеризовались вновь на ДНК, когда внешнее усилие на ДНК прикладывалось уже после эффекта RecX. Данное наблюдение не очень сочетается с классической «кэппинг» моделью ингибирования. Как возможное объяснение найденным эффектам предложен ряд допущений. Главное допущение, предложенное авторами, заключается в том, что при приложении усилия на ДНК более 7 pN, мономеры приобретают возможность присоединяться с 5' конца филамента. Если рост филамента в силу новых условий становится возможным в обратную сторону, то согласно модели RecX перестает быть препятствием к полимеризации RecA на ДНК.

Действительно практическая возможность полимеризации RecA в обратную сторону 3'-5' при некоторых измененных условиях была доказана в нескольких работах (Joo, 2006; Bell et al., 2012). Однако связь между обратной полимеризацией и приложенной внешней силой к ДНК остается недоказанной. Более того, даже доказательство наличия такой связи не снимает возможность присутствия других интерпретаций.

1.7.1 Конъюгационная рекомбинация

Рекомбинационную активность искусственных и природных вариантов белка RecA *in vivo* исследуют различными методами. Несмотря на то, что ген *recA* имеет определяющее значение на выживаемость бактерии в ходе УФ облучения, исследование системы гомологической рекомбинации серьезно осложняется одновременным действием генов других систем репарации. Однако в ходе конъюгации SOS ответ подавлен, системы репарации не активированы и активны только белки гомологической рекомбинации. Это позволило разработать подход для выявления рекомбинационно-активных генов, мутаций и определить степень их участия в рекомбинационном процессе. Увеличение числа случаев инициации рекомбинационных обменов ДНК получило название гиперрекомбинация. Методы, основанные на использовании бактериальной конъюгации, появились в семидесятых годах прошлого столетия, позже были усовершенствованы и не потеряли свою актуальность до настоящего времени (Smith, 1991; Lanzov et al., 2003). В ходе бактериальной конъюгации у *E. coli*, донорные клетки передают реципиентам большой фрагмент хромосомы или даже полную хромосому, которая затем интегрируется в хромосому реципиентов (Freifelder, 1968; Ippen-Ihler et al., 1986). Передача всей хромосомы из донорной клетки в реципиент осуществляется в течение 100 минут, в связи с чем, длина ДНК бактериальной хромосомы измеряется в минутах. Во время конъюгации оцДНК донорной клетки своим 5'-концом входит в реципиентную клетку, где достраивается до двуцепочечной формы с помощью конъюгационного

синтеза ДНК, осуществляемого репликативным аппаратом реципиента. Синтез комплементарной цепи ДНК в реципиентной клетке происходит прерывисто, в направлении 3'→5' относительно ДНК донора, с помощью фрагментов Оказаки. Входящий 5'-конец оцДНК достраивается до дцДНК, тогда как 3'-конец может оставаться одноцепочечным. До тех пор, пока донорная оцДНК полностью не достроена до двуцепочечного состояния, она имеет смешанный характер, то есть состоит из дцДНК с одноцепочечными пробелами. Затем образовавшиеся двуцепочечные концы донорной ДНК обрабатываются комплексом RecBCD. Получившиеся при этом одноцепочечные 3'-концы внедряются в хромосому реципиента с образованием «Д-петель», которые, в свою очередь, становятся местом для инициации нового раунда репликации. Это завершается тем, что фрагмент донорной ДНК оказывается интегрированным во вновь реплицированную хромосому. Таким образом, простейший метод оценки предполагает подсчет относительного числа рекомбинантов, с помощью чего можно узнать эффективность интеграции донорной ДНК в хромосому реципиента. В большинстве случаев этот метод дает возможность лишь различить (*rec*-) и (*rec*+) - фенотипы.

Второй подход в оценке рекомбиногенности – измерение частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) на единицу длины ДНК, что отражает гибридную структуру рекомбинанта, включающего фрагменты как донорной, так и реципиентной ДНК. Значение ЧРО определяется количественно и показывает степень сцепленности между селективируемым и неселективируемым маркерами. Методы оценки эффективности конъюгационной рекомбинации основаны Ллойдом (Lloyd, 1978). Им же обнаружено первостепенное значение генов *recA* и *lexA* в конъюгационной рекомбинации. В его работах использовались мутанты по обоим из генов. Ген *lexA3* кодирует нерасщепляемый вариант репрессора (LexA3), который конститутивно блокирует экспрессию всех белков SOS-ответа, оставляя лишь базовое количество белка RecA в клетке. Вариант RecAE38K,

экспрессируемый геном *recA441 (tif-1, recA730)*, обладает свойством усиленно расщеплять репрессорный белок LexA дикого типа, что сопровождается значительной дерепрессией белков SOS-ответа, включая его самого. Комбинируя в бактерии имеющиеся варианты мутаций, Ллойд установил основные закономерности, первая из которых заключается в том, что ЧРО возрастает до некоторого уровня при увеличении экспрессии RecA. Другая закономерность состоит в том, что ЧРО зависит не только от уровня экспрессии RecA, но также от особенностей мутантного гена *recA* и от присутствия других генов SOS-ответа. В дальнейшем, усилиями нескольких исследовательских групп была выявлена принципиальная роль большинства генов *recF*- и *recBCD*-пути в конъюгационной рекомбинации (Lloyd, Buckman, 1995; Lovett, Clark, 1983; Clark, Sandler, 1994; Bidnenko et al., 1999). Вместе с тем, подход имеет ряд технических недостатков. Методики культивирования бактерий, обсева и анализа полученных рекомбинантов – исключали объективное количественное сравнение генетических факторов.

Данные о взаимосвязи рекомбиногенности и способности рекомбиназ индуцировать SOS-ответ – неоднозначны. Исходно, сложилась точка зрения, что любой гиперактивный вариант RecA, способный быстро замещать белок SSB на молекулах оцДНК в местах репликативной вилки, автоматически вызывает конститутивный SOS-ответ (Madiraju et al., 1992; Lanzov, 2002). Но позже выяснилось, что такие активные варианты рекомбиназ, как RecAV37M, RecAD112R, RecAPa, RecAΔC17, либо совсем не провоцируют SOS-ответ, либо уровень SOS-ответа гораздо ниже ожидаемого значения. Справедливо отметить, что метод конъюгационной рекомбинации – не единственный подход для изучения рекомбиногенности *in vivo*. Другой метод для оценки эффективности гомологической гиперрекомбинации в *E. coli* предложен Конрадом (Konrad, 1977). Им был сконструирован специальный штамм с хромосомными дупликациями генов *lacY* и *lacZ*, который предназначен для отбора рекомбинантов. Каждый из дублированных *lac*-регионов содержит собственные, не перекрывающиеся друг с другом,

делеции, которые определяют (*Lac*-)-фенотип. Рекомбинируя между собой, дубликации восстанавливают *lac*-ген, который приводит к (*Lac*+)-фенотипу, что легко можно регистрировать по изменению окраски колоний. Этот метод позволяет проанализировать большое число бактерий за короткий период времени, но по сравнению с методом, основанным на конъюгации, не позволяет сделать количественную оценку активности исследуемых белков. Кроме того, метод Конрада требует использования мутагена для активации SOS-ответа и повреждений ДНК, а это, в свою очередь, может замакировать истинный гиперрекомбиногенный фенотип.

Исходя из вышеперечисленных фактов, нами были сформулированы задачи: найти верхний предел рекомбиногенности в конъюгационной рекомбинации, а так же определить естественные ограничители гиперрекомбинации.

1.7.2. Направленная эволюция рекомбиногенности *RecA* в ходе конъюгации

Конъюгационная рекомбинация осуществляется непосредственно белком *RecA* в отсутствие каких-либо повреждений ДНК, что сильно упрощает анализ причин и последствий рекомбиногенности. Существует два наиболее часто используемых пути в поиске гиперрекомбиногенных вариантов *RecA*: сайт направленный мутагенез интересующих зон гена *recA* и направленная эволюция рекомбиногенности *in vivo*. Низкая экспрессия белков SOS ответа и, что самое важное, полное отсутствие полимеразы PolV, позволяют проводить искусственный отбор трансконъюгантов несущих гиперрекомбиногенные варианты белка *RecA*. Оригинальность метода заключается в том, что плазмида с геном *recA* придающая клетке наибольший выход трансконъюгантов отбирается, трансформируется в исходный штамм *recA*⁻ после чего направляются в следующий цикл конъюгации. После череды некоторого количества раундов конъюгации было отобрано около 20 вариантов вызывающих гиперрекомбиногенный фенотип

(Kim et al., 2015). Интересно, что большинство вариантов имели одиночные аминокислотные замены RecA. Другой подход – хаотичная замена аминокислот в последовательности белка RecA естественным образом в ходе рекомбинации, после чего все варианты анализируются в тесте на активность в конъюгационной рекомбинации. Ранее под руководством профессора Ланцова В.А. были проанализированы десятки химерных рекомбиназ, в которых последовательности белка RecA из *E.coli* случайным образом перемешаны с последовательностями белка RecA *P.aeruginosa* (Chervyakova et al., 2001). В результате перемешивания аминокислотных последовательностей двух исходных рекомбиназ, образовывались химерные белки, имеющие самые разные комбинации субдоменов и функциональных эпитопов (таблица 1).

Таким образом, в совокупности описанных методов, удалось получить ряд эффективных одиночных и множественных аминокислотных замен по всей протяженности белка RecA (Lloyd, 1978; Chervyakova et al., 2001; Kim et al., 2015). Наиболее интересные варианты белков исследовались в биохимических экспериментах. Отличительным свойством большинства гиперрекомбиназ оказалась выраженная способность мультимеризоваться на одноцепочечной ДНК, вытесняя при этом белок SSB. В действительности белок SSB является единственным активным антагонистом белку RecA на одноцепочечной ДНК во время конъюгации. Белок SSB полностью занимает входящий одноцепочечный конец донорной хромосомы в клетке реципиента. Базовая концентрация SSB в клетке относительно высокая, он экспрессируется с трех отдельно регулируемых промоторов и во время SOS ответа его количество увеличивается лишь в два раза. Для того, чтобы инициировать рекомбинационные события между донорной и реципиентной хромосомами, RecA должен преодолеть препятствие в виде SSB.

Таблица 1. Активность химерных рекомбиназ (Chervyakova et al., 2001).

Химера		Структура химерного белка RecAX				Рекомбиногенность		конститутивная SOS-индукция	
тип	номер	1	100	200	300	Число исследованных клонов	Δ ЧРО	Число исследованных клонов	Δ SOS
	Ec					1100	1.00	12	1.00
	Pa					600	4.42±0.54	12	1.80±0.10
I	X1					700	1.24±0.19	8	1.66±0.21
	X2					600	1.06±0.17	6	1.86±0.25
	X3					700	1.16±0.12	6	2.11±0.29
	X4					700	1.40±0.13	4	1.62±0.20
	X5					600	1.06±0.08	4	2.00±0.26
	X6					600	0.97±0.09	4	1.93±0.27
	X7					700	1.11±0.11	4	2.04±0.33
	X8					1400	4.91±0.49	4	2.15±0.27
	X9					900	4.64±0.50	4	2.39±0.34
	X10					700	2.92±0.26	4	1.76±0.21
	X16					600	1.45±0.16	4	1.41±0.18
	X17					600	0.86±0.09	4	1.50±0.20
X18					600	0.92±0.06	4	1.50±0.21	
II	X20					800	0.92±0.12	7	1.38±0.20
	X21					1400	2.94±0.17	7	1.65±0.28
	X32					600	6.17±0.89	5	2.11±0.30
	X33					600	5.97±0.68	6	2.03±0.29
	X34					600	6.52±0.56	6	2.18±0.30
	X35					600	6.20±0.64	6	2.39±0.35
III	X37					800	1.59±0.20	9	1.33±0.24
	X38					700	3.51±0.29	9	1.69±0.34
	X45					600	7.88±0.50	9	2.59±0.36
	X46					600	5.03±0.34	6	3.05±0.46
	X47					600	3.00±0.24	6	3.48±0.45
	X48					600	3.46±0.32	6	2.06±0.32
	X49					600	0.56±0.08	6	2.60±0.39
	X50					600	0.97±0.08	6	2.26±0.37
	X51					600	1.02±0.08	6	2.16±0.36
	X52					600	1.17±0.19	9	1.66±0.28
IV	X53					700	8.92±0.59	9	1.31±0.17
	X54					700	7.93±0.59	9	1.29±0.16

Вместе с тем, остается вопрос, насколько устойчив гиперрекомбиногенный фенотип в ряду клеточных генераций. Как

изменяется метаболизм ДНК в присутствии гиперрекомбиногенных вариантов RecA? Каковы механизмы утери гиперрекомбиногенного фенотипа и возврата к норме? Ответить на эти вопросы мы смогли на примере мутанта, несущего рекомбиназу с искусственной аминокислотной заменой D112R.

1.7.3 Роль RecA в радиорезистентности и направленная эволюция

Один из самых важных вопросов в изучении гомологической рекомбинации является вопрос о потенциале рекомбиногенности, заложенном в белке RecA и путях его реализации. Кроме того, необходимо установить взаимосвязь этого потенциала с сопутствующим генетическим фоном.

В лаборатории Майка Кокса штамм *E.coli* подвергали воздействию ионизирующей радиации в течение большого числа клеточных генераций, индуцируя, таким образом, направленную эволюцию радиоустойчивого фенотипа. В результате отбора получены дочерние линии бактерий, которые в тысячи раз превосходили исходный штамм-основатель по уровню радиоустойчивости (Harris et al., 2009; Byrne et al., 2014; Piechura et al., 2015). Эволюционировавшие линии бактерий оказались способны выдерживать дозу 3 кГр почти без последствий для клетки.

Такой уровень резистентности сопоставим с уровнем резистентности бактерии *Deinococcus radiodurans*, которая способна выдерживать дозу 5 кГр, являясь одним из самых устойчивых организмов к радиоизлучению. Для человеческого организма эта доза почти в тысячу раз превышает дозу летального облучения. Следует отметить, что селекция бактериальных линий *E.coli* сопровождалась комплексным изменением одновременно множества генов, механизмов и других компонентов системы клеточного метаболизма. Важно, что эти перестройки и изменения затронули разные метаболические пути в разных бактериальных популяциях. Основные мутации, произошедшие в бактериальном геноме, приведены в **таблице 2**. Как видно,

каждая из эволюционировавших линий имеет комбинацию мутаций одновременно по нескольким генам. Как следует из таблицы, в белке RecA обнаружено всего две наиболее часто встречаемых аминокислотных замены, находящиеся в положении 276 и 289. Соответствующие этим положениям аминокислоты локализуются на поверхности филамента вблизи зоны большой бороздки. Последующие исследования выявили, что при перемещении мутантных генов обратно в исходный штамм «основатель» они придают ему лишь частичную устойчивость к радиации. Ее уровень оказался не сопоставим с теми уровнями устойчивости, которые наблюдаются в случае «эволюционировавших» штаммов. Линии экспрессирующие варианты белков RecAD276A и RecAA289S продемонстрировали увеличение резистентности всего в 2 и 3 раза соответственно. Найденные белки не обнаруживают новых биохимических качеств по сравнению с белком дикого типа ни в реакции обмена гомологичных цепей ДНК, ни в АТФазной активности (Piechura et al., 2015). Однако оба варианта белков RecA характеризуются повышенным сродством к одноцепочечной ДНК, что выражается в ускоренной кинетике вытеснения белка SSB. Другое важное отличие вариантов проявилось в чувствительности к концентрации АДФ. Известно, что RecA дикого типа функционирует в условиях *in vitro*, когда концентрация АДФ не превышает 10%. При превышении этой концентрации АДФ, филамент разбирается или диссоциирует от ДНК. В случае с вариантами белков RecAD276A и RecAA289S, даже такое превышение концентрации АДФ как 40-50% все еще не являлось ингибирующей. Возможно, что в следующих работах появятся данные о коррекции межбелковых взаимодействий этих рекомбиназ с основными регуляторами рекомбинации, но пока такие данные в литературе отсутствуют.

Таблица 2. Перечень мутаций в эволюционировавших линиях (Harris et al., 2009).

Ген/функция	Локус	Исходный нуклеотид	Мутантный нуклеотид	Замена
Рекомбинационная репарация				
ruvB	b1860	T	C	D52G
ruvB	b1860	C	A	D19Y
recA	b2699	C	A	A289S
recA	b2699	T	G	D276A
recA	b2699	C	T	D276N
Репликация				
priA	b3935	C	T	V553I
priC	b0467	A	G	L162P
dnaT	b4362	G	A	R145C
dnaB	b4052	T	C	L74S
dnaB	b4052	C	A	P80H
Клеточное деление				
ftsW	b0089	A	G	E34G
ftsW	b0089	A	G	M268V
ftsZ	b0095	G	A	D303N
Протеолиз				
clpP	b0437	A	G	Y75C
clpP/clpXa	b0437/ b0438	G	A	-
clpX	b0438	A	G	Y384C
Транспорт глутамата				
gltS	b3653	A	G	V255A
Другое				
ylbEb	b4572		G	K85E
yjgL	b2453	A	G	N188D
yjgL	b2453	A	G	D523G

Вместе с тем остается главный вопрос, почему же столь невелико число мутаций в гене *recA* у бактерий прошедших жесткий фильтр селективного отбора? Почему пределы изменчивости гена *recA* оказываются настолько ограниченными, а изменения часто касаются генов, не имеющих отношение к рекомбинационной репарации? Чтобы разобраться в этом вопросе стоит обратиться к молекулярному механизму адаптации бактерий к длительному стрессовому воздействию. В ходе бактериального SOS ответа на токсичное действие внешних факторов, активируется функция полимеразы PolV представляющей собой комплекс субъединиц UmuD₂C. Полимераза PolV относится к семейству «error prone» полимераз, чья работа характеризуется низкой точностью (Patel et al., 2010; Goodman, 2014; Robinson et al., 2015). Экспрессируется полимеразы на поздней стадии SOS ответа, лишь через 45 минут после экспрессии белка RecA, когда стресс принимает хроническую форму. В ходе ошибочной подстановки нуклеотидов, во время репликации ДНК, частота мутагенеза увеличивается более чем в 100 раз относительно нормы. Фенотипически этот процесс выражается в множественном появлении мутантов. При том что абсолютное большинство мутаций оказываются нейтральными либо вредными, полимеразы PolV является главным источником материала для эволюционного отбора, хотя наверно не единственным. Данный факт начал получать интерес для индустрии антибиотиков. Действительно новые исследования показали, что одновременное использование ингибиторов полимеразы PolV с антибактериальными агентами приводит к утере бактериальной клеткой возможности адаптироваться к стрессовому воздействию на генетическом уровне. В последнее время прикладные исследования все больше начинают уделять внимание поиску «компаундов», подавляющих генетическую изменчивость бактерий, возникающую в ответ на действие антибиотика. Белок RecA становится основной мишенью в этом поиске (Cirz et al., 2005; Lee et al., 2005; Cline et al., 2007; Nautiyal et al., 2014; Bellio et al., 2014; Alam et al., 2016). Таким образом, можно заключить, что

предопределенность эволюционной изменчивости гена *recA* заключена в ограничениях, наложенных на активность полимеразы PolV. Известно, что перед прохождением полимеразой сайта повреждения, она образует комплекс с белком RecA, так называемую мутасому. Любые нарушения межбелковых связей в мутасоме должны приводить к падению мутагенеза и как следствие утере возникновения устойчивости. Отдельно от RecA, комплекс UmuD'₂C не функционирует. Из данного положения следует, что для эволюционного процесса допустимы лишь те изменения в белке RecA, которые не затронут контактов с мутасомой. Подтверждение этой теории последовало в 2015 году, когда Гудман, ведущий эксперт по полимеразе PolV, совместил *in vivo* мутасому с одним из самых рекомбиногенных вариантов белка RecA – RecAD112R (Рис 6).

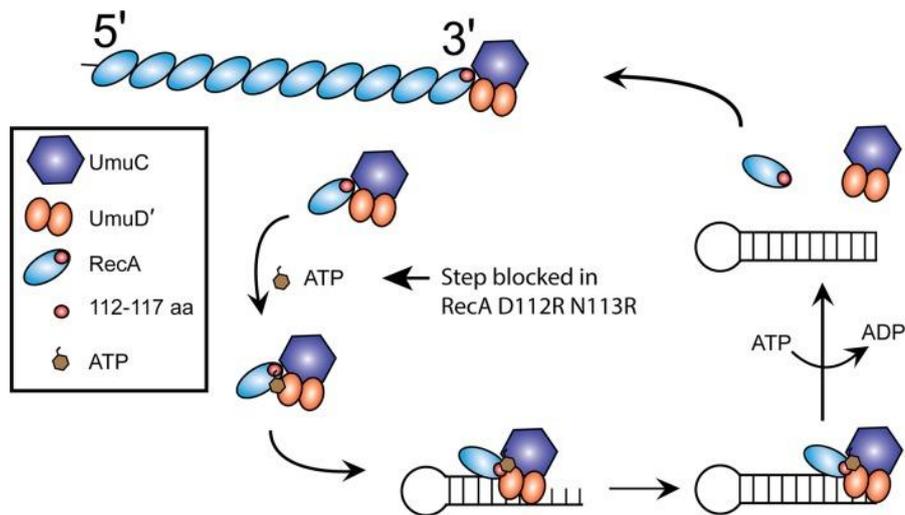


Рисунок 6. Нарушение межбелковых взаимодействий между мономером *RecA* и комплексом *UmuD'*₂*C* (Gruber et al., 2015).

Данная аминокислотная замена была получена искусственно и затрагивает зону интерфейса, который как считается, вовлечен в межбелковые взаимодействия с другими белками. При полном сохранении гомологической рекомбинации, бактериальная клетка полностью лишилась возможности индуцируемого мутагенеза (Gruber et al., 2015). Аминокислотная замена мешает установлению важных межбелковых

взаимодействий с полимеразой и разъединяет рекомбинацию и мутагенез. Таким образом, успех направленной селекции сохраняется только при достаточной консервативности архитектуры межбелковых контактов RecA и источника мутагенеза. С другой стороны, вероятность репарации повреждения через рекомбинацию обратно пропорциональна вероятности коррекции повреждения с помощью мутагенеза, так как эти два процесса взаимоисключают друг друга. При использовании ослабленного варианта рекомбиназы доля случаев коррекции через мутагенез возрастает очень сильно. Исходя из приведенных данных, можно заключить, что рекомбиногенный потенциал, заложенный в белке RecA теоретически должен намного превосходить тот уровень реальной рекомбиногенности, при котором клетка может сохранять генетическую изменчивость и адаптацию. С другой стороны гиперактивные варианты белка RecA способны частично или даже полностью компенсировать дефектную чувствительность к УФ некоторых мутантных линий. На фоне мутаций в генах *recF*, *recO*, *recR* чувствительность штамма *E. coli* к УФ-облучению резко возрастает (Rangarajan et al., 2002). Аналогичный эффект обнаружен в некоторых других бактериальных штаммах, в том числе *Bacillus subtilis* (Vlasik et al., 2014). Экспрессия вариантов белка RecAE38K или RecA803 приводит к полной супрессии УФ-чувствительности на *recFOR*-пути. Показано, что вариант белка RecAE38K способен к супрессии чувствительности к УФ на дефектном *recBCD*-пути (Wang, 1993; Handa et al., 2007). В каждом из приведенных случаев основное сходство гиперактивных рекомбиназ – их повышенное сродство к оцДНК, которое придает возможность функционировать в обход механизма классической «загрузки» с помощью вспомогательной системы клетки. Вместе с тем, остается неясно - насколько устойчив во времени приобретенный фенотип. Сохраняется ли искусственная резистентность в ряду генераций при отсутствии облучения? Какова стабильность приобретенных признаков? Как меняется состав ДНК у де-

эволюционирующих линий? Какова роль самого белка RecA в этих процессах?

1.8. RecA из экстремофильной бактерии *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans – одна из самых устойчивых к воздействию ионизирующего излучения бактерий. Система защиты от повреждения ДНК в *Deinococcus radiodurans* значительно отличается от *E. coli*.

Белок RecA *Deinococcus radiodurans* (RecADr) изучается на протяжении почти шестнадцати последних лет как *in vitro*, так и *in vivo*. Ранее было предпринято несколько попыток экспрессировать белок RecADr в штамме *E. coli*, но добиться повышения устойчивости чужеродного штамма к излучению не удалось. За все время была опубликована лишь одна работа, в которой показано, что RecAEc может частично комплементировать устойчивость к УФ излучению в клетках *D. radiodurans* (Schlesinger, 2007). Для того чтобы понять источник функциональных различий между белками RecAEc и RecADr необходимо обратиться к биохимическим исследованиям. Как показали исследования *in vitro*, молекулярный механизм обмена гомологичных цепей ДНК, проводимый белком RecADr, имеет ряд специфических свойств. В отличие от белка RecAEc, белок RecADr обладает высокой афинностью к дцДНК (Kim et al., 2002). Более того, в присутствии белка SSB (как SSBec, так и «родного» DdrB) белок RecADr преимущественно связывается с дцДНК, а не оцДНК (Eggington et al., 2004; Norais et al., 2009). Таким образом, обмен гомологичных цепей ДНК инициируется филаментом, построенным на дцДНК, т.е. трансферная реакция идет как бы в обратном направлении относительно классической модели, характерной для RecAEc (Kim et al., 2002). Схема рекомбинационного процесса получила наименование «обратный перенос нити». Нуклеопротеиновый комплекс RecADr характеризуется рядом важных биофизических отличий от нуклеопротеинового комплекса RecAEc. Продемонстрировано, что динамика филаментации RecADr вдоль ДНК

обладает рядом отличий (Hsu et al., 2011). Важное открытие, которое было получено в 2016 году, высветило потенциальную возможность фосфорилирования треониновых и тирозиновых остатков RecADr в штамме *Deinococcus radiodurans* (Rajpurohit et al., 2016). Показано, что киназа RqkA участвует в модификации аминокислот Y77F и T318A белка RecADr. Фосфорилированные варианты белка имеют ряд отличительных свойств: повышенное сродство к одно- и двуцепочечной ДНК, преимущественное использование кофактора дАТФ относительно АТФ. Белок RecADr представляет собой пример, чуть ли не единственной известной модифицированной прокариотической рекомбиназы. Фосфорилирование белка индуцируется только в ответ на радиационное воздействие. Киназа RqkA предназначена для модификации сразу нескольких белков репарации. Теоретически, наверно было бы возможно воспроизведение фосфорилирования в *E. coli* при условии взаимной коэкспрессии RecADr и RqkA, однако это не было сделано. Интересно, что если комплементацию RecADr теоретически можно произвести в клетках *E. coli*, то видимо скорее, только немодифицированной формы RecADr. Известно, что *in vitro* дАТФ так же может служить кофактором для RecAEc, но *in vivo*, ввиду недостаточной концентрации дАТФ, этого не происходит. Исходя из перечисленных фактов, следует, что молекулярный механизм, благодаря которому RecADr осуществляет процесс рекомбинационной репарации, претерпел такие значительные изменения, которые вряд-ли совместимы с работой любой из регуляторных систем *E. coli*. Вспомогательные системы в *D. radiodurans* претерпели столь значительные изменения, что RecA из *D. radiodurans* без их поддержки не способен компенсировать отсутствие RecA в *E. coli* при экспрессии с плазмидного вектора (Gutman et al., 1994; Minton, 1996; Carroll, Minton, 1996; Cox, Battista, 2005; Zahradka et al., 2006; Slade, 2009;). В *D. radiodurans* обнаружено два паралога *lexA*, но они не участвуют в регуляции экспрессии RecA и их функции остаются неясными (Narumi et al., 2001; Earl et al., 2002). Кроме того, в *D. radiodurans* отсутствует система RecBCD

регуляторов. Вместе с тем, система RecFOR регуляторов, наоборот, присутствует в полной мере (Montague et al., 2009; Satoh et al., 2012). Белок SSB из *D. radiodurans* имеет аналогичную функцию для RecA-зависимого обмена гомологичных цепей ДНК, что и белок SSB из *E. coli*. Более того, оба белка оказались взаимозаменяемы *in vitro* (Eggington et al., 2004). Имеется в *D. radiodurans* так же негативный регулятор RecX. Ранее белок RecX из *D. radiodurans* изучался единственной научной группой, которая продемонстрировала, что белок RecX в бактериях *D. radiodurans* репрессирует радиоустойчивость *in vivo* и подавляет активность белка RecADr *in vitro*. Методом «гель-шифт» выявлена способность RecX из *D. radiodurans* взаимодействовать не только с RecA, но и с ДНК (Sheng et al., 2005; Sheng et al., 2010). Однако остается неясным механизм подавления рекомбинации белком RecXDr, роль его взаимодействия с ДНК в этом процессе, а так же универсальность «кэппинг» модели относительно аналогичной системы из *E. coli*. Вместе с тем, ответить на эти вопросы, можно изучив биохимические свойства обоих белков из *D. radiodurans*, что предлагается к рассмотрению в главе «Результаты».

1.9. Антибактериальные препараты на основе ингибиторов SOS ответа

Основные классы современных антибиотиков направлены на весьма ограниченное число мишеней, представленных в таких ключевых клеточных процессах, как биосинтез белков и компонентов клеточных мембран, репликации и репарации ДНК (Cirz et al., 2005). Известно, что бактериальные клетки адаптируются к действию этих антибиотиков с помощью активации механизма клеточного SOS-ответа и связанного с ним индуцированного мутагенеза и перестройки бактериального генома (Smith, Romesberg, 2007). Другой способ адаптации к антибиотикам – это горизонтальный перенос генов в ходе натуральной трансформации экзогенной ДНК в хромосому. В свою очередь, стратегии преодоления приобретенной резистентности обычно

включают химические модификации ранее известных антибиотиков. Поскольку многие действующие антибиотики проходят уже третий или четвертый цикл модификаций, число вновь разрабатываемых антибиотиков в последние годы постепенно снижается. Известно, что эффективность их использования постепенно ослабляется со временем (McKenzie et al., 2000). Одной из потенциальных возможностей выхода из этой ситуации является поиск новых мишеней в виде критичных для метаболизма бактерии белков. В литературе описано несколько примеров достижения этой цели. Например, недавно выявлены небольшие химические молекулы, «компаунды», которые специфически ингибируют белок SSB (Marceau et al., 2013; Voter et al., 2018). Другим из возможных путей решения проблемы бактериальной адаптации является создание препаратов, направленно блокирующих бактериальный SOS-ответ. Белок RecA функционально участвует в общей резистентности патогенных бактерий к действию антибактериальных препаратов и является индуктором бактериального SOS-ответа, и поэтому является идеальной мишенью для поиска соединений, блокирующих бактериальный SOS-ответ (Nautiyal et al., 2014). Одновременно, в комплексе с белком DprA, белок RecA отвечает за трансформацию экзогенной ДНК в хромосому и, следовательно, передачу резистентности горизонтальным путем от бактерии к бактерии (Le et al., 2017)

В последнее время предпринято множество попыток поиска ингибиторов белка RecA (Peterson et al., 2012). В частности, было найдено несколько химических соединений, которые ингибируют АТФазную активность RecA *in vitro*, например, природный фенол (куркумин) блокирует SOS-ответ, активируемый антибиотиком левофлоксацином (Bellio et al., 2014). Кроме того, в числе таких соединений оказались некоторые аналоги нуклеотидов (Lee et al., 2005), малые органические молекулы на основе 2-амино-4,6-диарилпиридина, 1,2,4-оксадиазол, хиназолинон, бензимидазола и диазепинона (Sexton et al., 2010), полисульфатированные и полисульфанированные нафтил соединения (Wigle, 2007; Nautiyal et al.,

2014). Однако, все эти соединения недостаточно специфичны, и имеют широкую область побочного действия. Они могут блокировать не только бактериальные белки RecA, но и многие человеческие АТФазы, имеющие сходное с RecA строение центра связывания АТФ и, поэтому, токсичны. В отличие от этих соединений, небольшие пептиды, представляющие собой функциональные фрагменты природных ингибиторов, являются одними из лучших кандидатов для блокирования SOS-ответа у бактерий. Такие пептиды содержат только природные аминокислоты, которые весьма специфичны для их мишеней и поэтому не обладают широкой областью побочного действия и нетоксичны для человека (Estieu-Gionnet et al., 2011). Опубликована заявка на патент №US20100292135A1 от 18.11.2010 в бюро по патентам и товарным знакам США. Кроме небольших органических ингибиторов АТФазной активности белков RecA на основе производных АДФ, этот патент также включает перечень пептидов, сконструированных по аналогии с аминокислотной последовательностью центрального субдомена RecA, участвующего в образовании межмолекулярного интерфейса мономеров RecA. Эти пептиды имеют свойство ингибировать активность белков RecA на этапе образования ими спирального филамента на оцДНК. Однако в силу слабой конформационной стабильности, эффективность их действия даже *in vitro* недостаточна $IC_{50}=35-500$ мкМ для практического применения (Cline et al., 2007). Другие сконструированные варианты, где авторам удалось понизить IC_{50} до ~ 3 мкМ, бесполезны с точки зрения практического применения, так как для стабилизации их активной конформации необходимо образования дисульфидных связей, которое в бактериальных клетках, как известно, блокируется присутствием глутатиона. Кроме того, необходимо отметить, что опубликованные значения $IC_{50} \sim 3$ мкМ сильно занижено относительно реального значения, так как авторы в три раза понизили концентрацию белка RecA, по сравнению с его обычной концентрацией для такого рода анализов. Реальные значения IC_{50} для этих пептидов, скорее всего, составляют ~ 9 мкМ. Поскольку все природные

аминокислотные последовательности глобулярных белков в случае их применения в виде мономерных пептидов не обладают достаточной конформационной стабильностью, то они имеют низкую эффективность в качестве ингибиторов тех или иных биохимических реакций. В заявке на патент №US20100292135A1 использовалось несколько классических методик конформационной стабилизации пептидов, таких как: дополнительные солевые мостики, взаимодействие заряженных групп с макродиполем альфа-спирали, использование аминокислот с высокой склонностью к образованию альфа-спиралей и бета-структур, а также так называемых “кэпинг” взаимодействий. Для конформационной стабилизации данных пептидов авторы патента были вынуждены применить искусственные дисульфидные мостики, которые, однако, полностью бесполезны в условиях бактериальных клеток.

Таким образом, поиск мишени для подавления SOS ответа остается актуальной задачей. Новые ингибиторы белка ResA должны обладать не только высокой константой связывания, но и иметь достаточную специфичность. Одним из оригинальных подходов в решении этой задачи может послужить поиск ключевых фрагментов регуляторных белков. Разработка такого модифицированного фрагмента регуляторного белка предлагается в главе «Результаты и обсуждения».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Бактериальные штаммы, используемые в работе, приведены в Таблице 3. Получение плазмиды pRecA1.1, несущей ген *recA_{Ec}* под его собственным промотором, описано в работе Алексева (Alexseyev et al., 1997). Плазмиды pET21b:recAPa и pET21b:recAX53 были сконструированы путем замещения фрагмента NdeI-HindIII на структурную часть гена *recA*. Плазмиды pTRecA230, pTRecA420 и pTRecA430 с клонированными мутантными генами *recA_{Ec}* были предоставлены К.Л. Найтом. Каждая плазмида несет одну или две аминокислотные замены в области RecA-RecA взаимодействий ([K6A], [K6D], [R28A], [R28D], [R28N], [T89V], [T89A], [D112R], [N113R], [N113A], [D139A], [D139K], [F217Y], [K6D/D139K], [R28N/N113R], [R28D/D112R]). Экспрессия *recA* регулируется промотором *tac*. Плазмиды идентичны за исключением положения уникальных сайтов рестрикции в пределах гена *recA* (Eldin et al., 2000). Плазмида p*recX_{Ec}* (pEAW224) любезно предоставлена проф. М.Кокс (Университет Висконсин_Мэдисон, США). Гены *recX_{Ec}* и *recX_{Ng}* были переклонированы в плазмиды pT420 и pD112R совместно к находящимся там вариантам гена *recA*. Таким образом, полученная плазмида pEAW958 соответствует гену *recX_{Ng}* находящемуся под araBAD промотором в pD112R; pEAW959 соответствует *recX_{Ng}* под araBAD промотором в pT420(wt); pEAW858 соответствует *recX_{Ec}* под araBAD promoter в pD112R, а pEAW847 соответствует *recX_{Ec}* под araBAD промотором в pT420(wt). Для экспрессии с хромосомы использовали штамм MG1655, где RecA D112R экспрессировался с нормального локуса гена *recA* в EAW166. Штам AB1157 с делецией по *recX* получен от М.Сох, Университет Висконсин-Мэдисон, США. В работе так же использовали плазмиду p*recX_{Dr}* с маркером устойчивости к ампициллину Ap^r, несущую нормальную аллель гена *recX* *D. radiodurans*.

В работе использованы плазмиды *precXEc* и *pReptid*, несущие нормальные аллели генов *recX* из *E. coli* и пептидов с оптимизированной последовательностью. Для индукции экспрессии гена *recX* с промотора гена *lac* проводили инкубацию с изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (IPTG) при концентрации 0,07-1 мМ в течение 2 ч перед облучением. Для индукции использовали двухплазмидную систему, включающую плазмиду pT7, которая несет ген T7 РНК полимеразы. Ген, несущий аминокислотную последовательность пептида был синтезирован и клонирован в плазмиду pET21b в фирме “Евроген”.

2.12. Среды

Для выращивания бактерий и конъюгации использовали минимальную среду 56/2 (Adelberg and Burns, 1960). Чтобы исключить элиминирование плазмиды или ее производных, в среду добавляли ампициллин (50 мкг/мл). При выделении белков клетки выращивали в аминокептиде (АП) или в среде LB (Sambrook et al., 1989). В случае присутствия плазмиды pLysS в штамме BL21(DE3), в среду добавляли хлорамфеникол до концентрации 30 мкг/мл.

2.13. Ферменты и реактивы

АТФ, дАТФ, глицерин, NaCl, ацетат натрия, ампициллин, хлорамфеникол, Трис, Triton X100, Brij-58, MgCl₂, EDTA, SDS, полиэтиленимин Р, лактатдегидрогеназа (LD), пируваткиназа (PK), DTT, IPTG, поли(dT)₃₆₀₀ были получены из фирмы Sigma-Aldrich (США). Хроматографический носитель фосфоцеллюлоза P11 приобретали в фирме Whatman (Япония), аминоацил-целлюлозу – в компании Reanal (США). Белки SSB, F'SSB, PsiB, RecA E38K, RecA Δ C17, RecA K72R и RecX любезно предоставлены М. Сох (Университет Висконсин-Мэдисон, США). Концентрации белков определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции $\epsilon_{280} = 2.38 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для белка SSB; $\epsilon_{280} = 2.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для всех белков RecAEc и $2.57 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

для белка RecX. Концентрацию белка RecAD.rad определяли по поглощению при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции $1.41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Пептиды полученные твердо-фазным синтезом приобретены в Peptide 2.0 Inc. (USA). Концентрацию пептидов 4E1 и Pep2 определяли по поглощению при 280 нм с использованием коэффициентов экстинкции $0.384 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $0.128 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (The UniProt consortium, 2015).

2.14. Манипуляции с ДНК

Выделение, очистку и другие манипуляции с ДНК плазмид проводили стандартными методами (Sambrook et al., 2006). Секвенирование ДНК и сравнительный анализ бактериальных геномов для выявления генетических изменений был выполнен в Comparative Genome Sequencing Service, который был предоставлен NimbleGen Systems, Inc.

2.2. Рекомбинационный тест

Эффективность рекомбинации определяли по выходу рекомбинантов после конъюгации в течение 60 минут при температуре 37°C донора Hfr с реципиентом JC10289 $\Delta recA$. Мутантные гены *recA* *E. coli*, *P. aeruginosa*, а также ген дикого типа вводили в реципиент на плаزمидах pTRecA230, pTRecA420 и pTRecA430. Выход рекомбинантов Thr^+Str^r или Ara^+Str^r нормировали на количество донорных клеток в конъюгации.

Таблица 3. Бактериальные штаммы

Штамм	Маркеры	Источник получения
DH5 α	F^- ($\phi 80d\Delta(lacZ)M15$) <i>recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44 relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169	Clark A.J.
JC10289	<i>trh1, leu6, thi1, lacY1,</i> <i>galK2, ara14, xyl5, mtl1,</i> <i>proA2, his4, argE3, rpsL,</i> <i>tsx33, sup37 $\Delta recA306$</i>	Clark A.J.
GY7109	F^- ($\lambda_{Clind}^- sfiA::lacZ$) <i>srl::Tn10</i> $\Delta recA$	Devoret R.
KL227	<i>Hfr P4x Str^s</i>	Low K.B.
BL21(DE3)	F^- <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁺) dcm</i> <i>gal (DE3) $\Delta recA306$</i>	Novogene, США

Показана часть генотипа, существенная для данных исследований.

2.21. Определение частоты рекомбинационных обменов.

Частота рекомбинационных обменов ДНК приходящаяся на единицу длины хромосомы может быть выражена через среднестатистическое расстояние между двумя соседними рекомбинационными обменами - параметр λ , который вычисляется по модифицированной формуле Холдейна $\mu = 0.5[1+\exp(2l/\lambda)]$, где μ - сцепленность между селектируемым и неселектируемым маркерами, а l - физическое расстояние между маркерами, выраженное в минутах карты или числе нуклеотидов (Бреслер и Ланцов, 1978). Сцепленность между селектируемыми (*thr*⁺ или *ara*⁺) и неселектируемым (*leu*⁺) маркерами определяли методом перепечаток, анализируя число клонов, имеющих соответственно генотип *Thr*⁺*Leu*⁺ или *Ara*⁺*Leu*⁺ среди клонов *Thr*⁺ или *Ara*⁺, полученных в результате постконъюгационной рекомбинации (Lanzov et al., 1991).

Штамм JC10289: F⁻ Δ *recA306 ara14 leuB6 Str*^r, трансформированный плазмидами, кодирующими мутантные белки RecA^{Ec}, скрещивали с донором KL227 *Str*^s, передающим последовательно маркеры *leu*⁺, *ara*⁺ и *thr*⁺. Для описания генетической структуры рекомбинантов и интенсивности рекомбинации были проведены измерения частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) на единицу длины ДНК. Величину ЧРО измеряли, определяя сцепленность между селектируемым и неселектируемым маркерами, где в роли селектируемого маркера выступали маркеры *thr*⁺ или *ara*⁺, а неселектируемым маркером был *leu*⁺. В том случае, когда сцепленность между маркерами *thr*⁺ и *leu*⁺ не превышала 0.5 единиц, в качестве селектируемого маркера использовался маркер *ara*⁺, находящийся на ближайшем 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 (Haldane, 1919; Бреслер и Ланцов,

1978): $\mu = 0.5[1 + \exp(2l/\lambda)]$. Для RecA_{Ec} 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 RecA_{Ec} была принята за 1.

2.22 SOS-хромотест

SOS-хромотест проводился согласно методу, описанному 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.

Активность белка рассчитывали в условных единицах в соответствии со стандартными рекомендациями (Miller, 1972) с использованием формулы $\beta\text{-gal} = 1000(OD_{420} / OD_{600}tv)$, где OD_{420} - оптическая плотность реакционной смеси при 420 нм, OD_{600} - оптическая плотность клеточной суспензии в Z-буфере при длине волны 600 нм, t - время инкубации, а v - объем пробы в миллилитрах. Штамм GY6871 *sfiA::lacZ* был любезно предоставлен проф. Р. Деворе (Laboratoire d'Enzymologie, CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Из ночной культуры, выращенной в LB с ампициллином 100мкГ/мл и канамицином 40 мкГ/мл или без них (для контрольного штамма), 100 мкл вносили в 4мл такой же среды. Выращивали 50-60 минут и добавляли IPTG до конечной

концентрации 1мМ и проводили индукцию в течение 90 минут. Затем пробы делили пополам и к одной из них добавляли налидиксовую кислоту до конечной концентрации 40мкГ/мл. Культуру индуцировали 60 минут, смешивали 1 мл клеток с 1 мл Z-буфера и измеряли OD₆₀₀. Z-буфер (рН 7.0) На 1 л: Na₂HPO₄ x 7H₂O 16.1 г NaH₂PO₄ x H₂O 5.5 г KCl 0.75 г MgSO₄ x 7H₂O 0.246 г β-меркаптоэтанол 2.7 мл. В каждую пробирку добавляли 4 капли хлороформа и 2 капли 0.1% раствора додецилсульфата натрия. Затем пробирки интенсивно встряхивали в течение 15 секунд. Реакцию инициировали, добавив в каждую пробирку по 0.4 мл ОНФГ (4мг/мл). ОНФГ – орто-нитрофенил-β-D-галактозид и тщательно перемешивали. Время реакции измерялось секундомером. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 1 М Na₂CO₃ (рН 12). Клеточные фрагменты удаляли центрифугированием 10 мин 5000 об/мин. Измеряли OD₄₂₀ (желтая окраска) и рассчитывали активность β-галактозидазы в условных единицах по выше приведенной формуле.

2.23. Изменение выживаемости клеток в зависимости от дозы УФ-излучения.

Клетки *E. coli*, несущие плазмиды с геном *recX* и аминокислотной последовательности пептида, выращивали в среде LB до OD₆₀₀, равной 0.4–0.6, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.3 мМ и растили в течение еще 1.5 ч для индукции синтеза белка *RecX* либо пептида. Контрольные клетки *E. coli* также выращивали в среде LB. Клетки, после достижения OD₆₀₀, равной 0.7–0.9, осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в исходном объеме солевой среды (NaCl 0.9%). УФ-облучение (λ=254) проводили в чашках Петри на приборе “Хроматоскоп” при мощности дозы 100 мДж/м²/с, отбирая аликвоты культуры объемом 0.1 мл через равные временные интервалы (30 с). Облученные клетки разбавляли солевой средой, рассевали на LB-агар и через 24 ч подсчитывали число колоний. УФ облучение клеток, их разведение, рассев и выращивание

проводили при освещении красным светом для предотвращения фотореактивации.

2.3. Подготовка ДНК для исследования рекомбиназных активностей

Кольцевую M13mp18 оцДНК и суперскрученную M13mp18 дцДНК выделяли с помощью очистки в градиенте хлористого цезия. Компетентные клетки штамма JM101 инфицировали фагом. Зараженную ночную культуру клеток отделяли от капсидов с однонитевым фагом с помощью центрифугирования. Осаждение капсидов с однонитевой ДНК осуществляли в растворе содержащем 250 мМ NaCl и 500 мМ полиэтиленгликоль. Свежие клетки штамма JM101 трансфецировали фагом в логарифмической фазе роста и инкубировали в течение 3 часов при 37°C. ДНК, содержащую двунитевого фага, выделяли с помощью колонок фирмы Quagen либо Fermentas. Выделенную ДНК смешивали с раствором этидиума бромидом (10 мг/мл) и с раствором хлористого цезия (1,6 г/мл). Солевой градиент формировали при центрифугировании ДНК на протяжении 8 часов при скорости 55 тысяч оборотов в минуту. Образовавшиеся слои окрашенной ДНК отбирали шприцем. Экстрагировали ДНК с помощью раствора TE, насыщенного бутанолом. Осаждение суперскрученной ДНК фага проводили в присутствии этанола и калия ацетата. Капсид однонитевого фага обрабатывали протеиназой K (200мг/мл) и SDS (0,9%). Экстрагирование одноцепочечной ДНК фага проводили с помощью фенола и хлороформа. Линейную дцДНК получили путем рестрикции суперскрученной M13mp18 дцДНК эндонуклеазой *EcoRI* с последующей депротеинизацией хлороформом и пересажением в 0.3 М ацетате натрия и 95% этаноле по стандартной методике (Sambrook et al., 2006). Процесс получения оцДНК, модифицированной хлороацетоальдегидом, описан ранее в работе Алексева (Alexseyev et al., 1997). Молярные концентрации ДНК, выраженные в нуклеотидах, определяли спектрофотометрически, используя коэффициент

экстинкции для оцДНК $\varepsilon_{260} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а для дцДНК $\varepsilon_{260} = 8780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Линейную оцДНК поли(дТ) приобрели в компании Sigma (USA). Нуклеотидные молярные концентрации поли(дТ) и этеноДНК определяли спектрофотометрически с помощью коэффициента экстинкции $\varepsilon_{260} = 8540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ соответственно.

2.4. Трансформация компетентных клеток плазмидной ДНК

Компетентные клетки на основе штаммов JC10289 и BL21(DE3) готовили по методике, описанной ранее (Sambrook et al., 1989). На 200 мкл компетентных клеток добавляли по 50 нг плазмидной ДНК. Смесь компетентных клеток с плазмидной ДНК инкубировали во льду в течение 1 часа, затем быстро переносили на 90 секунд в водяную баню с температурой 42°C (тепловой шок). Для остановки теплового шока пробы переносились в лед, и после добавления 800 мкл аминокептида, инкубировались 40 мин при 37°C. После инкубации в термостате клетки рассеивались на чашки с селективной средой.

2.5. Метод иммуноблоттинга

Определение количества белка RecA в клетках *E. coli*, выращенных до средней логарифмической фазы роста при 37°C, проводили методом иммуноблоттинга (Sambrook et al., 1989) с использованием поликлональных антител к белкам RecA_{Ec}. Клетки (4×10^7) осаждали центрифугированием, лизировали кипячением с додецилсульфатом Na, наносили на 12% полиакриламидный гель с додецилсульфатом Na и проводили электрофорез с последующим иммуноблоттингом. По окончании электрофореза гель опускали в буфер для переноса (48 mM Трис, 39 mM глицин, 0.037% SDS, 20% метанол) и сразу переносили на PVDF мембрану, используя аппарат для полусухого переноса (Bio-Rad) и следуя рекомендациям производителя. PVDF мембрану (Immobilon-P, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), нарезанную под размер геля (85x85 мм), увлажняли помещением в метанол (10 сек) и уравнивали в

буфере для переноса (5 мин). Немного большего размера кусок толстой бумаги для переноса также увлажняли в буфере для переноса и помещали на анодную пластину аппарата для полусухого переноса. Далее сверху по очереди помещали мембрану, гель и опять бумагу, обращая особое внимание на то, чтобы образованный сандвич бумага/гель/мембрана/бумага не имел внутри пузырьков воздуха, которые полностью исключают перенос белка в том месте, где они находятся. Это удобно делать, прокатывая сандвич специальным валиком или же просто достаточно большой пробиркой. Осторожно накрывали катодной пластиной и проводили перенос в течение 30 мин при 18V.

Первичные антитела визуализировали с помощью вторичных антител, сцепленных с пероксидазой хрена. Затем производили окрашивание диаминобензидином и определяли количество белка в каждой пробе с помощью сканера Aсер.

2.6. Подготовка хроматографических носителей к выделению белков

Фосфоцеллюлоза P-11:

3 г сухого порошка фосфоцеллюлозы P-11 преформировали в 50 мл воды в течение часа. Затем носитель помещали в 0,3 N NaOH и перемешивали 15 минут. После этого носитель отмывали в воронке Бюхнера водой до pH 8 и помещали на 15 мин в 0,5 M HCl. Затем опять промывали водой до нейтрального pH, после чего носитель промывали буфером (20 mM К-фосфата, pH 6,8; 0,1 mM EDTA), содержащего 200 mM NaCl. Хроматографическую колонку набивали носителем и промывали тем же буфером (Sambrook et al., 1989).

ОнДНК-целлюлоза:

ОнДНК-целлюлозу готовили по модифицированному методу Литмана (Остерман, 1986). 0.5 г высокомолекулярной ДНК из сперматоцита лосося (Sigma) разводили в 100 мл воды и обрабатывали ультразвуком до потери раствором вязкости (около 1 минуты). Раствор ДНК денатурировали

кипячением в течение 30 минут в растворе 10 мМ NaCl и 1 мМ EDTA и быстро охлаждали. Сухую микрокристаллическую целлюлозу декантировали в воде 3-5 раз, промывали 0.5 М NaOH на воронке Бюхнера, отмывали водой до нейтрального pH, промывали 96% этанолом и высушивали. В раствор денатурированной ДНК на льду медленно вносили порошок высушенной целлюлозы (из расчета 1 г на 3 мл раствора ДНК) и оставляли на 1 час при постоянном перемешивании. Суспензию перемешивали до образования густой пасты и высушивали при комнатной температуре. Для формирования ковалентных связей между ДНК и целлюлозой, высушенный порошок ДНК с целлюлозой ресуспендировали в 96% этаноле (10 мл на 1 г целлюлозы с ДНК) и облучали ультрафиолетом с расстояния 10 см от поверхности суспензии при постоянном перемешивании в течение 12-18 часов. Носитель ресуспендировали в растворе 1.5 М NaCl и 10 мМ EDTA, инкубировали в течение 12 часов при +2 °С, промывали водой в воронке Бюхнера, ресуспендировали в 96% этаноле и полностью высушивали при комнатной температуре.

Перед набивкой в хроматографическую колонку, сухую онДНК-целлюлозу отмачивали несколько раз буфером (20 мМ К-фосфата, pH 6.8, 0.1 мМ EDTA). В колонке носитель промывали буфером (20 мМ К-фосфата, pH 6.8; 10% глицерина; 1 мМ DTT; 0.1 мМ EDTA).

2.61. Выделение и очистка белков

Все рекомбиназы экспрессировали по одной схеме, поскольку гены *recAEc*, *recAPa*, *recAX53*, *recADr*, *recXEc*, *RecXDr* и *recAD112R* были клонированы в вектор pET-21b одной экспрессионной системы.

Экспрессия белка:

Компетентные клетки BL21 (DE3) pLysS, трансформированные по стандартной методике (Sambrook et al., 1989) сконструированным вектором pET-21b-*recAD112R*, наращивали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (34 мкг/мл), до оптической

плотности (ОП) ≈ 0.7 оптических единиц (ОЕ) при длине волны 600 нм. Экспрессию белка индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0.7 мМ. Затем культуру клеток инкубировали при тех же условиях в течение трех часов, после чего клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в буфере (50 мМ трис-НСl, рН 7.6; 25% сахараза) и замораживали в жидком азоте с последующим хранением при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выделение и очистка белка:

Процедуры выделения и очистки белков RecA выполняли при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ по методике (Cox et al., 1981) с незначительными изменениями.

Лизис клеток:

Клетки (около 15г) размораживали и ресуспендировали в 2.25 мл лизирующего раствора (250 мМ Tris-НСl; рН 7.5; 1.5 мг лизоцима) до гомогенного состояния с последующим инкубированием в течение часа при периодическом интенсивном перемешивании. Затем последовательно добавляли 1.55 мл 25 мМ EDTA и 7.5 мл раствора (50 мМ Tris-НСl; рН 7.5; 2 мМ DTT; 1% Brij-58) и перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 минут. Полученную суспензию клеток обрабатывали ультразвуком и осаждали центрифугированием при 9000-12000 об./мин. на роторе Beckman JA-13 1 час при $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1 этап очистки белка RecA: полимин Р:

Для выделения фракции, содержащий белок RecA, к надосадочной жидкости добавляли полимин Р до конечной концентрации 0.5% и перемешивали полчаса. К осадку, сформировавшемуся в результате получасового центрифугирования при 9000-12000 об./мин., добавляли раствор 150 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и опять центрифугировали при тех же условиях для освобождения от примесей и белков, не связывающихся с ДНК. Далее белок RecA экстрагировали из осадка 300 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. В случае с белком RecADr, промывка проводилась 50 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, а экстракция из осадка 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2 этап очистки белка RecA: ионообменная хроматография:

После осаждения белка RecA 0.3 М сульфатом аммония, осадок белка диализовали против буфера фосфатного буфера (20 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.8); 1 мМ DTT; 1 мМ EDTA; 1 мМ PMSF; 10% глицерин; 200 мМ NaCl) в течение 12 часов. Для очистки белка от полимина Р осуществляли ионообменную хроматографию: диализованный раствор белка пропускали через колонку с фосфоцеллюлозой P11. Элюированные фракции белка осаждали 0.3 М сульфатом аммония.

3 этап: аффинная хроматография:

Диализованную против калий-фосфатного буфера (20 мМ К-фосфата, pH 6.8; 10% глицерина; 1 мМ DTT; 0.1 мМ EDTA) фракцию белка наносили на подготовленную колонку с онДНК целлюлозой. Специфичное элюирование белка с колонки проводили 2 мМ АТФ в калий-фосфатном буфере с 50 мМ NaCl. К фракциям, содержащим значительное количество белка, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 0.3 г/мл для осаждения белка. Очистку белка от остатков АТФ осуществляли трехкратным переосаждением в 0.3 М сульфата аммония. Препарат белка хранили при +2 - +4 °С. Очистка белка RecADr на 3 этапе включала ионообменную хроматографию на гидроксиапатите. Белок диализовался и наносился на колонку с гидроксиапатитом в 350 мМ фосфата калия, а элюировался при концентрации 500 мМ фосфата калия. Осаждение белка RecADr проводят при концентрации 0.38 г/мл сульфата аммония.

Выделение и очистка белка RecX:

Экспрессия, лизис клеток и очистка с помощью полимина проводилась точно так же как в случае с белками RecA. Далее белок RecX наносился на колонку с гидроксиапатитом и смывался в градиенте фосфата калия 220 – 700 мМ. Пик билка собирали на 270 мМ фосфата калия и осаждали при концентрации 0.36 г/мл сульфата аммония. Переосаждение белка RecXDr проводили с добавлением сульфата аммония до концентрации 0.25 грамм на миллилитр. При его очистке на поздних этапах использовали характерное

свойство белка – нерастворимость в растворе при концентрации аммония сульфата ниже 0.3 М.

Подготовка белка RecA к биохимическим исследованиям:

Перед серией экспериментов осажденную фракцию белка RecA диализовали против буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl; pH 7.5; 1 mM DTT; 50% глицерина и 100 mM KCl.

Измерение концентрации белков RecA:

Концентрацию белков RecA определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976), используя в качестве стандарта белок BSA, а также с помощью калибровочной кривой, полученной для белка RecAEc, концентрацию которого определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента экстинкции $2.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при длине волны 280 нм (Craig et al., 1981). Степень очистки белков RecAEc оценивали по результатам электрофореза в ДСН ПААГ (10%) после окраски красителем Кумасси согласно процедуре Лаэммли (Laemmly, 1970). Препараты выделенных белков RecA были чистыми приблизительно на 95%.

Для проверки присутствия в выделенных фракциях белка экзо- и эндонуклеаз, проводился тест по методике, разработанной в лаборатории М. Кокса (Университет Висконсин-Мэдисон, США) либо по методике принятой в ОМРБ ПИЯФ (Shevelev et al., 1996). В реакционную смесь, содержащую 25 mM трис-HCl (pH 7.5) и 10 mM MgCl_2 , добавляли кольцевую онДНК, кольцевую днДНК, линейную днДНК и 7 мкМ исследуемого белка RecA. В качестве контроля использовалась та же смесь, не содержащая белок RecA. Реакция проводилась в течение 180 минут при 37°C и останавливалась 5 mM EDTA, 0.5% SDS и 0.1 мг мл⁻¹ протеиназы К. Молекулы ДНК разделялись в 1% агарозном геле и окрашивались раствором 0.5 мкг мл⁻¹ бромистого этидия. Отсутствие видимых изменений в ДНК субстратах после инкубирования с белками RecA свидетельствовало об отсутствии в полученных препаратах белков эндо- и экзонуклеазной активности.

2.7. Реакции, катализируемые белками RecA

1. 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 $\epsilon_{380} = 1.21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Реакции проводили при 37 °C в 90 мкл буфера ТМД (25мМ Трис-НСl, рН7.5; MgCl_2 (от 1 до 10 мМ, точная концентрация указана в конкретных экспериментах); 0.1 мМ DTT), содержащего 1 мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему (3 мМ фосфоенолпирувата, 30 единиц/мл пируват киназы, 4.5 мМ NADH и 30 единиц/мл L-лактат дегидрогеназы), а также ДНК, определенный белок RecA и/или белки SSB, F'SSB, RecX, PsiB в концентрации, указанной в конкретных экспериментах. Скорость гидролиза АТФ регистрировали в кюветах толщиной 1 см с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 либо Varian Cary 300 либо Cary 5000.

2. Синаптная реакция обмена гомологичными нитями ДНК *in vitro* с использованием метода FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer):

Линейный двунитевой олигонуклеотид длиной 34 п.о. был мечен по противоположным концам нитей флуоресцеином и дабсиллом. Последовательность олигонуклеотида была FAM-TCACCAATGAAACCATCGATAGCAGCACCGTAAT и ATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGA-Dabsyl.

Олигонуклеотид реагировал с линейной немеченой онДНК длиной 102 нуклеотида с последовательностью, эквивалентной трем повторам на меченой дабсиллом цепи двуцепочечного олигонуклеотида. Реакция проводилась при 27 °C в кювете объемом 0.3 мл. Реакционная смесь содержала 25 мМ Tris HCl (рН 7.5), указанную концентрацию MgCl_2 , 3 мкМ

однонитевого олигонуклеотида, 1.2 мкМ белка RecA, 0.3 мкМ SSB, 0.7 мМ АТФ γ S и 1.5 мкМ меченого двунитевого олигонуклеотида. Филаменты белка RecA формировались на оцДНК в течение 5 минут в присутствии АТФ γ S и белка SSB. Реакция инициировалась добавлением меченой дцДНК. В ходе RecA-зависимого переноса одной из нитей дцДНК на оцДНК, содержащуюся внутри филамента, происходило пространственное разделение флуоресцеина и дабсила и, как следствие, увеличение флуоресцентного сигнала. Интенсивность флуоресценции определялась с помощью флуориметра Hitachi F-4000.

3. Реакция переноса нити:

Реакции переноса нити проводили и визуализировали в агарозном геле согласно методике, предложенной Коксом (Cox et al., 1981). Реакционная смесь содержала 25 мМ трис-HCl (pH 7.5), 10 или 4 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, а также указанные под рисунком количества белков RecA и SSB, кольцевой оцДНК фага M13mp18 (плюс-нить) и линейной формы дцДНК того же фага. Эксперимент проводился при температуре 37°C. Белок RecAEc или RecAD112R предварительно прогревали с оцДНК в течение 3 минут, после чего для расплавления вторичных структур в реакционную смесь добавляли белок SSB и инкубировали еще 2 минуты. В указанные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты, и реакции останавливали добавлением 5 мМ EDTA, 0.5% SDS, 0.1 мг мл⁻¹ протеиназы K с последующим инкубированием в течение 30 минут при 37°C. Затем проводили электрофорез в 0.8%-ом агарозном геле, с последующим окрашиванием раствором 0.5 мкг мл⁻¹ бромистого этидия. Положение ДНК в геле анализировали с помощью системы Kodak DC120 и программного обеспечения KDSID 2.0 (Amersham).

4. Исследование взаимодействия RecA с ДНК с помощью этеноДНК:

Ассоциацию и диссоциацию RecA от этеноДНК характеризовали по изменению флуоресценции. Процесс получения оцДНК, модифицированной

хлороацетоальдегидом, описан ранее в работе Алексеева (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). Реакционная смесь содержала 25 mM трис-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 2 mM АТФ, а так же АТФ-регенерирующую систему. Реакцию связывания с этеноДНК инициировали при 37°C 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 указанных количеств хлорида натрия.

5. Исследование взаимодействия ДНК с RecA с помощью одномолекулярного метода (*D. radiodurans*):

При проведении исследования взаимодействия ДНК с DrRecA в микрофлюидную камеру подавали следующие растворы:

- 1 канал: раствор, содержащий 50 фМ полистироловых микросфер диаметром 2,1 мкм, покрытых стрептавидином;
- 2 канал: раствор, содержащий 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;
- 3 канал: буферный раствор;
- 4 канал: раствор, содержащий 1 мкМ RecA и 1 mM АТФ γ S.

Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM MgCl₂, глицерин 10%. В первых трех каналах осуществляли прикрепление молекулы ДНК к двум микросферам. Затем в третьем канале ДНК растягивали с силой 40 pN и переносили в четвертый канал, где при постоянной силе растяжения ДНК наблюдалось увеличение ее длины при взаимодействии с RecA. Негидролизуемый аналог АТФ АТФ γ S использовали с целью предотвращения диссоциации RecA от ДНК. Для выполнения прямого сравнения свойств RecADr и RecAEc были проведены идентичные опыты с использованием данных белков.

Для характеристики механических свойств филаментов RecADr и их

сравнения с ResAЕс после окончания полимеризации ResA были получены зависимости длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения. Полимеризация ResA на ДНК считалась завершённой, если длина ДНК достигала максимального значения, и в течение нескольких минут не наблюдалось каких-либо детектируемых изменений длины ДНК. После этого подачу жидкостей в микрофлюидную камеру останавливали, и измерение зависимости длины филаментов от силы растяжения проводили после полной остановки потока жидкости внутри камеры.

Нуклеопротеиновые комплексы растягивали с помощью увеличения расстояния между микросферами. При этом одновременно регистрировалось дистанция между микросферами и сила натяжения ДНК, определяемая по смещению микросферы из центра стационарной ловушки. Полученные зависимости аппроксимировали при помощи модели описания полимерных цепей Worm-like chain (WLC), в рамках которой основными параметрами полимера являются контурная длина и персистентная длина (мера гибкости полимера). Для получения данных о механических параметрах ДНК и нуклеопротеиновых комплексов использовали модель WLC, скорректированную для проведения экспериментов по растяжению одиночных молекул ДНК:

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right],$$

где F – сила растяжения, L_p – персистентная длина, z – измеренная длина ДНК, L_0 – контурная длина ДНК.

2.8. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью метода наименьших квадратов, используя коэффициент Стьюдента для заданной надежности $\alpha=0,90$ (Кассандрова и Лебедев, 1970).

Результаты и обсуждение

3.1. Конъюгационная гиперрекомбинация

Некоторые бактериальные рекомбиназы при экспрессии в *Escherichia coli* способны частично комплементировать при отсутствии белка RecAЕс 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 4 представлены значения ЧРО для химерного белка RecAX53 (Рис.7), который характеризуется наибольшей рекомбиногенностью относительно, как других химерных рекомбиназ, полученных от комбинаций RecAЕс и RecAPa, так и исходных белков RecA. Кроме того, выявлено значение С-конца на рекомбиногенность RecAЕс и RecAPa. Известно, что С-концевой субдомен белка RecAЕс имеет значение для активности рекомбиназы в биохимических опытах. В отсутствие С-конца белок RecAЕс 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

Таблица 4. RecA-зависимая рекомбиногенность

<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

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 RecA 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 4, в случаях с различными рекомбиназами, обнаруживается разнонаправленный эффект. Рекомбиногенность природных

рекомбиназ RecAЕс и RecAPa закономерно стимулируется мутацией *mutS215*. Наблюдается падение рекомбиногенности в единственном случае, когда *mutS215* сочетается с экспрессией RecAX53. По данным Радмана, существуют два механизма подавления гомологической рекомбинации Mut белками в ходе репарации повреждений. Основной механизм действует путем подавления едва начавшейся рекомбинации, запрещая миграцию ветвления, с последующим выбрасыванием внедрившейся в гетеродуплекс чужеродной ДНК с помощью хеликазы MutU. Второй механизм зависит от белка MutH. Процесс распознавания во всех случаях связан с метилированием правильной цепи ДНК (Deschavanne, Radman, 1991; Matic et al., 1995). Однако в случае с конъюгационной рекомбинацией неометилирована может быть как нить донорной ДНК, так и нить реципиентной ДНК. Тогда коррекция любой из нитей равновероятна. Обычно конъюгационная рекомбинация сводится преимущественно к кроссинговеру или говоря иначе к образованию рекомбинантов кроссоверной конфигурации фланговых маркеров. Выбор пути, по которому пойдет рекомбинация, регулируется на уровне разрешения рекомбинационного интермедиата. Однако если рекомбинация сводится к некроссоверному типу, то ее результат невелируется коррекционными системами. Потенциальным источником рекомбинантов некроссоверного (конверсионного) типа являются бреши, которые возникают за счет застроек коротких одностранных участков ДНК. Впервые эти идеи были развиты в работах Кроми и Лича и в настоящее время они общепризнанны (Cromie, Leach, 2000). Таким образом, RecAX53-зависимую рекомбиногенность, чье падение регистрируется на фоне *mutS215*, можно бы связать с конверсионным механизмом. Эта гипотеза подразумевает, что в отличие от исходных или «родительских» вариантов RecAЕс и RecAPa, химерная рекомбиназа предпочтительно продуцирует короткие одностранные застройки. Если так, то снятие ограничений на миграцию ветви ДНК, в виде мутации *mutS215*, не должно стимулировать рекомбиногенность. Однако данный вывод требует подтверждений в виде

биохимического исследования белка RecAX53, которое будет представлено ниже.

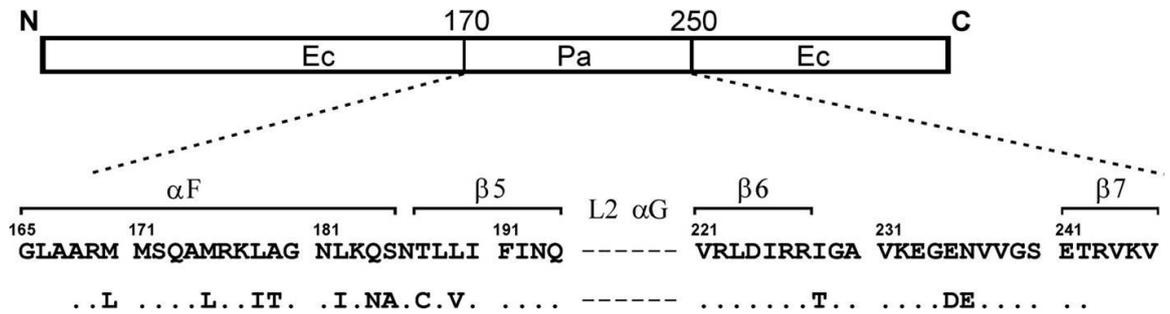


Рисунок 7. Схема химерной рекомбиназы RecAX53, образованной из рекомбиназ RecAPa и RecAEc.

Считается, что конъюгационная рекомбинация главным образом инициируется благодаря RecBCD энзиматической системе. Однако после обрыва рекомбинирующей нити ДНК образовавшийся конец у донорной ДНК может стать сигналом для инициации новых событий. Анализ того, какие другие важнейшие белки SOS системы могут контролировать дополнительные рекомбинационные обмены нитей ДНК, приведен в таблице 5. Полная дерепрессия SOS регулона путем инактивации *lexA* гена в ходе конъюгации приводит к увеличению ЧРО в 4 раза (Lanzov et al., 2003). Это значение само по себе малоинформативно, поскольку многие экспрессированные белки могут обладать разнонаправленным действием на рекомбиногенность. Для оценки функционального значения, в работе задействовали штаммы с делецией по одному из каждого исследуемых генов. Делеция любого из генов RecFOR пути рекомбинации понижает ЧРО в два раза (таблица 5). Данный результат доказывает, что белки RecFOR действительно активно участвуют в рекомбинационном процессе на RecBCD пути. Интересно, что мутация *mutS215* так же как у дикого типа поднимает уровень ЧРО у мутантов *recO*, *recF*, *recR* примерно в 6 раз. Согласно принятой модели, mismatch репарационной энзиматической системой должна подавляться лишь миграция ветви ДНК. При этом

Таблица 5. Влияние регуляторных генов на ЧРО

<i>rec</i> или <i>mut</i> генотип реципиента ^a	Выход Thr ⁺ Str ^r рекомбинантов (% к донору)	Сцепленность(μ) между <i>thr</i> ⁺ и <i>leu</i> ⁺	ЧРО	ΔЧРО
<i>rec</i> ⁺ <i>mut</i> ⁺	5.4±0.5	0.935±0.020(600)	5.0±0.1	1
<i>mutS215::Tn10</i>	3.2±0.3	0.682±0.033(600)	29.4±0.3	6.0
<i>recF349Δ</i>	4.6±0.4	0.959±0.021(500)	2.6±0.1	0.5
<i>recF349Δ mutS215</i>	3.7±0.3	0.778±0.063(1200)	17.2±0.2	3.4
<i>recO1504::Tn5</i>	4.9±0.4	0.948±0.054(1200)	3.2±0.2	0.6
<i>recO1504::Tn5 mutS215</i>	3.7±0.4	0.770 ±0.068(700)	18.2±0.3	3.6
<i>recR252::Tn10-9</i>	4.5±0.5	0.950±0.056 (1100)	3.1±0.4	0.6
<i>recR252::Tn10-9 mutS215</i>	2.5±0.3	0.839±0.072(900)	11.5±0.2	2.3
<i>ΔrecX</i>		0.912±0.084 (1300)	5.7±0.5	1.1
<i>ΔdinI::Km</i>		0.872±0.091(1200)	8.7±1.0	1.7
<i>rec</i> ⁺ / pT7		0.923±0.062 (600)	4.9±0.3	1.0
<i>rec</i> ⁺ / pT7/ <i>precX</i> ⁺⁺		0.940±0.084 (600)	3.8±0.3	0.76
<i>rec</i> ⁺ / pT7/ <i>pdinI</i> ⁺⁺		0.989±0.032(1500)	0.65±0.1	0.13

межбелковые взаимодействия между mismatch репарационной системой и нуклеопротеиновым филаментом отсутствуют. Таким образом, поскольку взаимодействие осуществляется на уровне уже продукта рекомбинации, то отсутствие аддитивных эффектов вполне ожидаемо. Вместе с тем, измерения проводились при базовых концентрациях белков RecFOR системы либо отсутствия экспрессии, тогда как их гиперэкспрессия возможно имела бы больший эффект на рекомбиногенность. Так, например гиперэкспрессия белка DinI приводит к тринадцатикратному изменению ЧРО на фоне отсутствия этого белка в клетке при делеции гена *dinI*. Однако, так же как и белок RecX, белок DinI подавляет ЧРО. Несмотря на то, что DinI стабилизирует филамент на ДНК, предотвращая разборку, он препятствует спариванию гомологичных цепей ДНК, занимая пространство большой бороздки филамента (Galkin et al., 2011). Представленные в этой работе данные отвечают на вопрос, какая же из этих двух разнонаправленных молекулярных функций DinI имеет первостепенное значение для рекомбинации *in vivo*.

Таблица 6. Влияние аминокислотных замен на ЧРО и SOS ответ.

Аминокислотные замены в белке RecAЕс реципиента ^a	Выход Ara ⁺ Str ^r или Thr ⁺ Str ^r рекомбинантов (% к донорам)	Linkage (μ) <i>ara</i> ⁺ - <i>leu</i> ⁺	Сцепленность (μ) <i>thr</i> ⁺ - <i>leu</i> ⁺	ЧРО ^c	Δ ЧРО	SOS	Δ SOS
w.t.	4.9 \pm 0.4	0.986 \pm 0.013 (900)	- ^b	5.0 \pm 0.1	1	30.3 \pm 3.1	1
R28A	3.3 \pm 0.3	0.734 \pm 0.063 (1000)	-	135.1 \pm 11.3	27.0	26.3 \pm 2.8	0.9
D112R	2.4 \pm 0.2	0.616 \pm 0.054 (700)	-	263.1 \pm 27.3	52.6	71.0 \pm 11.2	2.3
N113A	2.3 \pm 0.3	0.758 \pm 0.076 (1200)	-	117.6 \pm 12.4	23.5	164.8 \pm 20.1	5.4
K6A	4.8 \pm 0.5	-	0.721 \pm 0.055 (900)	23.8 \pm 2.1	4.8	65.0 \pm 7.1	2.1
K6D	5.2 \pm 0.5	-	0.805 \pm 0.072 (700)	14.5 \pm 1.3	2.9	84.5 \pm 9.2	2.8
R28N	5.6 \pm 0.5	-	0.892 \pm 0.077 (900)	7.1 \pm 0.6	1.4	34.8 \pm 3.5	1.1
R28D	0.8 \pm 0.1	0.673 \pm 0.061 (400)	-	188,7 \pm 17,4	37.8	66.6 \pm 6.8	2.2
T89V	2.0 \pm 0.2	0.978 \pm 0.012 (900)	-	8.2 \pm 0.3	1.6	35.0 \pm 3.4	1.2
T89A	1.8 \pm 0.2	0.934 \pm 0.083 (900)	-	25.0 \pm 2.3	5.0	34.6 \pm 3.3	1.1
D139A	5.3 \pm 0.6	-	0.878 \pm 0.076 (900)	8.3 \pm 0.7	1.7	36.8 \pm 3.7	1.2
D139K	5.5 \pm 0.6	-	0.868 \pm 0.070 (800)	9.0 \pm 0.8	1.8	45.3 \pm 3.9	1.5
K6D/ D139K	1.7 \pm 0.8	-	0.897 \pm 0.096 (300)	6.8 \pm 0.8	1.4	39.5 \pm 4.2	1.3
R28D/ D112R	1.3 \pm 0.8	0.661 \pm 0.057 (700)	-	204.1 \pm 18.5	40.8	38.5 \pm 3.6	1.3
R28A <i>mutS215</i>	3.7 \pm 0.3	0.786 \pm 0.062 (600)	-	100.0 \pm 9.3	20.0	-	-
D112R <i>mutS215</i>	3.9 \pm 0.5	0.728 \pm 0.050 (800)	-	140.8 \pm 11.2	28.2	-	-
N113A <i>mutS215</i>	4.5 \pm 0.4	0.825 \pm 0.073 (600)	-	76.9 \pm 6.4	15.3	-	-

Генетический анализ мутантов, проведенный в этой (таблица 6) и других 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 (RecAX53, RecAX21, RecADC17Ec, RecAPa). Всего одна аминокислотная замена E38K приводит к увеличению рекомбиногенности в 7-8 раз на фоне существенного увеличения SOS ответа. При этом, если сама по себе полная дерепрессия SOS регулона в присутствии RecA дикого типа вызывает увеличение ЧРО в 4 раза, то вычислить собственную рекомбиногенность SOS конститутивного мутанта RecAE38K кажется нетривиальной задачей, поскольку эффект может иметь аддитивный характер. Комбинация обоих фенотипов дает увеличение рекомбиногенности примерно в 17 раз. Однако все это доказывает, что даже одна замена в RecA может значительно изменить его рекомбиногенный потенциал. Таким образом, остается вопрос насколько возможно увеличение ЧРО при одиночной аминокислотной замене в отсутствии SOS ответа. Кроме того, насколько консервативные группы аминокислот, могут отвечать за рекомбинационную активность? В целом, должен быть найден ответ о верхних пределах для дерепрессии рекомбинационной активности. В поисках новых гиперрекомбинационных мутаций мы заинтересовались заменами в области мономер-мономерного взаимодействия белка RecA, которые были ранее локализованы несколькими научными группами (Nguyen et al., 1993; Masui et al., 1997; Zaitsev et al., 1999; Eldin et al., 2000).

При анализе вариантов RecA, представленном в таблице 6, были выявлены аминокислотные замены, не влияющие на рекомбинационные свойства белка (K6D/D139K), влияющие незначительно (K6D, R28N, T89V, D139A, D139K), а также значительно стимулирующие ЧРО (R28A, T89A, D112R, N113A, R28D/D112R). Максимальное изменение ЧРО вызвала замена аспарагиновой кислоты на аргинин в 112 позиции. При одиночной замене D112R выявлено увеличение ЧРО более чем в 50 раз. Кроме аминокислотной замены D112R, к значительному увеличению частоты рекомбинационных обменов приводит замена аргинина на аланин в позиции 28 (ЧРО увеличивается в 27 раз), замена аспарагина на аланин в 113 позиции (увеличение ЧРО в 22 раза) и замена треонина на аланин в 89 позиции

(увеличение ЧРО в 5.5 раз).

Комбинация R28D + D112R не увеличивает значение ЧРО, указывая на то, что $\Delta\text{ЧРО} = 41 - 50$ может быть максимально возможным увеличением ЧРО, которое все же еще совместимо с выживаемостью клетки (или которое может быть определено с использованием этой методики). Однако, аминокислотные замены R28D и D112R могут разрушать одни и те же межсубъединичные взаимодействия в филаменте RecA и, таким образом, их эффект не будет аддитивным.

Полученные данные показывают, что RecAEc, как, возможно, и другие белки RecA, обладает набором важных аминокислотных остатков, являющихся ключевыми для регуляции рекомбинационной активности. Однако эти аминокислотные остатки оптимизированы для условий, присущих *E. coli*. Эти данные могут указывать на существование пределов изменений, вызывающих гиперрекомбинацию, которые допустимы *in vivo*. Кроме того, полученные результаты позволяют заключить, что рекомбинационный потенциал белка RecAEc эволюционно оптимизирован таким образом, что его рекомбинационные функции супрессированы не только внешними регуляторными механизмами, но и последовательностью аминокислотных остатков самого белка.

3.1.2. Связь рекомбиногенности и конститутивной экспрессии SOS-функции

В задачи исследования входило установление взаимосвязи между рекомбиногенностью и SOS-ответом. Чтобы определить, не является ли высокое значение ЧРО следствием конститутивной экспрессией SOS-функции, был проведен SOS-хроматест. Плазмиды, несущие мутантные гены *recA* под контролем промотора *tac* или гена *recA* дикого типа, кодирующие варианты RecA, были трансформированы в рекомбинационно дефектный штамм GY7109: $\Delta\text{recA306 } sfiA::lacZ$ (Таблица 3), в которых ген *lacZ*, кодирующий β -галактозидазу, находился под контролем промотора гена *sfiA*

- одного из самых экспрессируемых генов SOS системы. Это позволило восстановить рекомбинационный фенотип штамма GY7109 и использовать уровень β -галактозидазы в клетке как индикатор степени конститутивной экспрессии SOS-функций.

Результаты эксперимента представлены в виде относительных величин в Таблице 6. За единицу в столбце "ЧРО" принято значение частоты рекомбинационных обменов, контролируемых белком RecA из *E. coli*, равное 5.0 ± 0.4 . За единицу в столбце "SOS-ответ" принят уровень синтеза β -галактозидазы, контролируемого белком RecA из *E. coli*, равный 35.3 ± 3.1 ед/клетку/генерацию.

Уровень конститутивного SOS-ответа, полученный для ранее исследованного белка RecAE38K (Δ SOS=17), представляет собой максимальное значение, относительно других известных вариантов (Bakhlanova et al., 2001). С учетом данного значения, исследованные нами варианты индуцируют умеренную (N113A: Δ SOS = 5.4), слабую (D112R, K6A, K6D, R28D: Δ SOS = 2.1 - 2.8) или отсутствующую дерепрессию SOS-функций (все остальные, Δ SOS = 0.9 - 1.5). Значение уровня SOS-ответа при конститутивной дерепрессии на фоне гена *recA* дикого типа и инактивированного гена *lexA* неизвестно, поскольку требует отдельной генноинженерной конструкции. Однако известна величина потенциального SOS-ответа индуцируемого с промотора *sfiA* гена в ходе использования мутагенов. Она может увеличиваться в 30-100 раз относительно базовых значений в зависимости от дозы и времени индукции.

Как видно из таблиц, значительной корреляции между увеличением ЧРО и конститутивным выражением SOS-функции не обнаружено, то есть можно утверждать, что при наблюдаемом увеличении частоты рекомбинационных обменов *in vivo*, обеспечиваемом вариантами белков с точечными аминокислотными заменами в области межмономерных взаимодействий, рекомбинация идет по SOS-независимому пути.

3.1.3. 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. Для сравнение кинетик вытеснения белка SSB белками RecAEc, RecAPa и RecA53, необходимо сравнить базовые биохимические свойства исследуемых рекомбиназ.

Таблица 7. Биохимические свойства белков RecAEc, RecAPa, RecAX53.

Параметры ^a	RecAX53	RecAEc	RecAPa
S ₀₅ (μM)	79.0 ± 5.8	76.0 ± 9.5	71.5 ± 6.9
k _{cat} (min ⁻¹) with poly(dT)	45.2 ± 2.2 ^b	29.2 ± 0.2	31.5 ± 2.9
k _{cat} (min ⁻¹) in 2M NaOAc	43.0 ± 2.1 ^b	30.0 ± 1.2	31.1 ± 2.0
стехеометрия (нуклеотидов)	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.3
STMP	300 ± 30	375 ± 30	600 ± 40

Как видно из таблицы 7 химерный белок имеет в полтора раза повышенную каталитическую активность. Такие свойства химерного белка как сродство к АТФ, размер сайта связывания с ДНК и чувствительность к ионной силе раствора аналогичны свойствам исходных белков. В связи с изменением гидролитической активности, кинетику вытеснения измеряли в

относительных единицах, где за единицу максимальной активности принята скорость гидролиза АТФ каждым из белков в условиях, когда нуклеация не ограничивалась предварительным присутствием SSB на ДНК.

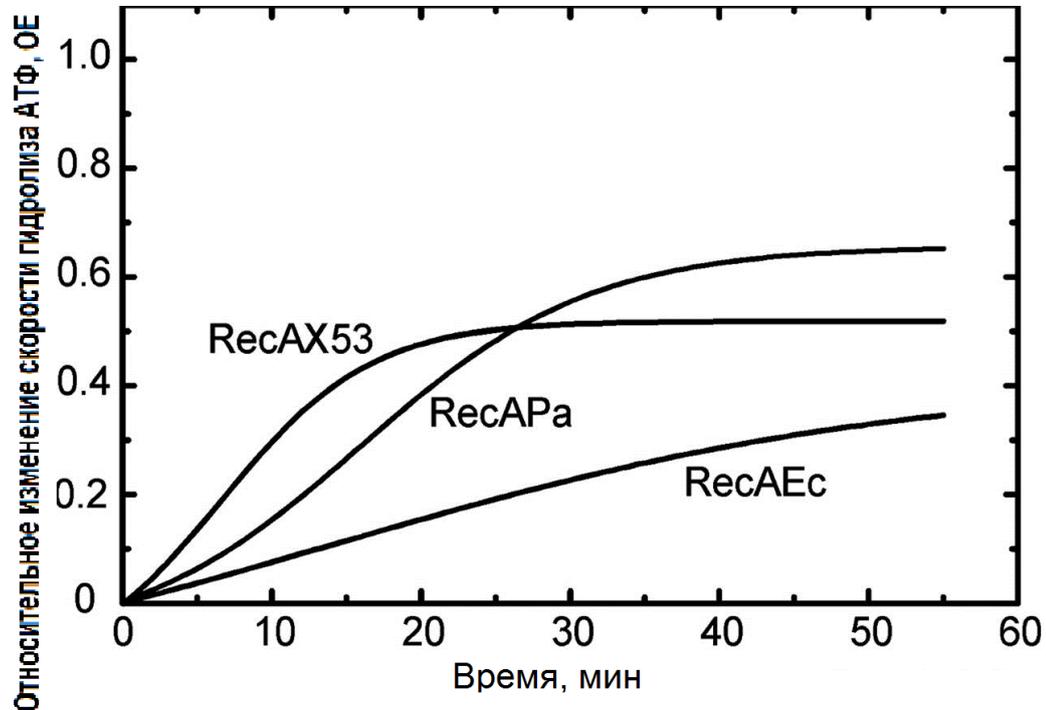


Рисунок 8. Кинетика замещения белка SSB на онДНК белками RecAЕс RecAPa RecAX53. Реакция измерялась в режиме реального времени по изменению RecA-зависимого гидролиза АТФ. Белок SSB предварительно инкубировался в течение 2 минут в присутствии онДНК. Реакция инициировалась добавлением белка RecA в измерительную 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 8). 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 односторонней ДНК.

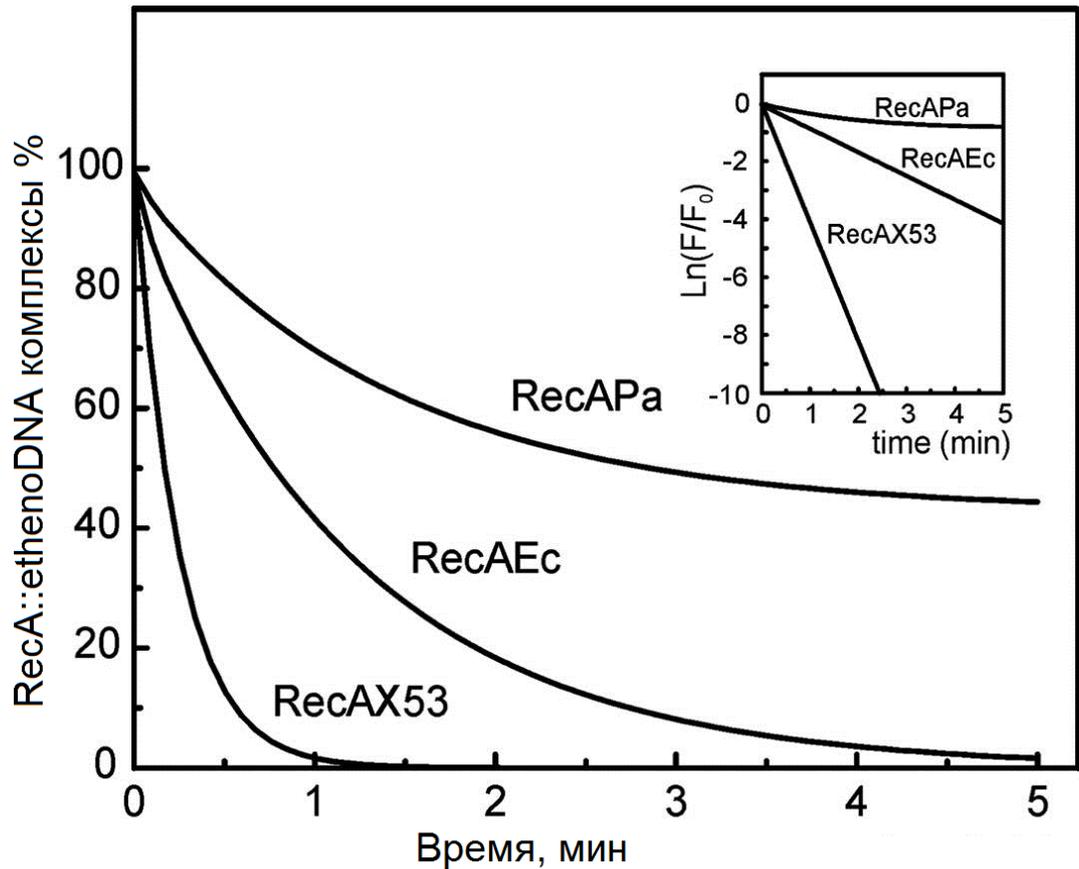


Рисунок 9. Кинетика распада нуклеопротеинового комплекса, образованного белками *RecA* и этеноДНК. Эксперименты проведены при 37°С, в буфере содержащем: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 12 мМ MgCl², 3 мкМ этеноДНК, 2.5 мкМ *RecA*, 1 мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему. Реакция инициировалась добавлением 50 мкМ 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. 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 *RecAEc/RecAPa/RecAX53* соответствует значениям 1:3:0,2. Данные означают, что филамент *RecAPa* в большей степени занимает 5' конец онДНК, чем остальные рекомбиназы. В условиях *in vivo*, стабилизация филамента *RecAEc* на 5' конце возможна только

комплексом белков RecFOR либо его отдельными составляющими – белками RecO и RecR. В этом случае возможна инициация рекомбинационного события с 5' филамента (Bork, et al., 2001). Для подтверждения такой способности белки RecAЕс и RecAPa сравнивались в реакции образования Д-петли. Реакция образования Д-петли позволяет различить инициацию сцепленных молекул с 5' и 3' концов филамента благодаря участкам протяженной гетерологии установленным на противоположном конце линейной онДНК. Как следует из рисунка, белки RecAЕс и RecAPa одинаково эффективны в проведении Д-петель с 3' конца. Однако RecAPa в несколько раз эффективнее иницирует Д-петли 5' конца, чем RecAЕс. Данное свойство белка RecAPa отчасти может объяснять высокую ЧРО найденную в конъюгационной рекомбинации бактерий экспрессирующих этот белок. Гиперрекомбиногенность белка RecAPa достижима благодаря инициации рекомбинации с 5' конца в отсутствие вспомогательного комплекса белков RecFOR.

Данный вывод применим к анализу активности RecAPa, но едва-ли подходит к случаю с белком RecAX53. Хотя RecAX53 имеет самую высокую скорость диссоциации от ДНК, бактерии экспрессирующие RecAX53 обладают еще большей рекомбиногенностью, чем те которые экспрессируют RecAPa. Кроме того эффективность конкуренции RecAX53 с белком SSB является самой высокой среди остальных белков. Чтобы разрешить это противоречие, проведен анализ скорости ассоциации RecAX53 к етеноДНК.

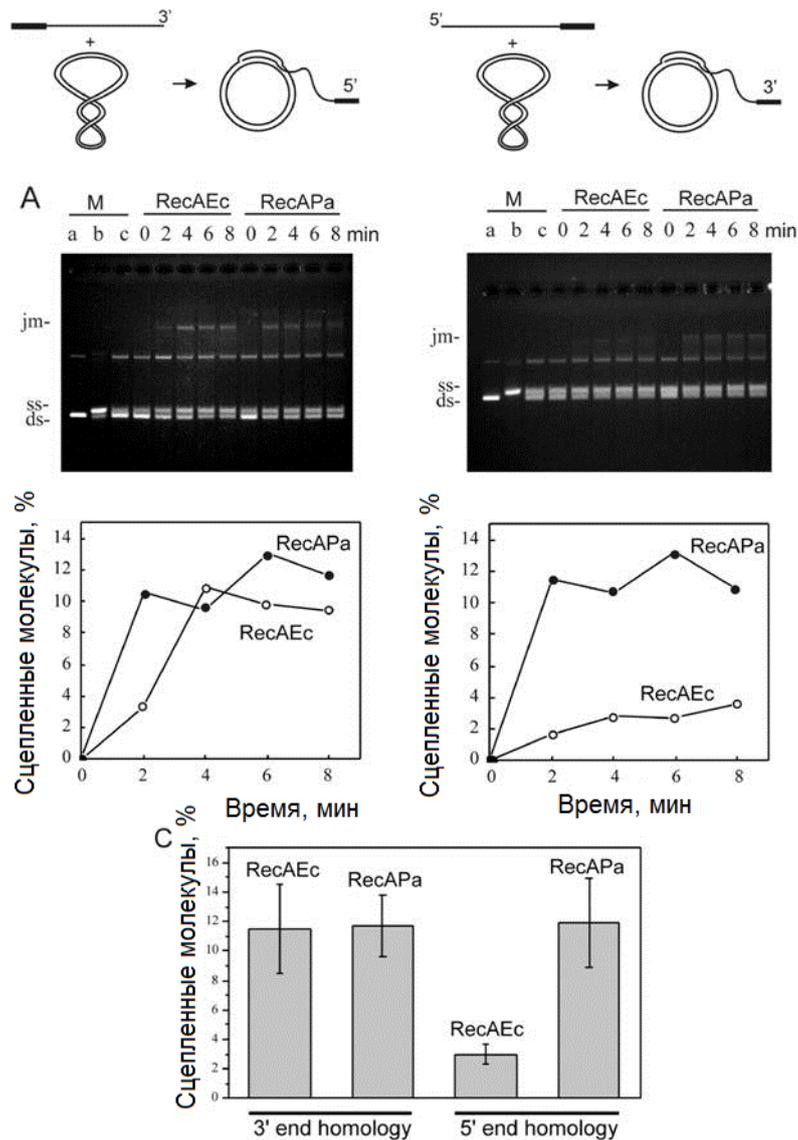


Рисунок 10. Кинетика образования сцепленных молекул в виде Д-петли. Белки *RecAEc* и *RecAPa* проводят переключение спаренности оснований между суперскрученной кольцевой дцДНК фага M13 и линейной оцДНК того же фага, несущей участок гетерологии длиной 1037 оснований с 5' конца либо с 3' конца. Схема реакции представлена сверху над фигурой. Реакция останавливалась в указанные моменты времени с помощью протеиназы K и 0.9% SDS. Продукты реакции разделялись на 1% агарозном геле и визуализировались с помощью бромистого этидия. Значения соответствующие количеству сцепленных молекул приведены на скане соответствующих электрофореграмм.

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 реакцию 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 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 динамично мультимеризующийся филамент.

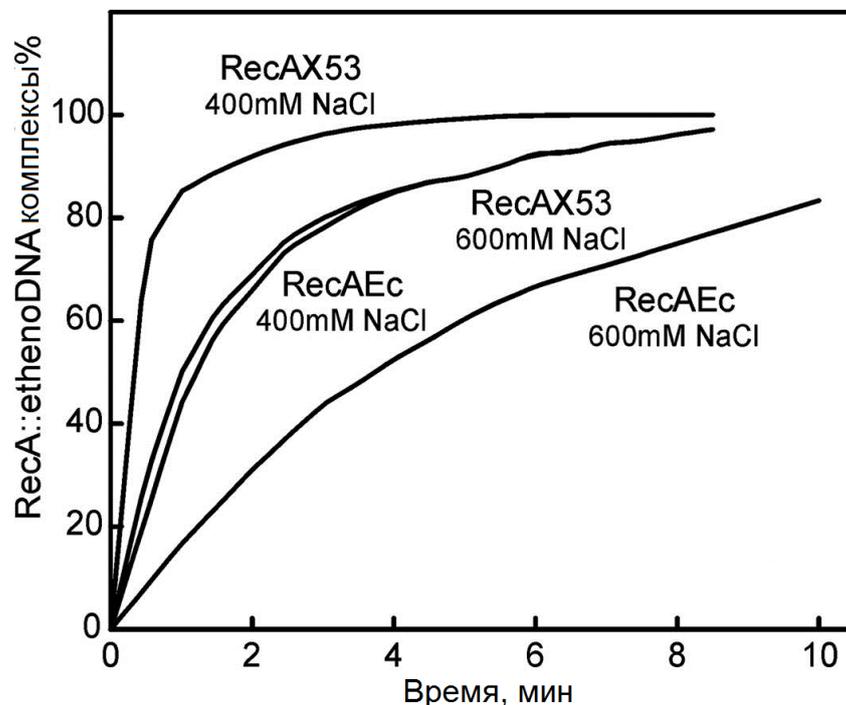


Рисунок 11. Кинетика образования нуклеопротеинового комплекса между RecA и этеноДНК. Эксперименты проведены при 37°C, в буфере содержащем: 25 мМ трис-HCl (pH 7.5), 12 мМ MgCl₂, 1.9 мкМ этеноДНК,

0.8 мкМ *RecA*Ec или *RecA*X53, 0.1 мМ *ATФyS* и указанные концентрации *NaCl*. Реакция инициировалась добавлением *RecA* в точке 0 на оси абсцисс.

В каких же условиях могут реализоваться свойства такого динамического филамента наиболее эффективным образом? Для ответа на этот вопрос классическая модель переноса гомологичной нити ДНК *in vitro* была немного модифицирована. Перенос гомологичной нити *in vitro* можно осуществлять в избытке рекомбиназы относительно ДНК либо недостатке рекомбиназы. В первом случае вся одонитевая кольцевая ДНК фага M13 должна быть покрыта белком. Тогда каждый отрезок ДНК в любой момент времени может включиться в процесс переноса нити. При этом кинетика переноса нити должна зависеть от времени поиска гомологичной последовательности и непосредственно синаптазной эффективности рекомбиназы. При этом, согласно теории, чем длиннее участок гомологичной ДНК, тем быстрее должны происходить все процессы. Во втором случае только небольшая часть одноцепочечной ДНК покрыта белком. Тогда, разбираясь и собираясь, короткие кластеры мономеров должны диффузно перемещаться вдоль кольцевой ДНК. Если сайт спаривания с гомологичной дцДНК представляет собой относительно короткий отрезок, то начало переключения спаренности оснований должно зависеть в первую очередь от динамичности филамента, того на сколько быстро короткий кластер мономеров *RecA* сможет достичь сайт потенциального переключения ДНК оснований.

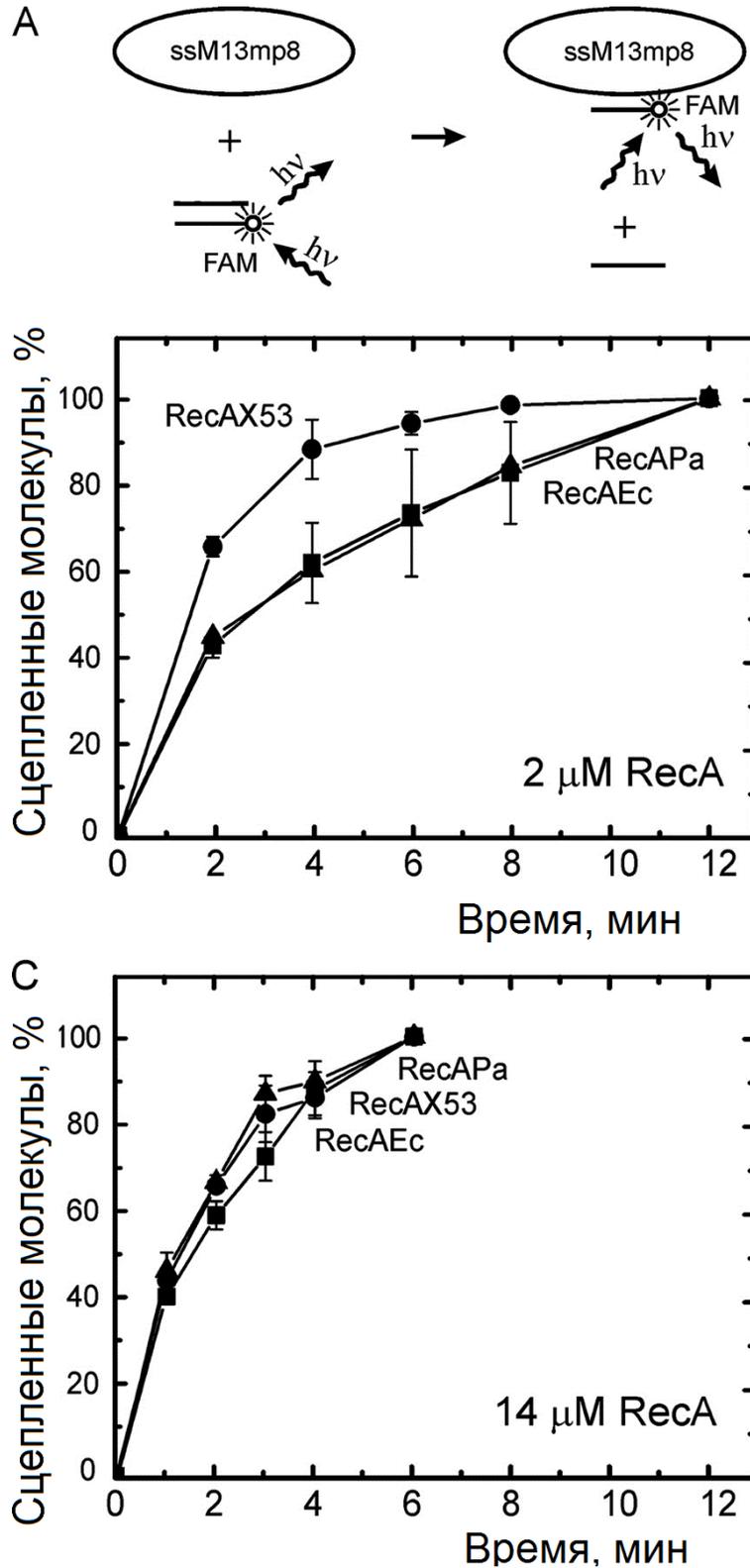


Рисунок 12. Кинетика образования сцепленных молекул в зависимости от концентрации белков. Белки RecAEc, RecAX53 и RecAPa проводят переключение спаренности оснований между кольцевой оцДНК фага M13 и участком дцДНК того же фага меченного флуоресцеином длиной 34 пары оснований. Схема реакции представлена сверху над фигурой.

Эксперименты проведены при 37°C, в буфере содержащем: 25 mM трис-HCl (pH 7.5), 12 mM MgCl₂, 21 мкМ оцДНК, RecA в концентрации как указано на рисунке, 2 мкМ SSB, 2мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему. Реакция останавливалась в указанные моменты времени с помощью протеиназы K и 0.9% SDS. Продукты реакции разделялись на 1% агарозном геле и визуализировались с помощью флуоресцентного сканера Turbopon 8600. Сканы электрофореграмм подвергнуты количественной обработке. Уровень флуоресценции, зарегистрированный по достижении реакции, принят за 100%. Интенсивность бандов в промежуточные моменты времени нормализована относительно интенсивности банды соответствующего 100%.

Из рисунка 12 видно, что в условиях избытка белка, все три рекомбиназы одинаково эффективно осуществляют спаривание и перенос гомологичной цепи. В условиях недостатка белок RecAX53 значительно выделяется на фоне исходных рекомбиназ своей активностью. Можно предположить, что рекомбинационная активность белка RecAX53 благодаря более активному перемещению по ДНК проявляется на более ранних этапах конъюгационной рекомбинации. При этом, вследствие быстрой разборки филамента, рекомбинационные интермедиаты, хотя имеют короткую протяженность, но имеют более высокую частоту инициации. Таким образом, биохимические особенности RecAX53 обеспечивают иной путь рекомбинационных событий. Эти данные позволяют предположить с высокой степенью вероятности, что RecAX53-зависимая миграция ветвления ДНК прерывается, не завершаясь кроссинговером. Образуются рекомбинанты некроссоверного (конверсионного) типа, возникающие за счет застроек коротких одностранных участков ДНК. Если так, то большинство рекомбинационных интермедиатов сводится к конверсии, где становятся субстратом для системы mismatch репарации. Подытоживая этот раздел, можно заключить, что белки RecAPa и RecAX53 используют

преимущественно разные механизмы: белок RecAPa увеличивает ЧРО главным образом за счет механизма репарации двунитевого разрыва, тогда как RecAX53 – за счет репарации однонитевого разрыва. Ясно также, что эти два нормальных механизма могут быть интенсифицированы в случае гиперрекомбинации. Описанные пути гиперрекомбинации находятся в пределах ранее известных механизмов и не требуют для своего объяснения новых моделей.

3.1.4 RecAD112R- зависимая рекомбиногенность

Сложившаяся у большинства исследователей точка зрения на гиперрекомбиногенный потенциал RecA сводится главным образом к способности RecA ускоренно филаментировать или, иначе говоря, афинности первичного сайта связывания филамента к ДНК. Вследствие этого отличительной особенностью большинства гиперрекомбиназ является свойство вытеснять белок SSB более эффективно, чем белок RecA дикого типа. Рассмотренные выше примеры с белками RecAX53 и RecAPa полностью подтверждают эту логику. 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.

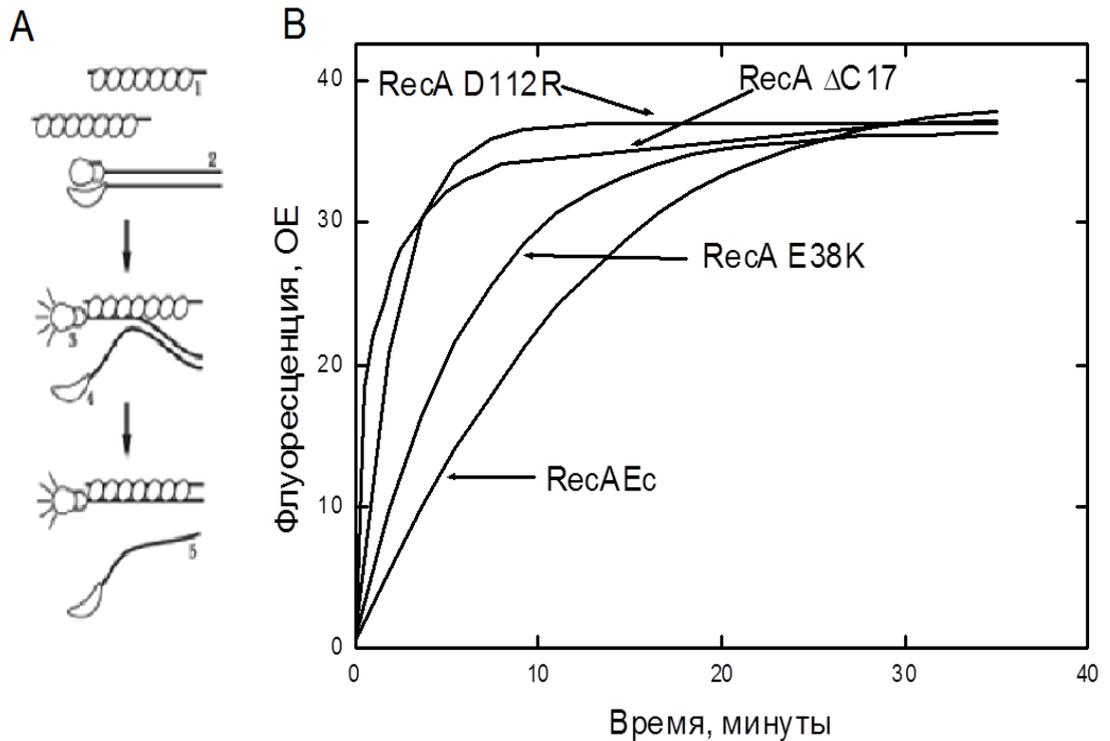


Рисунок 13. Проведение синаптной реакции белками RecA.

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 мМ трис-НСl (рН 7.5), 2 мМ MgCl₂, 0.7 мМ 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 днДНК в момент времени, соответствующий точке 0 на оси абсцисс.

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 синаптную 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 синаптной реакции в этих условиях полностью исключается (Menetski and Kowalczykowski, 1985). Реакцию инициировали добавлением двунитевых олигонуклеотидов длиной 34 пары оснований. Двунитевой олигонуклеотид мечен по 5'-концу одной из цепей флуоресцеином (FAM) и по 3'-концу комплементарной цепи молекулой гасителя, дабсилем (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 13). Однонаправленный характер реакции обеспечивается исходным избытком оцДНК, содержащейся в филаменте, относительно двуцепочечного 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 RecA D112R значительно выше, чем в реакции, проводимой белком RecA дикого типа и RecAE38K. На сегодняшний день белок RecA D112R является единственным из исследованных вариантов RecA, характеризующихся повышенной рекомбинационной активностью, где показано, что молекулярный механизм усиления рекомбинационной активности связан с качественным изменением такой функции филамента, как поиск гомологичной цепи ДНК для инициирования синаптной реакции.

3.2. Негативная селекция гиперрекомбинационного фенотипа

Вариант белка RecAD112R имеет максимально высокую рекомбинационную способность среди всех изученных вариантов RecA,

охарактеризованных генетически: он увеличивает ЧРО в клетках *E. coli* в 50 раз по сравнению с белком RecA_{Ec} дикого типа. Столь высокое значение ЧРО не является естественным для бактерии, что приводит к утере рекомбинационного фенотипа. Было выдвинуто предположение, что запредельный уровень рекомбиногенности может активировать механизмы, способные супрессировать ЧРО в ряду генераций и привести к ее понижению.

Для проверки этой гипотезы клетки долгое время инкубировали в состоянии экспоненциального роста, при этом отбирая аликвоты через некоторые промежутки времени с целью измерения ЧРО. Результаты представлены на рисунке 14. Как показано на графике, популяция клеток *E. coli* с предельно высоким уровнем ЧРО «деэволюционирует» к нормальному уровню рекомбинационной активности. Всего в эксперименте анализировалось 16 независимых популяций клеток *E. coli* JC10289 Δ *recA*, содержащих плазмиду с мутантным геном *recAD112R*. Популяции культивировались в течение 14 суток, на протяжении которых периодически измерялся рекомбиногенный фенотип. Было обнаружено, что значение ЧРО в каждом отдельном случае снижается до уровня клеток дикого типа, но с разной скоростью. Как показано на Рисунке 14, каждая из культур, исходно происходивших из одного клона, утрачивает гиперрекомбинационный фенотип по-разному, что может свидетельствовать об индивидуальном для каждого случая пути к норме. Очевидно, что тренд носит всеобщий характер, и к 70 поколению Δ ЧРО для разных линий приобретает значение от 1 до 14. Иными словами, клетки *E. coli* с аномальным фенотипом становятся объектом селекции, в ходе которого происходит возвращение нормального фенотипа. Гиперрекомбиногенный фенотип запускает механизмы отбора клеток, подавляющие рекомбинацию. Было выдвинуто предположение, что механизм селекции может осуществляться как за счет мутаций в самом гене *recA*, так и за счет изменения других генов, контролирующих гомологическую рекомбинацию. Полученные в результате селекции

нормализовавшиеся клетки теоретически могут быть идентичны клеткам дикого типа, но могут быть мутантными по отношению к ним, обладая фенотипической схожестью.

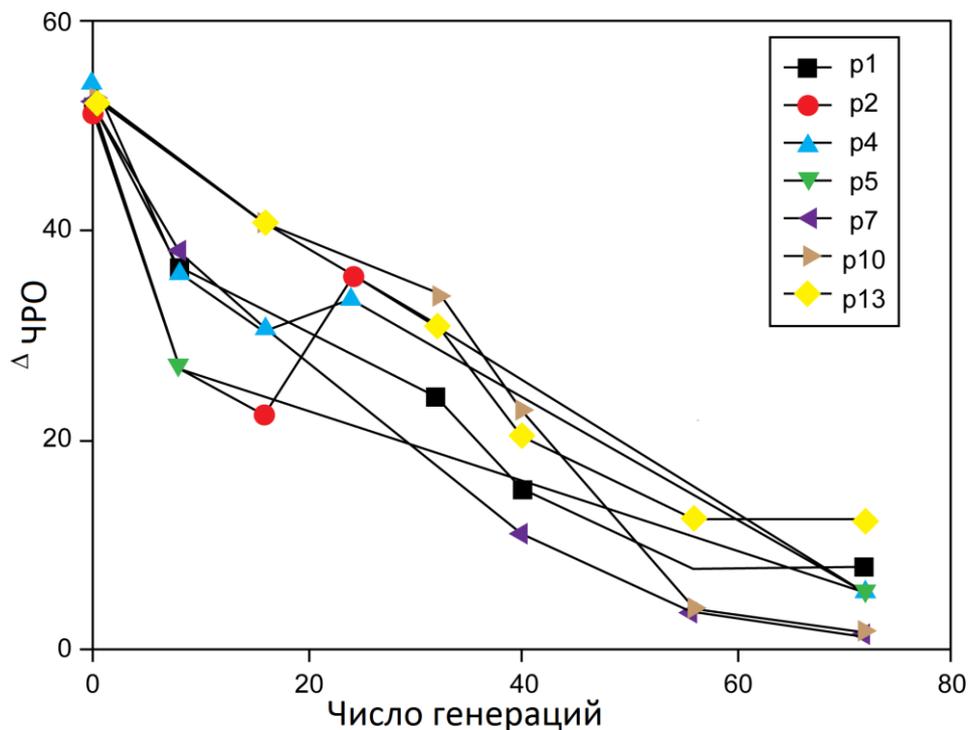


Рисунок 14. Кинетика нормализации ЧРО для 7 независимых штаммов, происходящих из одной клетки, в которой продуцируется гиперрекомбиногенный белок RecA D112R. Штаммы экспрессирующие RecAD112R с плазмиды pRecAD112R анализировались на протяжении 70 поколений в штамме JC10289. После достижения плотности 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 RecAD112R, к ЧРО экспрессирующей белок дикого типа.

Для выявления мутаций, приводящих к снижению ЧРО, плазмиды и хромосомы из «деэволюционировавших» линий были разделены и подвергнуты генетическому анализу. Для поиска мутаций, произошедших

непосредственно в гене *recA* либо несущей этот ген плазмиде, производилась трансформация штамма JC10289 дикого типа плазмидой, выделенной из селектированного штамма, демонстрирующего нормальный фенотип. И наоборот, для выявления мутантных клеток, проводилось замещение плазмид из этих клеток на исходную плазмиду pRecAD112R. Таким образом, было обнаружено, что возврат к нормальному фенотипу может быть обусловлен изменениями, произошедшими как на плазмиде, так и на хромосоме.

Таблица 8. Перемещение измененных плазмид в исходный штамм.

Штамм №	ΔЧРО	ΔЧРО JC10289/ pRecA[D112R] _{Mod}	ΔЧРО JC10289 _{Mod} / pRecA[D112R]
1	7.8	1.3	-
2	5.7	1.3	-
3	2.2	1.7	14.1
4	5.6	1.3	20.8
5	5.4	1.3	-
6	1.2	2.4	13.8
7	1.5	3.0	12.4
8	10.8	58.8	7.2
9	12.0	2.0	-
10	1.7	1.7	31.3
11	13.4	50.0	15.3
12	20.3	65.4	4.1
13	12,4	68.7	13.5
14	3.0	0.7	-
15	5.6	2.2	-
16	6.0	3.2	-

Для дальнейшего исследования тех мутаций, которые содержались в плазмидах, были взяты те из них, которые обеспечивали максимальное снижение ЧРО. 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.

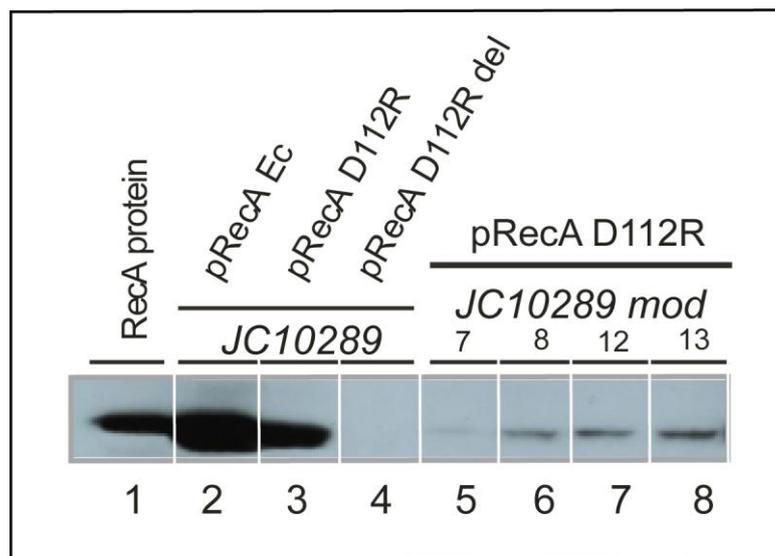


Рисунок 15. Экспрессия белка *RecAD112R* в клетках утративших гиперрекомбиногенный фенотип. Количество экспрессируемого белка измерялось с помощью иммуноблота, как указано в материалах и методах. Отбор образцов производился при плотности клеточных культур 5×10^7 клеток. Образцы под номерами 2 и 3 отображают исходный уровень экспрессии белка. Образцы под номерами 5, 6, 7, 8 отбирались у культур экспрессирующих *RecAD112R* в модифицированных штаммах 7, 8, 12, 13.

Иммунологический анализ бактериальных линий с мутациями на хромосоме, показал, что селекция рекомбиногенности осуществляется точно таким же способом, за счет снижения уровня экспрессии белка RecAD112R в клетке (рисунок 15). Как и в случае с плазмидной мутацией, данные по хромосомным мутациям свидетельствуют о корреляции между падением количества экспрессируемого белка и снижением ЧРО.

A

```

АТАААААТАGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTT
TGACAGCTTATCATCGATAAGCTGATCCACAGGACGGGTGTGGTGCCCATG
ATCGCGTAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGG
CGGCCAAAGCGGTTCGGACAGTGTCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGC
ATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTGCG
GAATGGACGATATCCCAGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCT
ATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTG
TTAGATTTTATACACGGTGCCTGACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAA
CTACCGCATTAAGCTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTC
AGGCAGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCA
TAATTCGTGTCGCTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGC
CGACATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTA
ATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAC
AGGAAACAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTCTAGAG
CGATACACTAACTTGGAGTGATGCCatggctatcgacgaaaac.....

```

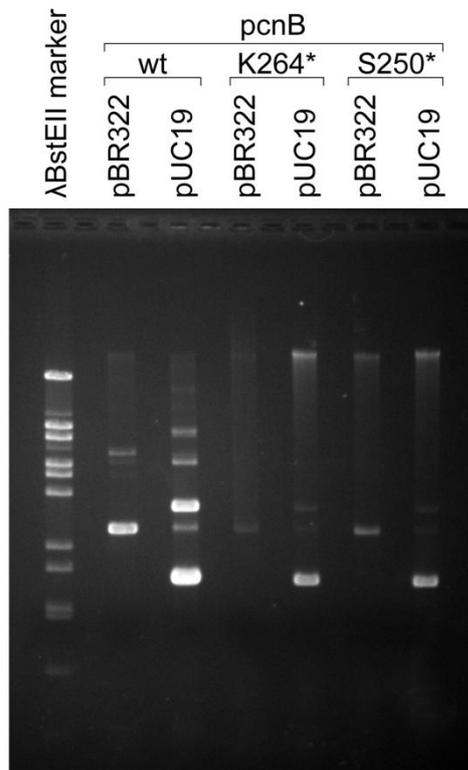
B

Рисунок 16. Плазмидные и хромосомные мутации найденные в модифицированных культурах и приводящие к снижению ЧРО в клетках.

А. Модификации плазмиды pRecAD112R: делеция 633 пар оснований обозначена зеленым, прямые повторы 37 пар оснований обеспечивающие появление делеции указаны синим цветом, начало гена recA обозначено красным цветом. Б. Мутации гена rcpB ответственного за копияность плазмиды. Точечные мутации образуют стоп-кодон и инактивируют ген rcpB, что приводит к снижению копияности плазмид.

Микрочиповый анализ генома «деэволюционировавших» линий №12 и №13, несущих хромосомные мутации, с последующим секвенированием генов, выявил точечную нуклеотидную замену в гене *rcpB*, кодирующем поли(А) полимеразу (рисунок 16Б). Ген *rcpB*, как известно, влияет на копияность плазмид, имеющих ColE1 репликон (Masters et al., 1993). Действительно, анализ мутированных плазмид, сочетающихся с мутацией в гене *rcpB*, подтвердил уменьшение их количества (Таблица 9). Точечная мутация приводит к образованию стоп кодона инактивирующему ген, при этом образуется сайт рестрикции для рестриктазы *AluI*, что является удобным для анализа. Амплификация и рестрикция гена *rcpB* из других мутантных линий, характеризующихся снижением ЧРО за счет мутаций на хромосоме, изменений не выявила.

Таблица 9. Изменение количества плазмиды в модифицированных штаммах.

Штамм/плазида	Оптическая плотность ночной культуры (о.е.)	Количество колоний	Количество плазмиды из 3х миллилитров ночной культуры
MG1655/pBR322	6.15 ±0.35	244 ±44	71.4 ±11.5
rcpB K264/pBR322	6.71 ±0.27	183 ±22	58.8 ±27.8
rcpB S250/pBR322	6.68 ±0.09	206 ±21	51.7 ±8.7
MG1655/pUC19	2.97 ±0.08	70 ±13	172.2 ±14.2
rcpB K264/pUC19	6.67 ±0.29	200 ±16	78.2 ±14.6
rcpB S250/pUC19	6.75 ±0.11	239 ±21	71.7 ±3.5

Замещение бактериальных клеток с гиперрекомбинационным фенотипом в культуре 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*. Как видно из рисунка 17А 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. 17В). 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.

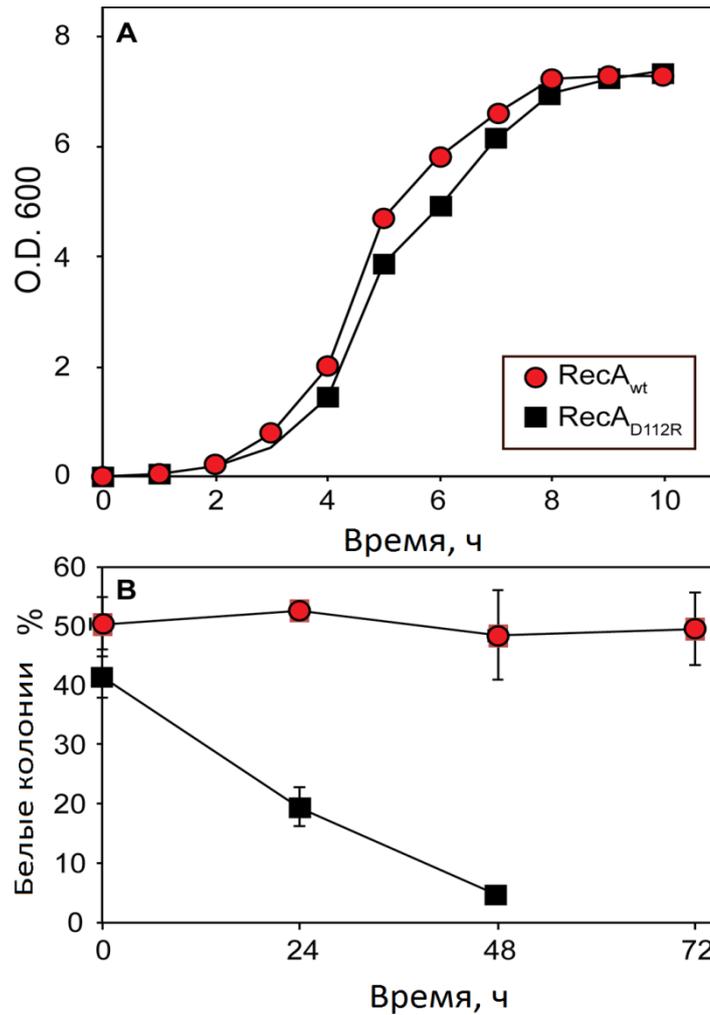


Рисунок 17. Снижение скорости роста бактериального штамма экспрессирующего *RecAD112R*. А. Сравнительная динамика роста клеток экспрессирующих *RecA* дикого типа (красные кружки) либо *RecAD112R* (черные квадраты). В. Верхняя кривая обозначает динамику количественного соотношения штаммов, каждый из которых 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.

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). Интересно, что комплексы образованные белком RecAD112R с гетеродуплексной дцДНК были столь же устойчивы к действию белка 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. Таким образом, чтобы подтвердить эту теорию, для освобождения участков бактериальной хромосомы от RecAD112R и последующего восстановления клеточного роста, белок RecX был коэкспрессирован совместно с RecA.

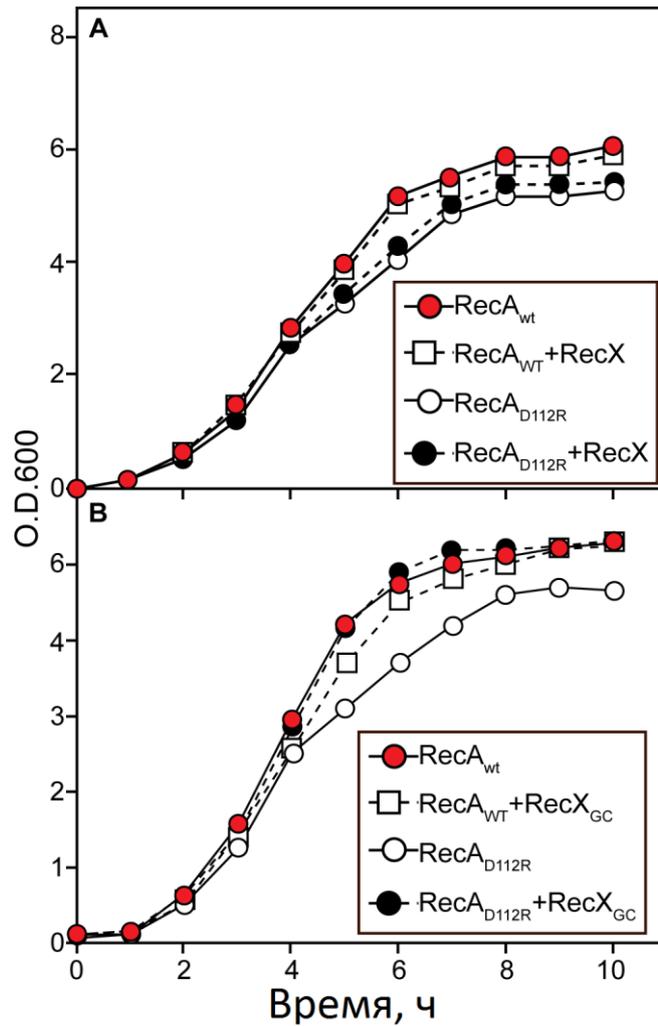


Рисунок 18. Восстановление нормальной скорости роста при коэкспрессии белков *RecX* с белком *RecAD112R*. А. Коэкспрессия белка *RecX* из *E.coli* с белком *RecA_{wt}* или *RecAD112R*. В. Коэкспрессия белка *RecX* из *N.gonorea* с белком *RecA_{wt}* или *RecAD112R*. Гены *recA* и *recX* коэкспрессировались с одной и той же плазмиды. Ген *recA* заклонирован под *tac* промотором, тогда как ген *recX* заклонирован под арабинозным промотором.

Как видно из рисунка 18 экспрессия *RecX* действительно приводит к увеличению скорости роста клеток, содержащих вариант *RecAD11R*. Интересно, что у штамма дикого типа при экспрессии *RecX* скорость роста сохраняется на прежнем уровне. Из этих экспериментов следует два важных вывода. Первый из них заключается в том, что *RecAD112R* образует чрезмерно устойчивые комплексы с ДНК, которые на клеточном уровне

выражаются в задержке репликации и роста бактерий. Второй вывод касается назначения белка RecX в бактериальной клетке. Описанные эксперименты дают основание предполагать, что RecX необходим для разгрузки гетерологичной двуцепочечной ДНК от присутствия недиссоциированных молекул RecA. В пользу данной идеи свидетельствует известная логика, согласно которой, по завершении обмена гомологичных цепей ДНК, белок RecA, представляющий собой препятствие для метаболизма ДНК бактерии, должен быть смещен с хромосомной ДНК. Действительно, других каких-либо белков разгрузчиков - кандидатов на эту роль в литературе не описано. Согласно опубликованным данным белок RecX начинает экспрессироваться на поздних стадиях SOS ответа и таким образом идеально подходит для выполнения такой роли.

3.3.1. Белок RecX – индуцируемая гипорекомбиногенность

Аминокислотная замена D112R меняет межсубъединичные взаимодействия в филаменте RecA (Eldin et al., 2000), что потенциально должно сказываться не только на динамике мультимеризации мономеров вдоль ДНК, но и на взаимодействии RecA с регуляторными белками. В этой связи гиперрекомбиногенный вариант белка RecAD112R был совмещен с таким сильным ингибитором рекомбинации как белок RecX.

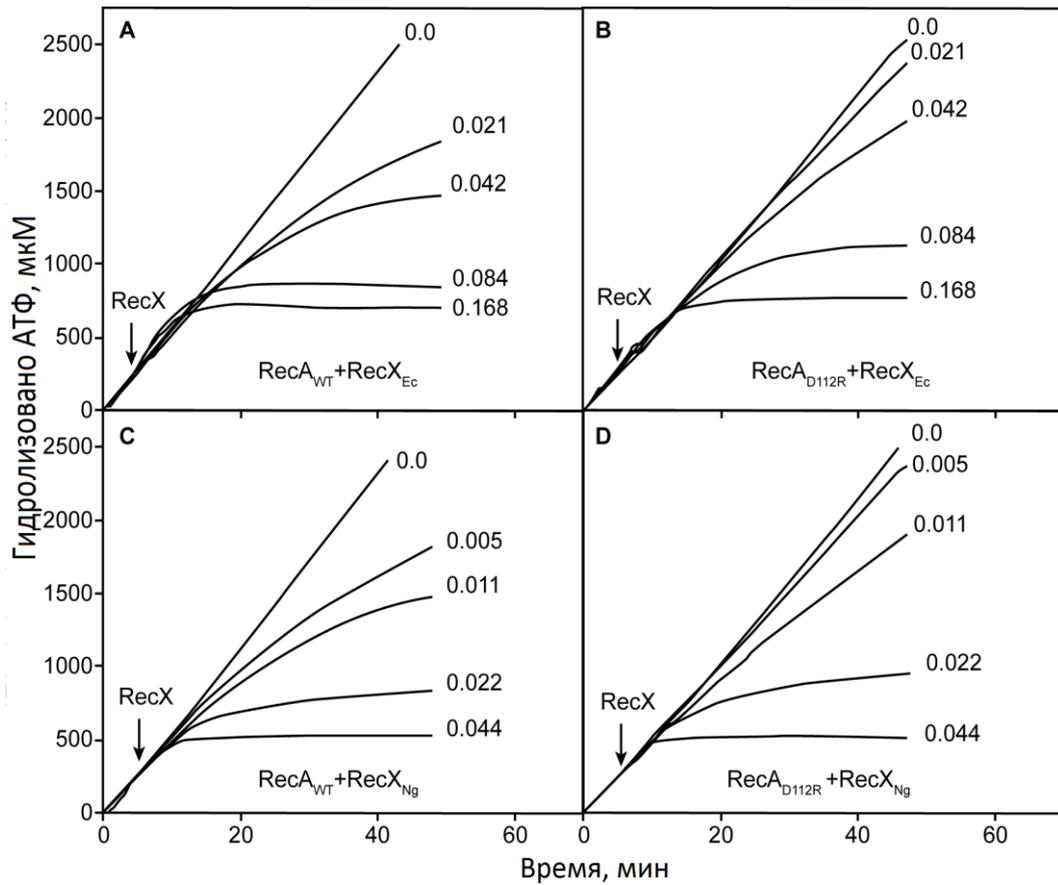


Рисунок 19. Ингибирование оцДНК-зависимой АТФазы белка *RecA* после добавления различных концентраций *RecX*.

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 М13, 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 19 показана кинетика ингибирования ДНК-зависимой АТФазы белка *RecA* после добавления различных концентраций белка *RecX*. В реакционную смесь добавлялась оцДНК фага М13, 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 вариант белка с а.к. заменой 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 RecAwt сохраняется полностью. В рамках кэппинг-модели взаимодействия, данный результат может интерпретироваться так, что филамент RecAD112R содержит столько же брешей сколько филамент RecAwt, 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. Данный факт может свидетельствовать о том, что повышенная устойчивость RecAD112R к RecX является не столько следствием изменения количества брешей в филаменте сколько другими причинами. К числу таковых можно было бы отнести и изменение динамики филаментации и специфику взаимодействия 112 аминокислоты с RecX и ряд других теоретически возможных причин, которые будут рассмотрены ниже.

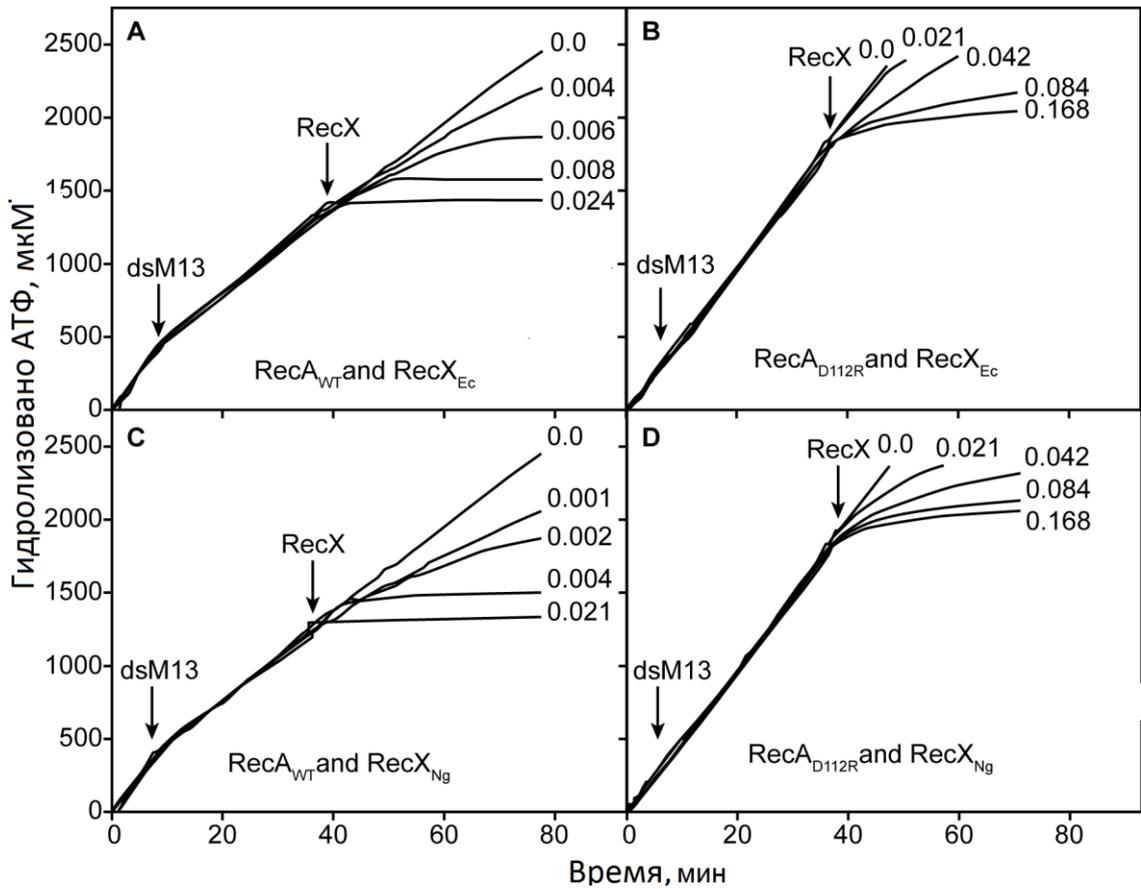


Рисунок 20. Ингибирование дцДНК-зависимой АТФазы белка *RecA* после добавления различных концентраций *RecX*.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ онДНК фага М13, 10 мкМ днДНК фага М13, 3 мкМ *RecA*_{Ec} или *RecA*_{D112R}, 0.5 мкМ белка SSB и указанная на рисунке концентрация белка *RecX* (нМ). Кольцевую онДНК 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 днДНК фага М13 для инициации реакции обмена гомологичных нитей. Белок *RecX*_{Ec} либо *RecX*_{Ng} добавляли в реакционную смесь спустя 35 минут после начала реакции.

На рисунке 20 показана кинетика ингибирования ДНК-зависимой АТФазы белка RecA после добавления различных концентраций белка RecX в реакцию обмена цепей ДНК. Реакция обмена цепей инициировалась добавлением гомологичной двуцепочечной ДНК к пресинаптическому комплексу. Спустя тридцать пять минут после начала реакции большинство молекул ДНК образуют продукт реакции – кольцевую никированную ДНК. По завершении реакции белок RecA остается ассоциирован с новообразовавшейся двуцепочечной ДНК, что заметно по сохранению его АТФазной активности, как было предсказано ранее (Ullsperger et al., 1995). Так же как в эксперименте с оцДНК, добавление белка RecX приводит к диссоциации RecA от ДНК. Однако минимально необходимая для полной диссоциации комплекса концентрация белка RecX ниже в 10-20 раз, чем в предыдущем эксперименте. Данный феномен относится к ингибированию белка RecA дикого типа, но не обнаруживается в постановке с вариантом белка RecAD112R. Все основные закономерности, полученные в реакциях с пресинаптическими комплексами, сохранились в реакциях с постсинаптическими комплексами. Комплекс RecAD112R обладает большей стабильностью, а RecXNg более активен, чем RecXEc. Тенденция нарушена лишь в экспериментальной паре между пресинаптическим и постсинаптическими комплексами RecAD112R. Для разборки филаментов RecAD112R на одноцепочечной ДНК и двуцепочечной ДНК требуется примерно одинаковое количество белка RecX. Все основные закономерности этих экспериментов *in vitro* нашли свое подтверждение *in vivo* в экспериментах с конъюгацией (таблица 10). 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 RecXEc. Интересно, что делеция гена *recXNg* приводит к падению УФ резистентности в *N.gonorea*, как и делеция гена *recXEc* в *E.coli*, что выглядит своего рода неразрешимым парадоксом (Stohl et al., 2001). Стимулирующая

роль *recX* нами не была найдена в конъюгации ни при каких уровнях экспрессии гена. Различие между диким типом RecA и RecAD112R несколько падают при разных уровнях экспрессии RecX, хотя общий тренд сохраняется. При максимальной экспрессии RecX различие снижается до четырехкратного значения. Таким образом данные *in vitro* и конъюгации *in vivo* демонстрируют хорошую корреляцию.

Таблица 10. Подавление ЧРО белком RecX

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		

3.3.2. Молекулярные механизмы подавления рекомбинации белком RecX

В ходе бактериальной конъюгации у *E. coli* донор передает в реципиент большой фрагмент хромосомы или даже полную хромосому (100 мин.), которая с высокой эффективностью интегрируется в хромосому реципиента. Входящий 5'-конец конвертируется в дцДНК, тогда как 3'-конец может оставаться одонитевым. До тех пор, пока донорная ДНК полностью не достроена до двунитевого состояния, она имеет смешанный характер, то есть состоит из оц- и дцДНК с одонитевыми пробелами. Белок SSB активно взаимодействует с одонитевыми участками донорной ДНК и таким образом является основным препятствием к образованию филаментов RecA на этой ДНК. Вместе с тем, 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. В эксперименте одноцепочечную ДНК фага M13 инкубировали с белком SSB на протяжении 10 минут. При этом минимальная концентрация SSB бралась из такого расчета, чтобы он полностью связал всю имеющуюся в реакции ДНК (Lohman et al., 1988). Максимальная же концентрация SSB в данном эксперименте представлена четырехкратным избытком относительно ДНК. По истечении 10 минут в пробирку добавлялся RecA дикого типа либо RecAD112R. Как видно из графика на рисунке 21, RecA D112R вытесняет SSB значительно быстрее, чем RecAEc. Данные свидетельствуют о том, что белок RecAD112R более активно конкурирует за сайты связывания на оцДНК в сравнении с RecA дикого типа. Нуклеация RecA сильно замедляется в присутствии избытка SSB. Добавление в реакцию белка RecX приводит к еще большему замедлению нуклеации каждого из белков RecA. Однако роль белка SSB теперь становится стимулирующей. 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. Данный эксперимент имеет два вытекающих из него важных вывода: 1) белок SSB является антагонистом RecX 2) RecAD112R не только устойчив к действию RecX, но и SSB. Совместно, оба вывода автоматически инициируют гипотезу, что повышенная устойчивость RecAD112R 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.

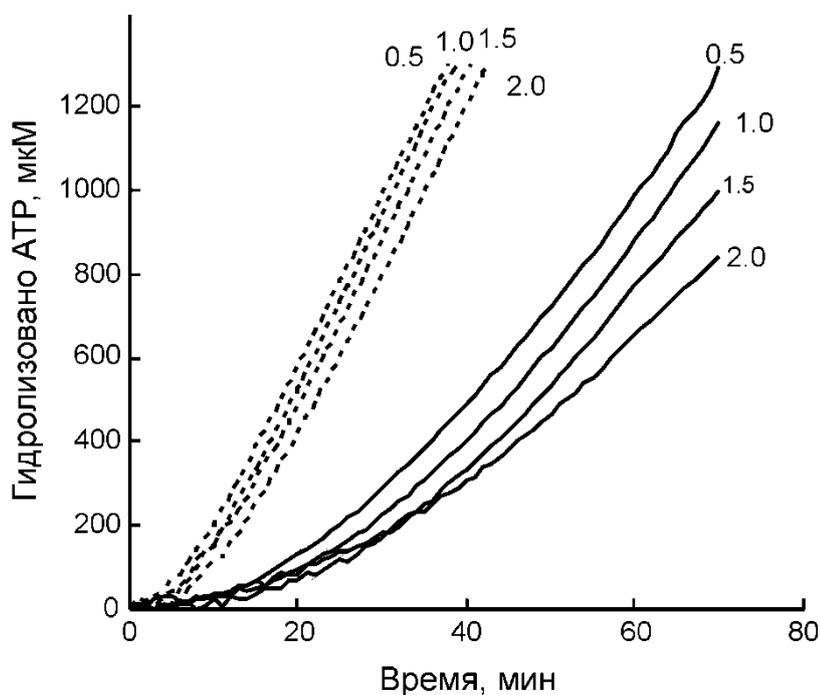


Рисунок 21. Вытеснение белка SSB белком RecA в отсутствие RecX.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 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.

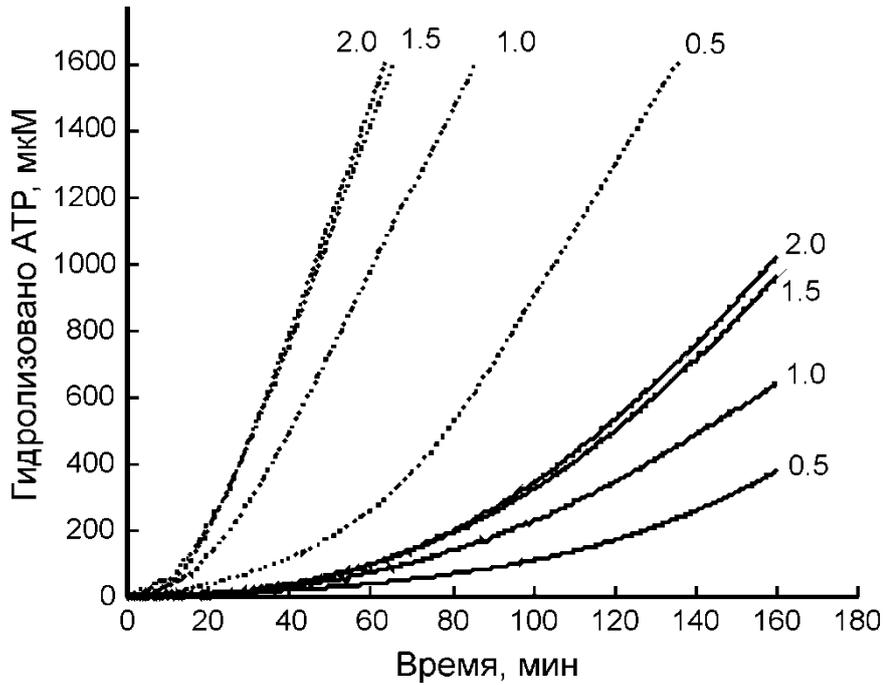


Рисунок 22. Кинетика смещения белка SSB с оцДНК белками ResA и ResA D112R в присутствии ResX.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ оцДНК M13, 3 мкМ ResA_{Ec} или ResA_{D112R}, 75 нМ ResX и указанная на рисунке концентрация белка SSB (мкМ). Кольцевую оцДНК преинкубировали с указанным белком ResX 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 ResA. Гидролиз АТФ белком ResA_{Ec} отмечен сплошной линией, ResA_{D112R}- пунктирной линией.

Ранее было продемонстрировано, что ResX взаимодействует с белком ResF *in vitro*. В ходе этого взаимодействия ResX переключается от филамента на белок ResF и таким образом выводится из реакции подавления белка ResA. Однако установить опытным путем подобные межбелковые взаимодействия между ResX и SSB не удалось. Поскольку известно, что SSB не образует межмолекулярных взаимодействий с белком ResA, 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 распространение филаментации на участки ДНК со сложной 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 (рисунок 23). Как следует из фигуры 24, белок RecX ингибирует АТФазную активность в присутствии RPA. 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.

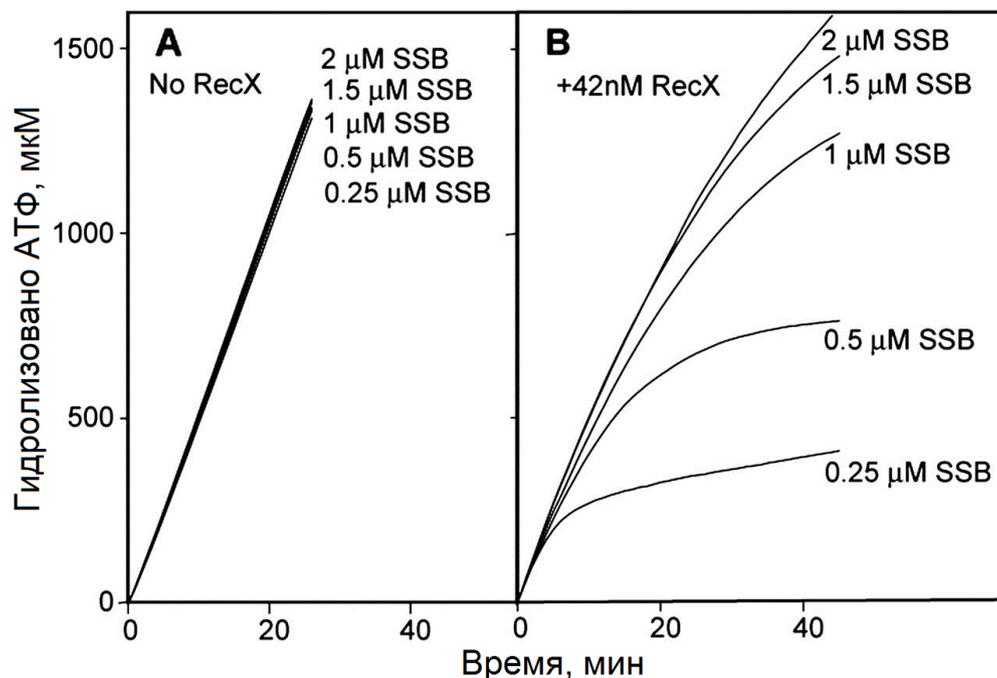


Рисунок 23. Белок SSB антагонист белка RecX.

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 RecAЕс, 42 нМ белка RecX и указанная на рисунке концентрация белка

SSB (мкМ). Кольцевую оцДНК инкубировали с белком ResA дикого типа в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли белок SSB и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 0$ мин в реакционную смесь добавляли белок ResXEc.

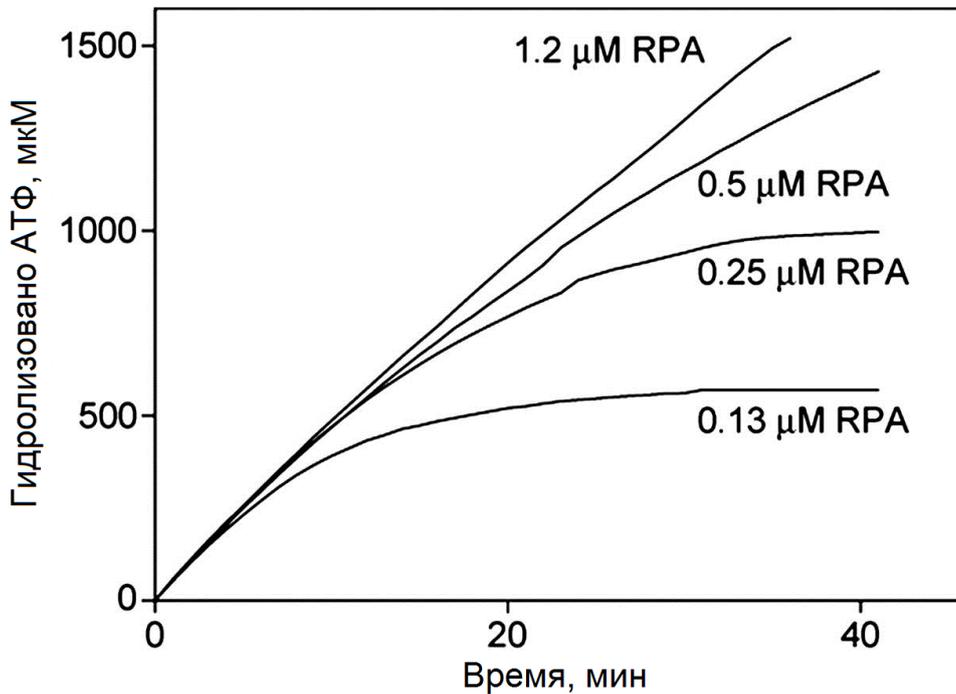


Рисунок 24. Белок RPA антагонист белка ResX.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ оцДНК фага M13, 3 мкМ ResAЕс, 42 нМ белка ResX и указанная на рисунке концентрация белка RPA (мкМ). Кольцевую онДНК инкубировали с белком ResA 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 ResXEc.

В экспериментах указанных выше белок ResX добавлялся в реакционную смесь в момент времени 0 минут, когда одонитевая ДНК была насыщена белком ResA, а АТФазная реакция находилась в устойчивом равновесии. При этом все используемое в реакции количество белка SSB

было добавлено в пробирку изначально. Изменение порядка добавления SSB в реакцию позволяет ответить на вопрос о необратимости происходящих процессов и их динамичности. На рисунке 25 обозначены моменты времени, в которых в реакцию вводилось дополнительное количество белка SSB. Кривые изменения АТФазной активности указывают на то, что процесс филаментации RecA на ДНК обратим, а кинетика восстановления может быть мгновенной. Таким образом, белок RecA, даже будучи выведенным из реакции взаимодействия с ДНК, сохраняет свою активность. Интересно, что белок SSB сохраняет стимулирующую роль для филаментации, а не препятствует нуклеации RecA на ДНК. Данный факт можно объяснить лишь тем, что небольшое количество мономеров всегда остается на ДНК и нуклеация не требуется, в то время как элонгация филамента возобновляется, как известно, почти мгновенно. С другой стороны, дополнительное количество SSB теоретически могло бы выводиться из реакции белком RecX, но их соотношение различается почти на два порядка, а межбелковых взаимодействий между ними было не найдено.

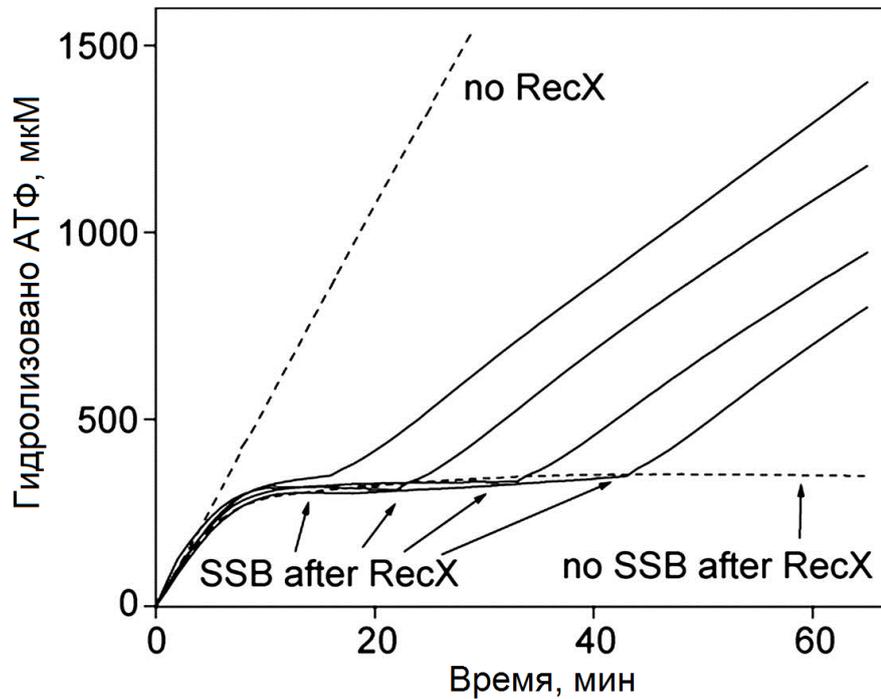


Рисунок 25. Восстановление оцДНК АТФазной активности белка *RecA* белком *SSB* после белка *RecX*.

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, 42 нМ белка *RecX* и 2 мкМ белка *SSB*. Кольцевую оцДНК инкубировали с белком *RecA* дикого типа в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 0.5 мкМ белка *SSB* и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 0$ мин в реакционную смесь добавляли белок *RecX*Ec. После полного ингибирования АТФазы через разные промежутки времени добавляли дополнительное количество белка *SSB* (2 мкМ).

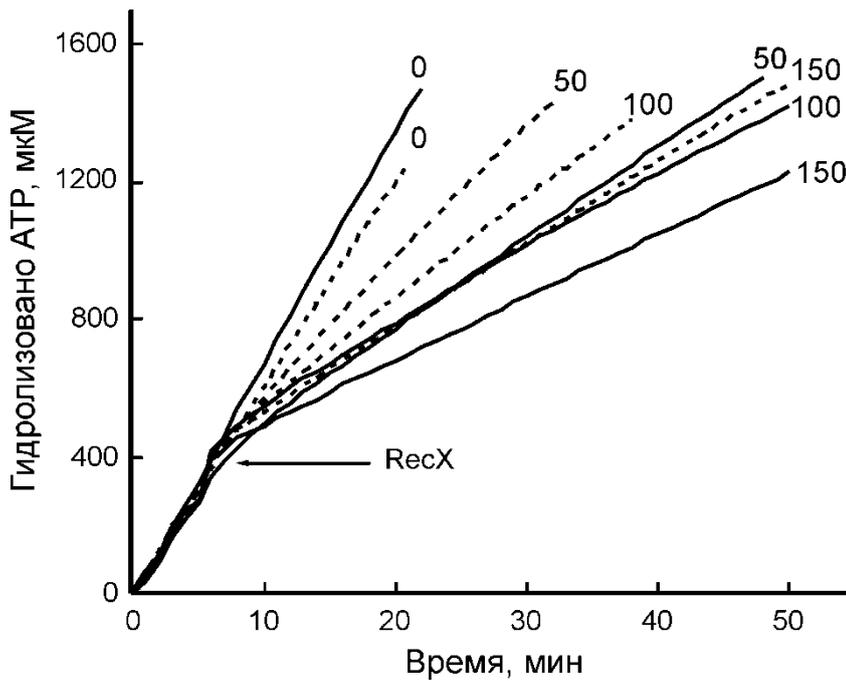


Рисунок 26. Влияние белка *RecX* на АТФазную активность *RecA* на поли(дТ).

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ поли(дТ), 3 мкМ *RecA* Ec или *RecA* D112R и указанная на рисунке концентрация белка *RecX* (нМ). Реакция инициировалась добавлением указанного количества *RecA* в смесь, содержащую поли(дТ). В момент времени $t = 7$ минут в реакционную смесь добавляли белок *RecX*. Гидролиз АТФ белком *RecA* Ec отмечен сплошной линией, *RecA* D112R- пунктирной линией.

Белок *RecA* может активно взаимодействовать с оцДНК, лишенной сложной вторичной структуры и шпилек (например, поли(дТ)), без помощи SSB. При этом белок SSB не только не стимулирует поли(дТ)-зависимую АТФазу, но и более того - вытесняет *RecA* с 5'-конца любой линейной молекулы оцДНК, замещая освободившиеся в ходе разборки филамента участки ДНК (Madiraju et al., 1992). Использование поли(дТ), лишенной сложной вторичной структуры, позволило вовлечь в реакцию *RecA* и *RecX* в отсутствие SSB. Добавление *RecX* в реакционную смесь с поли(дТ) приводит к одномоментному резкому снижению скорости гидролиза до некоторого

конечного значения, чего не наблюдается в экспериментах с оцДНК фага M13. В отличие от кольцевой онДНК фага M13, чья длина составляет около 7000 оснований, средняя длина поли(дТ) – 226 оснований. Белок RecA, предположительно, образует на поли(дТ) более короткие филаменты, которые, соответственно, характеризуются меньшим временем разборки в сравнении с филаментами, образующимися на оцДНК фага M13. Вместе с тем отсутствие в реакции белка SSB делает процесс разборки филамента менее сложным. Несмотря на то, что различие между диким типом и вариантом RecA оказалось не слишком большим, RecAD112R показал достоверно бóльшую устойчивость к RecX (Рисунок 26). Таким образом, в основе устойчивости филамента RecAD112R к действию белка RecX лежат его собственные биохимические свойства, а не опосредованный белком SSB механизм. При этом данное наблюдение не противоречит тому, что одновременно могут присутствовать оба механизма. Нельзя исключить, что специфические конкурентные взаимодействия RecAD112R с белком SSB не накладывают дополнительные ограничения на эффективность белка RecX. Однако количественная оценка этого эффекта осталась за рамками проекта. Тем не менее, причину повышенной устойчивости мутантного белка необходимо искать непосредственно в особенностях его взаимодействия с RecX. Изменение межбелковых взаимодействий между аминокислотной заменой в положении 112 белка RecA и белком RecX теоретически наверно могло бы быть такой первопричиной.

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

Воспроизведение структуры комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX (рисунок 27) с использованием методов молекулярного моделирования и докинга позволило нам определить положение замены 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 RecAD112R 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 комплексе RecX-ДНК взаимодействий выводит модель механизма ингибирования на новый уровень. Однако так как замена 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.

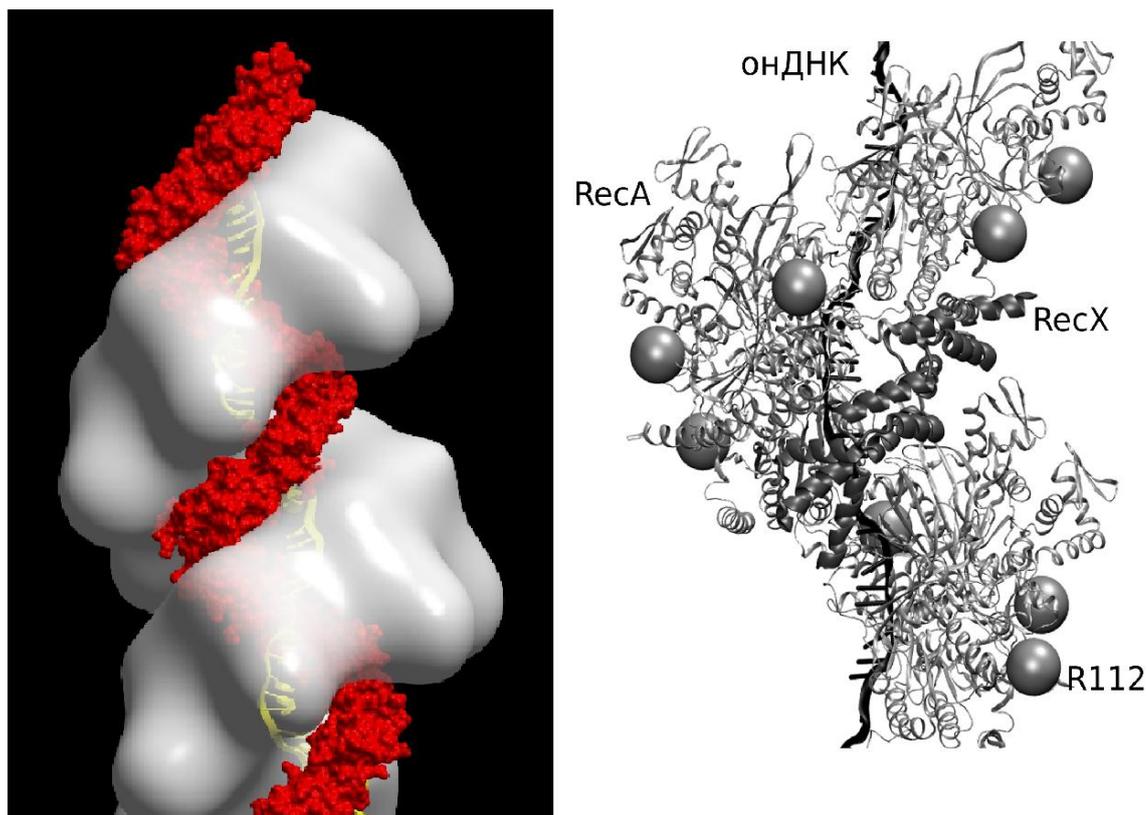


Рисунок 27. Модель комплекса *RecA::oДНК::RecX*.

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

3.3.4. Комплементация белков *RecXD.rad* и *RecXE.c in vitro* и *in vivo*

Система ответа на повреждение ДНК в *Deinococcus radiodurans* значительно отличается от *E.coli*. Тем не менее, было показано, что белок RecX в бактерии *D.radiodurans* репрессирует радиоустойчивость *in vivo* и

ингибирует активность белка RecAD.r *in vitro*. Несмотря на схожесть в функциях, RecX из *D. radiodurans* отличается по составу и несет дополнительные 45 аминокислот на N-конце белка в отличие от белка из *E. coli*. Представляется существенным выяснить, к каким последствиям приведет экспрессия гена *recXD.r* в *E. coli* в отсутствие гена *recXE.c.*. Результат исследования поможет ответить на вопрос, насколько консервативно RecA-RecX взаимодействие и в какой степени белок RecXD.r будет вовлечен во взаимодействие с другими компонентами SOS-системы репарации *E. coli*.

Присутствие хромосомного гена *recX* в *E. coli* несколько увеличивает выживаемость при УФ облучении. Этот результат хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными (Stohl et al., 2003). Вместе с тем в той же работе показано, что гиперэкспрессия белка с плазмиды приводит к сильной супрессии выживаемости. Причина, по которой белок RecX имеет такой двойственный эффект на выживаемость, не определена. Предположительно небольшие концентрации RecX требуются для восстановления репликации в условиях, когда репликативная вилка заблокирована избытком RecA. С целью изучения влияния RecXD.r на RecAE.c *in vivo* мы оценили выживаемость клеток *E. coli*, несущих плазмиду с *recXD.r* либо *recXE.c.* в штамме с делецией хромосомного *recX*. Добавление индуктора IPTG перед облучением обеспечивает необходимое количество белка. Сама по себе суперпродукция RecX не сказывается на выживаемости клеток в условиях без облучения. Как ожидалось, гиперэкспрессия RecXE.c перед облучением приводит к падению выживаемости. Дозовая кривая выживаемости, полученная в опытах представлена на рисунке 28. Во всех случаях ген *recA* находится на хромосоме под собственным промотором, что подразумевает скоординированную экспрессию всех генов SOS-ответа. Гиперэкспрессия гена *recXD.r* приводит к сопоставимому по глубине падению выживаемости относительно *recXE.c.*

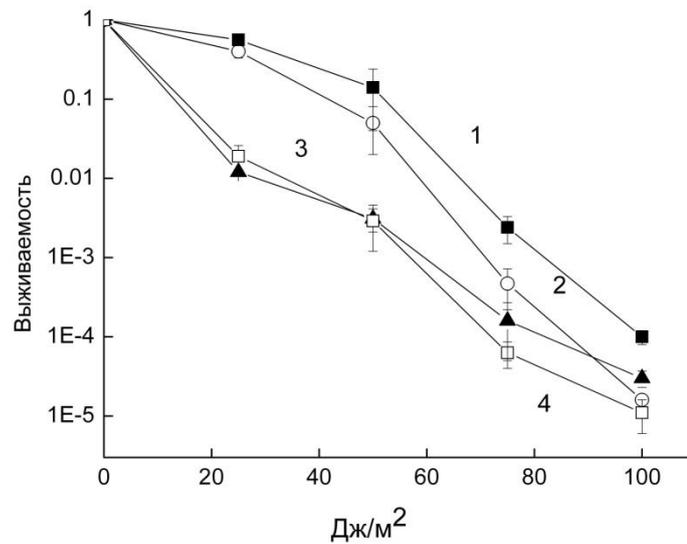


Рисунок 28. Изменение выживаемости клеток в зависимости от дозы УФ-излучения. Клетки *E. coli*, несущие плазмиды с геном *resX* или в его отсутствие, выращивали в среде LB до OD_{600} , равной 0.4–0.6, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.3 мМ и растили в течение еще 1.5 ч для индукции синтеза белка *ResX*. Контрольные клетки *E. coli* также выращивали в среде LB. Клетки, после достижения OD_{600} , равной 0.7–0.9, осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в исходном объеме солевой среды (NaCl 0.9%). УФ облучение ($\lambda=254$) проводили в чашках Петри на приборе “Хроматоскоп” при мощности дозы 100 мДж/м²/с, отбирая аликвоты культуры объемом 0.1 мл через равные временные интервалы (20 с). Облученные клетки разбавляли солевой средой, рассеивали на LB_агар и через 24 ч подсчитывали число колоний. УФ облучение клеток, их разведение, рассев и выращивание проводили при освещении красным светом для избегания фотореактивации. Кривая под номером 1: штамм с делецией гена *resX* на хромосоме и без экспрессионной плазмиды. Кривая номер 2: штамм с геном *resX* на хромосоме, но в отсутствие экспрессионной плазмиды. Кривая номер 3: штамм с делецией гена *resX* на хромосоме, но в присутствие экспрессионной плазмиды,

несущей ген *recXDr*. Кривая номер 4: штамм с делецией гена *recX* на хромосоме, но в присутствие экспрессионной плазмиды, несущей ген *recXEс*.

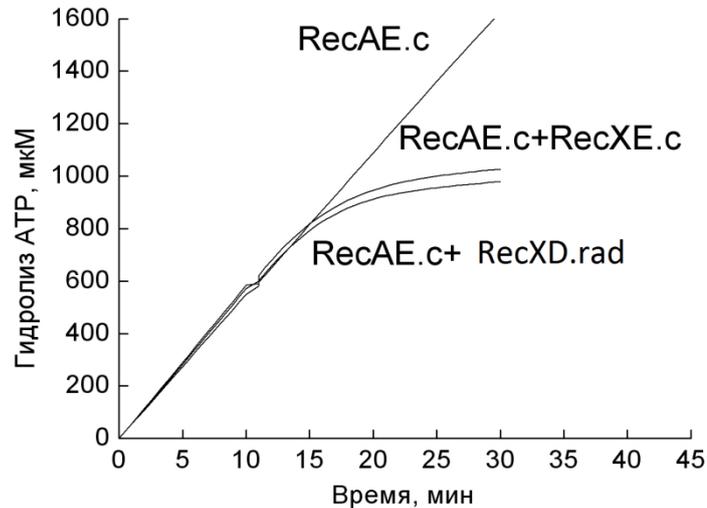


Рисунок 29. Ингибирование оцДНК-зависимой АТФазы белка *RecAЕс* после добавления *RecXЕс* либо *RecXDr*

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 М13, 3 мкМ *RecAЕс*, 0.5 мкМ белка *SSB*. Концентрация белка *RecX* 80 нМ. Кольцевую оцДНК инкубировали с белком *RecAЕс* в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 0.5 мкМ белка *SSB* и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 10$ мин в реакционную смесь добавляли белок *RecXЕс* либо *RecXDr*.

Мы проверили способность *RecXDr* напрямую ингибировать *RecAЕс* по изменению ДНК зависимой АТФазы. Количество белка *RecA*, находящегося в состоянии филамента на оцДНК, обычно оценивают по скорости гидролиза АТФ. Соответственно, изменение скорости гидролиза АТФ отражает не только количество *RecA*, которое перешло в свободное или, наоборот, связанное состояние, но и количество оцДНК в филаменте. Белок *SSB* добавляли из расчета 1 субъединица на 10 н. оцДНК, что

достаточно для расплетания всей вторичной структуры оцДНК и соответствует условиям, принятым в подобных опытах. Скорость гидролиза АТР белком RecA снижается либо падает до нуля после добавления RecX, что свидетельствует о полной диссоциации RecA из комплекса с ДНК (рисунок 29,30). Время добавления белков RecX на графике соответствует 10 минутам начала реакции. На рисунке видно, что гидролитическая активность RecA_{Ec} меняется в течение нескольких минут после добавления белка RecX_{D.r.} В эксперименте сопоставлялись кривые ингибирования четырех возможных комбинаций белков RecA_{Ec}-RecX_{Ec}, RecA_{Ec}-RecX_{Dr}, RecA_{Dr}-RecX_{Ec}, RecA_{Dr}-RecX_{Dr}. Таким образом, сравнивали возможности каждого из белков RecX ингибировать не только собственный, но и чужеродный RecA. Во всех сравниваемых случаях время ингибирования для обоих RecX было сопоставимо. Это означает, что каждый из белков одинаково эффективно может встраиваться в филамент, образуя межбелковые взаимодействия с каждым из RecA. Вместе с тем RecA_{Dr} подвержен ингибированию сильнее, чем RecA_{Ec}. Это различие, по всей видимости, отражает разницу в динамике филаментирования на ДНК между обоими RecA.

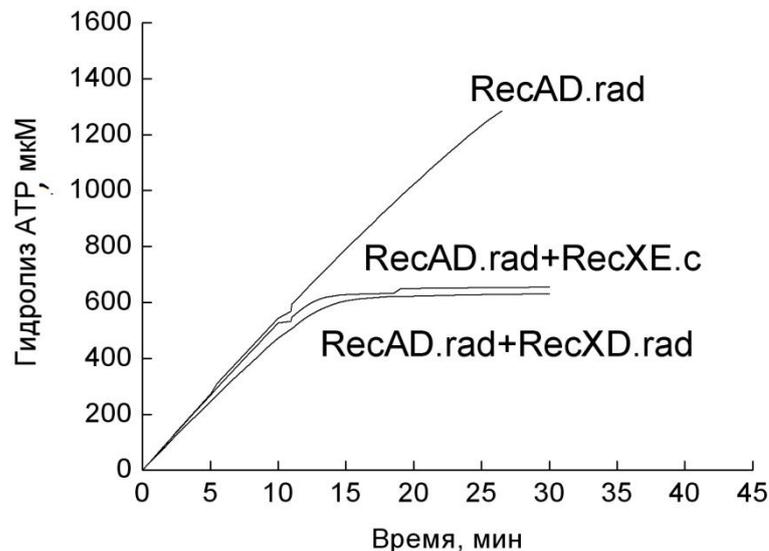


Рисунок 30. Ингибирование оцДНК-зависимой АТФазы белка *RecADr* после добавления *RecXEc* либо *RecXDr*.

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 *RecADr*, 0.5 мкМ белка *SSB*. Концентрация белка *RecX* 80 нМ. Кольцевую оцДНК инкубировали с белком *RecADr* в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 0.5 мкМ белка *SSB* и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 10$ мин в реакционную смесь добавляли белок *RecXEc* либо *RecXDr*.

Полученные экспериментальные данные подтвердили высокую консервативность системы регуляции *RecA*-зависимой рекомбинации белком *RecX*. Фенотипические проявления репрессорной функции *RecXEc* и *RecXDr* имеют высокую степень идентичности. По всей видимости, воздействие других белков SOS-ответа на данную систему регуляции крайне ограничено. С другой стороны, в условиях гиперэкспрессии *RecX* относительное концентрационное соотношение других регуляторных белков в клетке возможно столь низкое, что не является существенным для конечного эффекта. Либо следует предположить, что те регуляторные белки *D. radiodurans*, которые могут быть потенциально задействованы в регуляции *RecA*-*RecX* взаимодействий, обладают подобной функциональной выраженностью, что и белки *E. coli*.

3.3.5. Исследование ДНК-*RecADr* комплекса с помощью одномолекулярной техники

Причина, по которой белок *RecADr* подвержен ингибированию белками *RecX* сильнее, чем *RecAEc* может отражать разницу в динамике филаментирования на ДНК между обоими белками *RecA* либо разницу в силе межбелковых *RecA*-*RecX* взаимодействий. Динамику мультимеризации рекомбиназ сравнили с помощью одномолекулярной техники.

Результаты экспериментов выявили значительные отличия в процессах взаимодействия RecADr и RecAEc с ДНК (рис.31). Временные зависимости увеличения длины ДНК при построении филаментов носят нелинейный характер в случае обоих белков, что свидетельствует об образовании множественных точек нуклеации в процессе формирования филаментов. Однако для выхода кривой связывания RecADr с ДНК потребовался значительно меньший промежуток времени по сравнению с RecAEc. В случае RecADr увеличение длины ДНК на 25% произошло в пять раз быстрее, а увеличение длины ДНК достигло максимального значения в 1,5 раза быстрее, нежели в случае RecAEc. Кроме того, величина окончательного удлинения ДНК в случае RecADr оказалось воспроизводимо меньшей по сравнению с RecAEc - соответственно $45,8 \pm 0,5\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) для RecADr и $48,3 \pm 1,5\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение).

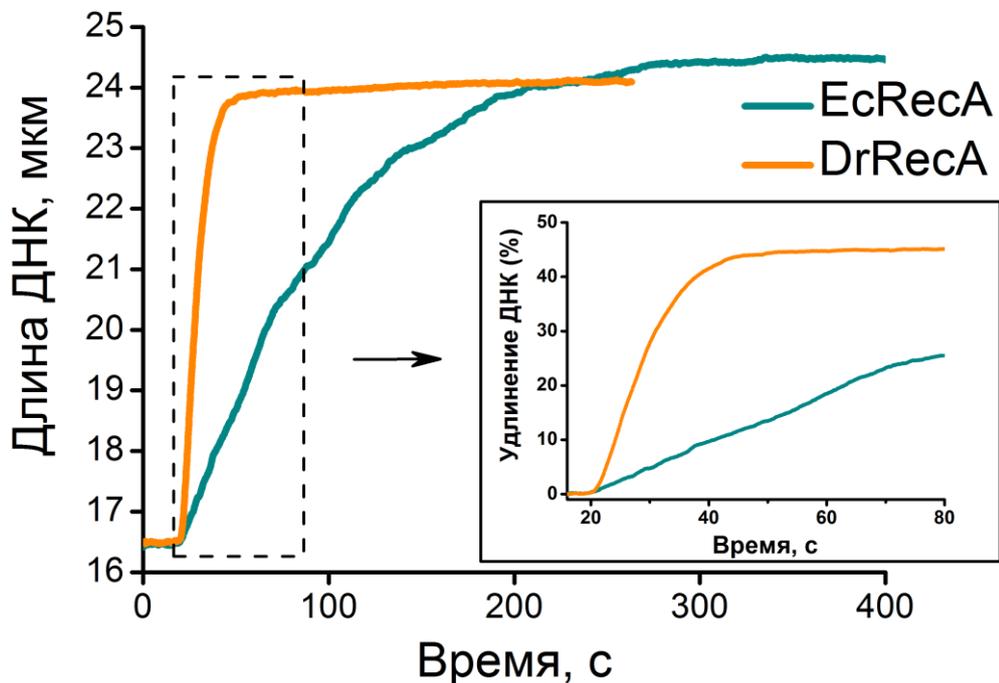


Рисунок 31. Динамика увеличения длины ДНК за счет формирования филаментов RecAEc и RecADr в идентичных условиях. Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, глицерин 10%. В первых трех каналах осуществляли прикрепление

молекулы ДНК к двум микросферам. Затем в третьем канале ДНК растягивали с силой 40 pN и переносили в четвертый канал, где при постоянной силе растяжения ДНК наблюдалось увеличение ее длины при взаимодействии с RecA. Негидролизуемый аналог АТФ АТФγS использовали с целью предотвращения диссоциации RecA от ДНК.

Меньшее значение увеличения длины ДНК при взаимодействии с RecADr теоретически может быть вызвано более компактной структурой филамента RecADr. Кристаллическая структура белка RecADr является наиболее компактной из всех опубликованных рекомбиназных структур. Однако кристаллическая структура в данной работе была получена для филаментов RecADr, сформированных в отсутствие ДНК, в связи с чем, эти результаты не могут однозначно соответствовать структуре филаментов RecA, сформированных на ДНК. Кроме того, электронная микроскопия нуклеопротеиновых комплексов RecADr не выявила данных о более компактной форме филаментов RecADr по сравнению с RecAEc. С другой стороны, причиной меньшего удлинения ДНК, полученного при взаимодействии с белком RecADr, может быть наличие большего числа брешей между отдельными кластерами мономеров. В свою очередь большее число брешей может возникнуть при большом количестве точек нуклеации. Случайные события нуклеации на ДНК с последующим расширением кластеров могут в итоге привести к образованию участков ДНК, размер которых меньше минимально возможного участка ДНК, с которым может связаться RecA. Наименьшей единицей связывания с ДНК является мономер ДНК, который занимает 3 пары оснований. В связи с этим, при случайной множественной нуклеации RecA на ДНК, могут появляться промежутки между соседними филаментами размером в 1 или 2 пары оснований. Для проверки этой гипотезы были проведены контрольные эксперименты по сравнению контурной и персистентной длин ДНК (рисунок 32). Измерение персистентных длин выявило, что нуклеопротеиновые

комплексы образованные RecADr обладают большей гибкостью и меньшей длиной, нежели в случае RecAЕс.

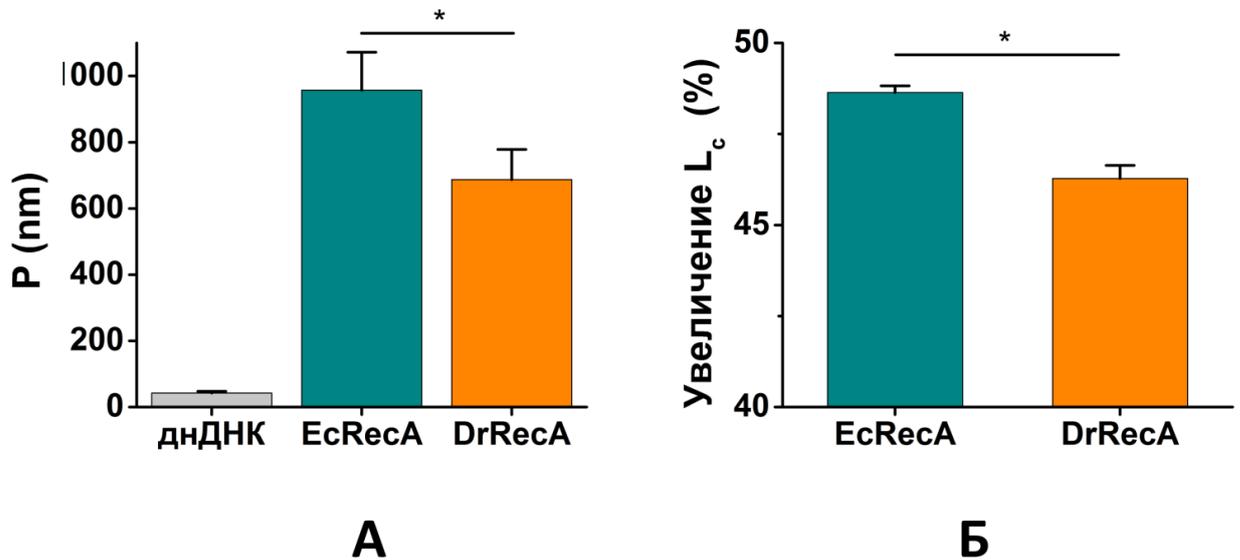


Рисунок 32. Сравнение персистентных и контурных длин ДНК-белковых комплексов RecAЕс и RecADr, полученных при анализе зависимостей длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения. Эксперимент по измерению контурной и персистентной длин двунитовой ДНК проводился в буфере 10 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 10% глицерина. В ходе анализа зависимостей длины ДНК от силы растяжения были получены следующие значения: L_c (контурная длина) = $16,5 \pm 0,1$ мкм и P (персистентная длина) = 43 ± 5 нм (среднее значение \pm стандартное отклонение). Полученные данные находятся в согласии с ожидаемым значением контурной длины ДНК бактериофага λ (48502 пар оснований $\times 0,34$ нм = $16,49$ мкм). В случае ДНК-белковых комплексов EcRecA полученные значения персистентной длины, $P = 960 \pm 120$ нм, и контурной длины, $L_c = 24,54 \pm 0,03$ мкм. Значение персистентной длины DrRecA-ДНК, $P = 690 \pm 90$ нм. Значение контурной длины комплексов DrRecA-ДНК составило $L_c = 24,15 \pm 0,06$ мкм.

Полученные результаты подтверждают модель, в рамках которой RecADr формирует на ДНК менее продолжительные и более частые

филаменты, что потенциально обеспечивает более быструю RecX-зависимую разборку, которая наблюдалась на графиках ингибирования АТФазной активности.

3.4.1. Молекулярная структура RecX-RecA-ДНК комплекса

В соавторстве с коллективом лаборатории биофизики макромолекул проводилось 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. 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 RecA на временах от наносекунд до десятков наносекунд методом нейтронного спин-эхо. В ходе работ был впервые предложен и экспериментально верифицирован комплекс белка RecX с оцДНК в виде сэндвич подобной структуры.

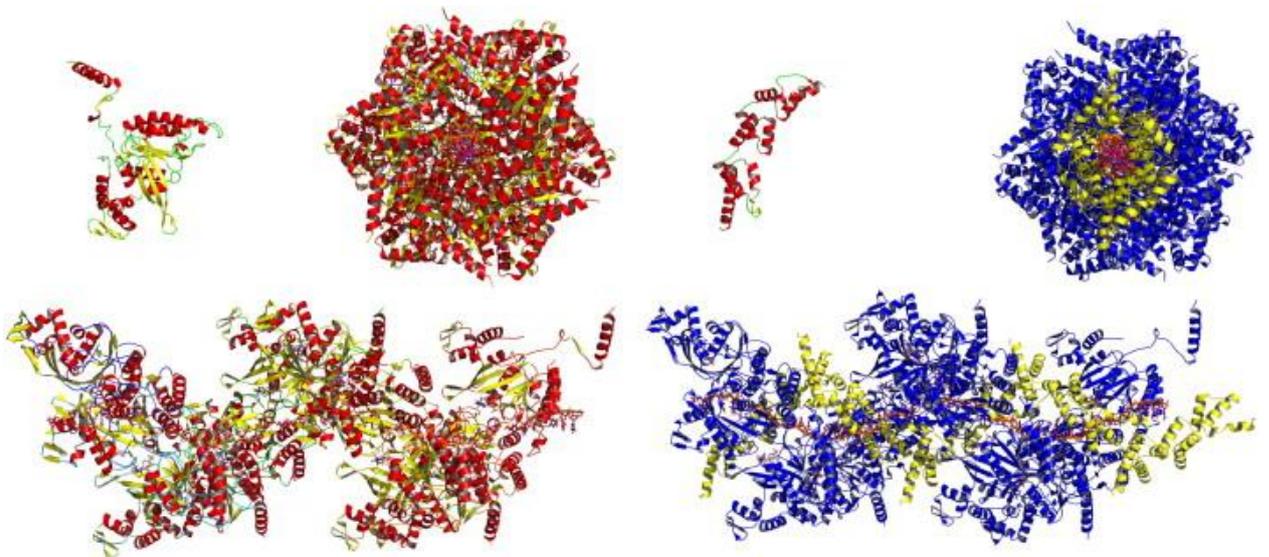


Рисунок 33. Реконструкция полноатомной структуры нуклеопротеинового комплекса в продольной и поперечной проекции.

Слева представлен комплекс RecA-оцДНК, справа RecA-RecX-оцДНК. Белок RecX обозначен желтым цветом, RecA синим, а ДНК красным. Сверху показаны мономеры белков, тогда как нуклеопротеиновый комплекс, представленный в обеих проекциях, включает 5 мономеров RecX 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 33).

3.4.2. Анализ функциональной активности модифицированных α -спиральных участков белка RecX

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. 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.

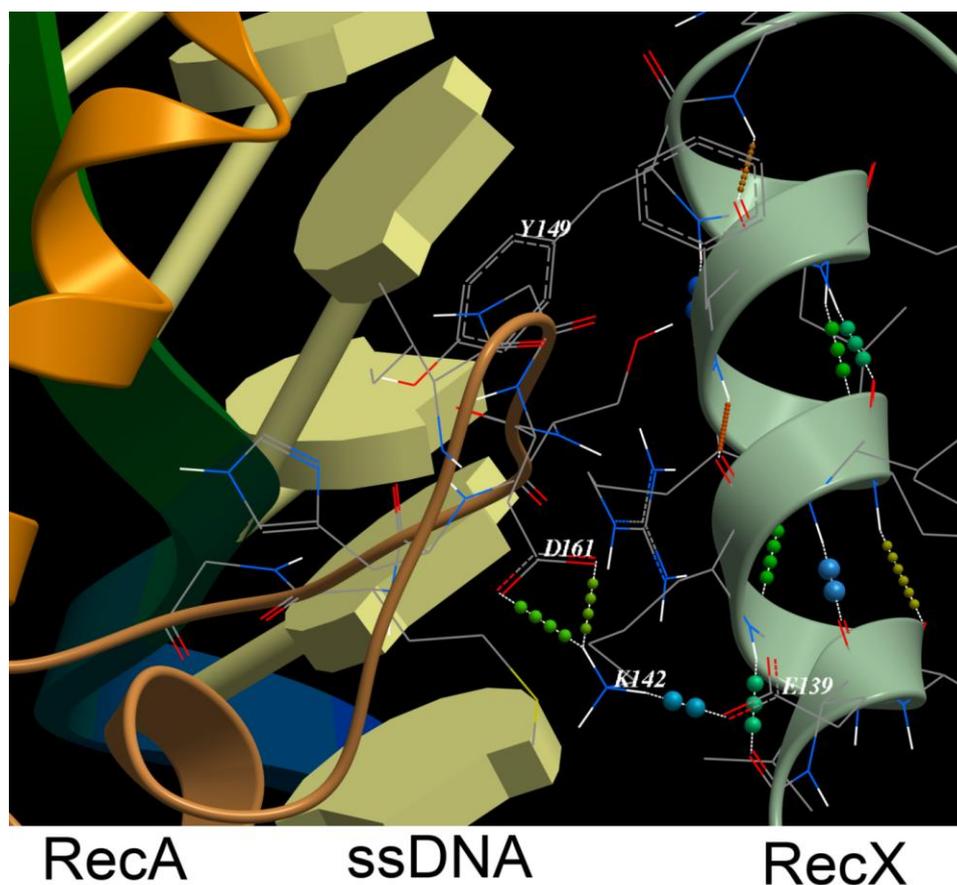


Рисунок 34. Расположение RecA, RecX о оцДНК относительно друг друга.

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 оцДНК (рисунок 34). 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. При этом, остатки E139, K140, V141, K142, I143, R145, L147, L148, Y149 и R150 были зафиксированы в неизменном виде, как и в исходном фрагменте белка RecX. Остальные 8 остатков могли меняться алгоритмом SEQOPT с целью повышения конформационной стабильности структуры.

Таблица 11. Оптимизация аминокислотной последовательности пептида.

#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

В таблице 11 представлены результаты глобальной оптимизации аминокислотной последовательности альфа-спирали из белка RecX. №aa/RecX – номера и имена остатков белка RecX из *E.coli*. 4E1 – аминокислотная последовательность пептида 4E1. Выделением показаны остатки, зафиксированные во время процесса оптимизации. Кроме того 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 11). Эти контрольные пептиды тестировались во всех последующих экспериментах одновременно с пептидом 4E1.

Количество белка RecA, находящегося в состоянии филамента на оцДНК, обычно оценивают по скорости гидролиза АТР. Соответственно, изменение скорости гидролиза АТР отражает не только количество RecA, которое перешло в свободное или, наоборот, связанное состояние, но и количество оцДНК в филаменте. Поэтому количественная оценка активности

пептидов анализировалась по способности ингибировать АТФазу. В АТФазной реакции специально использовали молекулы поли-дТ, чтобы избежать артефактов с природной ДНК, которая имеет сложную вторичную структуру. Кроме того, использование поли(дТ) устраняет необходимость в присутствии белка SSB, который, как было показано ранее, является антагонистом белка RecX и, следовательно, может затруднить количественное сравнение анализируемых пептидов и белка RecX. Как показано на рисунке 35, при отсутствии каких-либо ингибиторов количество гидролизованного АТФ, увеличивается пропорционально времени реакции. Добавление белка RecX (Рис. 35) или пептида 4E1 в реакцию приводит к одномоментному снижению скорости гидролиза АТФ. Пептид 4E1 является менее эффективным ингибитором, чем белка RecX примерно в 10-20 раз, при использовании эквимольной концентрации. Однако, в отличие от белка RecX, который взаимодействует с тремя мономерами, 4E1 пептид взаимодействует только с одним. Таким образом, эффективная разница между белком и пептидом по сути меньше чем в ~10 раз.

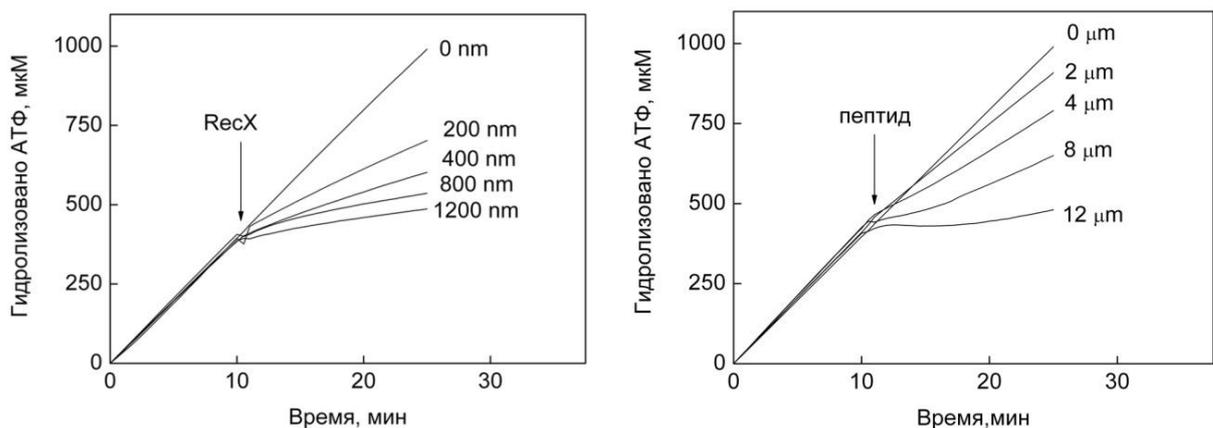


Рисунок 35. Сравнительное влияние белка RecX и пептида 4E1 на поли(дТ) зависимую АТФазную активность RecA.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 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.

Вместе с тем такая прямая экстраполяция является довольно умозрительной. Остается неизвестным, какого рода контакты устанавливаются между двумя другими мономерами RecA и теми спиралью белка RecX, которые образуют с ними межбелковые взаимодействия. Оставшиеся контакты потенциально могут обладать как большим значением, так и меньшим. Кроме того, выявлена способность пептида ингибировать АТФазную активность белка RecA из *Pseudomonas aeruginosa* и *Deinococcus radiodurans* (Рисунок 36). Этот результат хорошо согласуется с предыдущим наблюдением о том, что белки RecXEc и RecXDr способны комплементировать друг друга *in vivo* и *in vitro*.

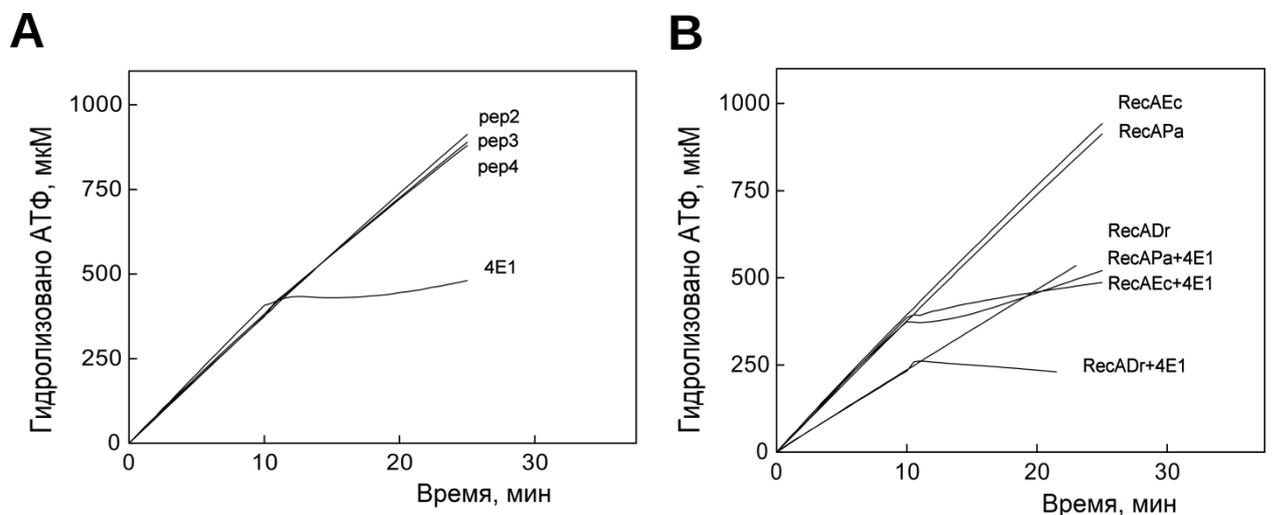


Рисунок 36. Влияние пептида 4E1 на поли(дТ) зависимую АТФазную активность RecA.

А. Действие пептида 4E1 в сравнении с пептидами pep2, pep3, pep4. **В.** Сравнительное ингибирование пептидом белков RecA из *E.coli* (RecAEc), RecA из *P.aeruginosa* (RecAPa) и RecA из *D.radiodurans* (RecADr). В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ поли(дТ), 3 мкМ RecAEc.

Концентрация пептидов 4 мкМ. Реакция инициировалась добавлением указанного количества ResA в смесь, содержащую поли(дТ). В момент времени $t = 10$ минут в реакционную смесь добавляли один из пептидов.

Ингибирующие свойства активного пептида подтверждали с помощью одномолекулярной техники. На рисунке 37 представлена полученная экспериментальная зависимость изменения длины молекулы ДНК в присутствии ResA, до и после добавления пептида 4E1 с оптимизированной аминокислотной последовательностью. Так как связывание ResA приводит к увеличению длины ДНК на величину порядка 50% по сравнению с В-формой спирали, в ходе построения филаментов ResA на ДНК происходит постепенное увеличение ее длины. Соответственно, диссоциация ResA приводит к сокращению растянутой ДНК до исходной длины. Таким образом, наблюдение за длиной молекулы ДНК при постоянно приложенной силе позволяет отслеживать динамику построения и разборки филаментов ResA.

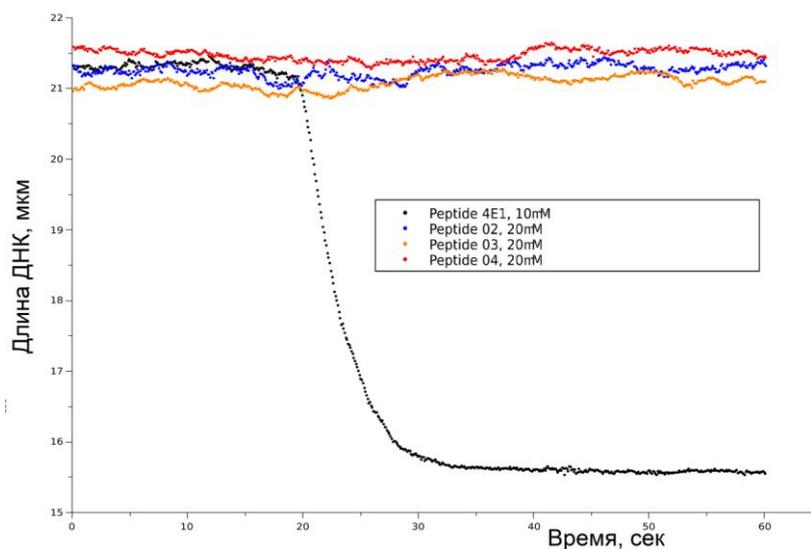


Рисунок 37. Динамика изменения длины ДНК при формировании филаментов ResA и последующей разборки филаментов в результате добавления пептида 4E1 с оптимизированной аминокислотной последовательностью.

Формирование филаментов ResA приводит к увеличению длины ДНК.

Добавление в реакцию пептида 4E1 на 490 секунде стимулирует разборку филаментов ResA, что отражается в уменьшении длины ДНК. В работе была использована ДНК бактериофага λ , длина которой составляет порядка 16 мкм (48502 пары оснований). ДНК помещали в раствор, содержащий Tris-HCl 10 мМ, MgCl₂ 1 мМ, ResA 1 мкМ и АТФ 1 мМ, в результате чего, при приложении силы растяжения в 20 пН, наблюдалось увеличение длины ДНК, что соответствует связыванию ResA с ДНК. На 490-й секунде в реакцию был добавлен пептид 4E1 с оптимизированной аминокислотной последовательностью в концентрации 10 мкМ.

В присутствии пептида 4E1 рост филаментов ResA прекращался. При этом наблюдалось постепенное уменьшение длины ДНК до исходной длины, что свидетельствует о том, что исследуемый пептид 4E1 препятствует связыванию ResA с ДНК и стимулирует диссоциацию ResA от ДНК. Данное наблюдение указывает на то, что полученный пептид 4E1 способен ингибировать активность ResA на стадии формирования пресинаптического комплекса, препятствуя связыванию ResA с ДНК.

Активность пептида 4E1 выявлена в реакции обмена нитей ДНК. Аликвоты реакции отбирались через указанные промежутки времени и анализировались на агарозном геле. В отсутствие ингибитора, белок ResA переводит исходные субстраты реакции в линейную одноцепочечную ДНК и кольцевую никированную ДНК. Добавление в реакцию пептида 4E1 одновременно с двуцепочечной ДНК приводит к остановке мигрирующей ветви ДНК. Однако образование объединенных молекул ДНК происходит раньше, чем пептид разбирает филамент. Подобное наблюдение аналогично результатам полученным в присутствии ResX и видимо отражает кинетическое предпочтение для взаимодействия пресинаптического комплекса с дцДНК. Однако, если пептид добавляется в реакцию за 5 минут до дцДНК, то образования объединенных молекул не образуется совсем. В

этом случае, все исходные субстраты ДНК остаются неизменными с течением времени (Рисунок 38).

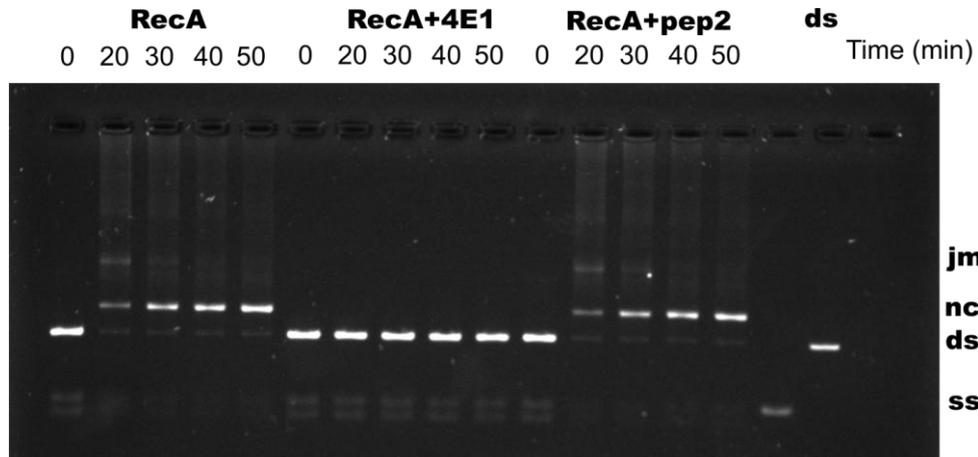


Рисунок 38. Ингибирование реакции обмена гомологичных нитей ДНК в ходе добавления пептида 4E1.

В состав реакционной смеси входили: 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ онДНК фага M13, 3 мкМ RecA_{Ec}, 0.5 мкМ белка SSB и 4 мкМ пептида 4E1 либо пептида 2. Кольцевую онДНК инкубировали с белком RecA дикого типа в течение 5 минут. Затем в реакционную смесь добавляли 0.5 мкМ белка SSB, один из пептидов и инкубировали в течение еще 5 минут. В момент времени $t = 0$ мин в реакционную смесь добавляли 10 мкМ днДНК фага M13. Аликвоты отбирались в указанные моменты времени и реакция останавливалась во льду с помощью протеиназы K и 0.9% SDS. Продукты реакции разделялись на 1% агарозном геле и визуализировались с помощью бромистого этидия.

Эффективность ингибирования в большой мере зависит от времени добавления пептидного ингибитора в реакцию. Действительно, если активный пептид добавляется за 5 минут до днДНК, то сцепленных молекул не образуется. Однако чтобы доказать, что ингибирование пептидом проходит специфически по сайту взаимодействия белка RecX с бороздкой филамента был проведен эксперимент по конкурентному связыванию (рисунок 39). 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.

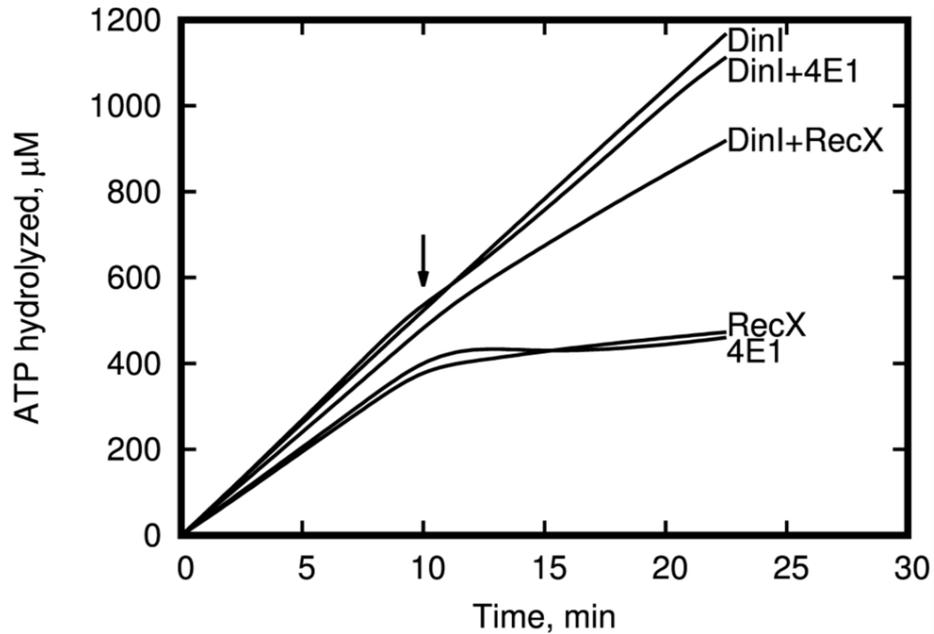


Рисунок 39. Антагонистическое влияние белка DinI на ингибирующий эффект белка RecX либо пептида 4E1.

В состав реакционной смеси входили: 25 mM трис-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 2 mM АТФ, АТФ-регенерирующая система, 5 мкМ поли(δТ), 3 мкМ RecAЕс, 5 мкМ белка DinI, 1.2 мкМ белка RecX или 12 мкМ пептида 4E1. Реакция инициировалась добавлением указанного количества RecA и DinI в смесь, содержащую поли(δТ). В момент времени $t = 10$ минут в реакционную смесь добавляли белок RecX либо пептид.

Данные указанные выше свидетельствуют о том, что 4E1 пептид специфически ингибирует рекомбиназную активность в пробирке. 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. Конечно, максимальный эффект снижения выживаемости наблюдается при делеции гена *recA* ($\Delta recA$). Однако, на рисунке 40 показано, что кривая выживаемости для клеток, несущих ген пептида 4E1, аналогична кривой выживаемости клеток, в которых экспрессируется белок RecX. Степень пептидного ингибирования *in vivo* такая же, как в эксперименте с белком RecX. Ранее было показано, что в зависимости от количества экспрессируемого RecX может наблюдаться либо увеличение выживаемости бактериальных клеток либо наоборот уменьшение выживаемости. Небольшое увеличение наблюдается при экспрессии с хромосомы, но гиперэкспрессия с плазмиды приводит к падению выживаемости на 2 - 2,5 порядка после воздействия ультрафиолетового облучения (Stohl et al., 2003). Данный феномен до настоящего времени остается необъясненным. Стимулирующий эффект RecX не был найден в экспериментах по конъюгационной рекомбинации. Хотя возможно, что способность белка RecX восстанавливать рост бактерий, благодаря освобождению репликативной вилки от избытка рекомбиназы, играет сходную роль в устойчивости к УФ облучению. С другой стороны влияние экспрессии RecX на мутагенез еще никем не исследовалось. Если допустить, что RecX ингибируя рекомбинационный процесс, переключает рекомбинационную репарацию на репарацию обусловленную мутагенезом, то повышенную выживаемость можно объяснить увеличением количества мутантов. Действительно поскольку полимеразы PolV функционируют лишь с отдельным мономером, а белок UmuD перекрывает доступ к большой бороздке филамента, то такой сценарий имеет право на существование. Однако количество RecX в клетке должно быть дозировано, чтобы его экспрессия не сказывалась на уровне SOS ответа. Функция пептида 4E1 исследовалась не только в условиях его гиперэкспрессии, но и при гипоэкспрессии, когда концентрация индуктора ИПТГ не превышала 75 мкМ.

Эксперимент по УФ выживаемости показал, что пептид сохраняет стабильность внутри клетки и взаимодействуют с филамент с высокой эффективностью. Хотя эксперимент не показывает степень чувствительности пептида к протеолизу, но его активного количества вполне достаточно для осуществления максимального эффекта.

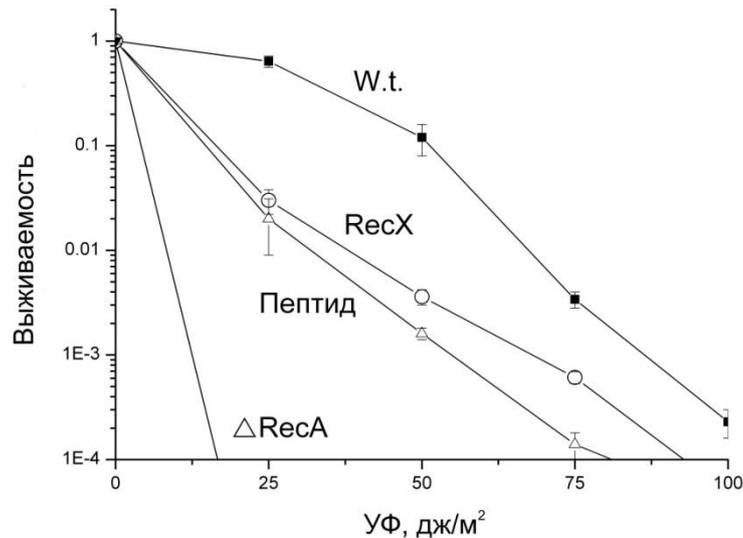


Рисунок 40. Изменение выживаемости клеток в зависимости от дозы УФ-излучения. Клетки *E. coli*, несущие плазмиды с геном *recX* и аминокислотной последовательности пептида, выращивали в среде LB до OD_{600} , равной 0.4–0.6, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.3 мМ и растили в течение еще 1.5 ч для индукции синтеза белка *RecX* либо пептида. Контрольные клетки *E. coli* также выращивали в среде LB. Клетки, после достижения OD_{600} , равной 0.7–0.9, осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в исходном объеме солевой среды (NaCl 0.9%).

Для измерения SOS-ответа в присутствии 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. Экспрессия белков с помощью этого промотора в зависимости от дозы и времени воздействия может увеличиваться до 100 раз (McCool et al., 2004; Cole, 1983).

SOS-ответ вызывали налидиксовой кислотой. В норме при выбранных нами условиях RecA вызывает SOS-ответ примерно до 700 единиц Миллера, увеличивая его более чем в десять раз относительно базовых значений. Однако экспрессия белка RecX либо пептида 4E1 подавляет активность RecA и приводит к ингибированию SOS-ответа почти до базовых значений (рисунок 41). Из этого следует, что пептид 4E1 подавляет SOS-ответ, а вместе с ним и экспрессию всех генов SOS-ответа, включая полимеразу PolV. Полимераза PolV 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.

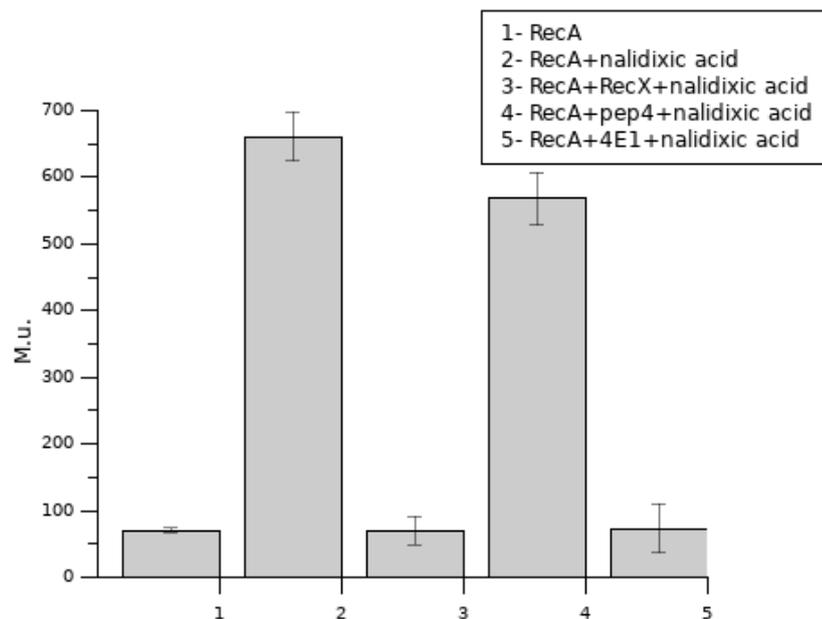


Рисунок 41. Величина SOS-ответа при воздействии на бактериальные клетки налидиксовой кислоты.

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

$\beta\text{-gal} = 1000(OD_{420} / OD_{600}tv)$, где OD_{420} - оптическая плотность реакционной смеси при 420 нм, OD_{600} - оптическая плотность клеточной суспензии в Z-буфере при длине волны 600 нм, t - время инкубации, а v - объем пробы в миллилитрах.

Кроме того, что ингибирование пептидом активности белка RecA влечет подавление SOS-ответа, следует предположить, что и другие RecA-зависимые, но SOS независимые процессы могут подавляться в равной степени. 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). Однако для осуществления ингибиторных функций пептид необходимо доставить в бактерию с помощью активного транспорта. Для этой цели подобраны специальные пептиды, которые должны проникать через мембрану совместно с пептидом 4E1 (Rajarao et al., 2002). Совсем недавно, мы получили результат, свидетельствующий о том, что гибридный пептид сохраняет свою активность *in vitro* (не опубликовано).

Таким образом, для эффективного подавления SOS-ответа достаточна очень небольшая часть белка RecX. Предположительно, наблюдаемая избыточность аминокислотной последовательности в белке необходима для взаимодействия с другими регуляторными белками. Например, ранее было продемонстрировано взаимодействие белка RecX с RecF (Lusetti et al., 2006). С другой стороны, возможно, что роль других альфа спиралей необходима для удержания и стабилизации в филаменте ключевого фрагмента RecX. Если модифицированный пептид взаимодействует с цепью 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. Очевидно, что именно этот факт, в свое время, лег в основу «кэппинг» модели Кокса. Однако, 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. Насколько эта теория точно отражает процесс ингибирования пока сказать невозможно. Нами лишь выделен ключевой фрагмент белка RecX, который запускает реакцию разборки мономеров в месте непосредственного контакта. Исходный выбор α -спирали был продиктован сайтом, где RecX расположен наиболее близко к ДНК. Однако, это безусловно не гарантирует того, что другие α -спиральные петли в структуре RecX, которые расположены дальше от ДНК, также могут играть какую-то роль. 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. Недавно международной научной группой с использованием одномолекулярной техники было показано, что даже небольшое прилагаемое усилие ($\geq 7\text{pN}$) к концам оцДНК приводит утере белком RecX ингибирующих свойств на филамент RecA (Le et al., 2014). Данное наблюдение позволяет предположить, что в основе межбелковой конкуренции за сайты ДНК могут лежать такие свойства белков как изменение физических характеристик ДНК. 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 аминокислотные замены 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 вариантам белка 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 одонитевой 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. Аминокислотная замена D112R приводящая к пятидесятикратному увеличению рекомбиногенности, является примером того, что рекомбинационный потенциал RecA не ограничен лишь

способностью белка филаментировать на однострессовой ДНК. Однако стремительное вырождение гиперрекомбиногенного фенотипа наблюдается в течение всего нескольких десятков генераций. 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 гиперрекомбиногенности 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 рекомбиногенность, изменяя частоту рекомбинационных обменов.
3. Показано, что активность гиперфункциональных вариантов RecA является следствием динамика полимеризации мономеров на ДНК либо увеличению синаптазной активности филамента.
4. Установлено, что гиперрекомбиногенный 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 // *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. Семейство пептидов ингибиторов активности белка RecA, блокирующих SOS ответ у бактерий. // Патент на изобретение. Заявка 2016127595/10(043247), ссылка на реестр 2621862. – 2017.

Тезисы конференций, опубликованные в сборниках.

1. A Shvetsov, D Lebedev, D Baitin, A Radulescu, A Kuklin, V Isaev-Ivanov Structure of Recx complex with the presynaptic RecA filament: molecular dynamics simulations and small angle neutron scattering The Febs Journal 280.1.132
2. A. Yakimov, G. Pobegalov, I. Bakhlanova, M. Khodorkovskii, M. Petukhov, D. Baitin (2016). Peptide-based inhibitor of RecA protein activity. The FEBS Congress 2016 (September 3 – 8, 2016, Ephesus, Turkey). FEBS Journal, 283: P-03.03.2-01
3. A. Yakimov, G. Pobegalov, I. Bakhlanova, M. Khodorkovskii, M. Petukhov, D. Baitin (2016). Peptide-based inhibitor of RecA protein activity. The FEBS Congress 2016 (September 3 – 8, 2016, Ephesus, Turkey). FEBS Journal, 283: P-03.03.2-015

4. A. Yakimov, D. Karelov, O. Kovaleva , M. Khodorkovskii , D. Baitin, M. Petukhov (2016). Role of C-terminal domain dynamics in RecA protein activities. The FEBS Congress 2016 (September 3 – 8, 2016, Ephesus, Turkey). FEBS Journal, 283: P-01.01.1-004
5. Alexander Yakimov, Georgii Pobegalov, Irina Bakhlanova, Mikhail Khodorkovskii, Dmitrii Baitin, Michael Petukhov, Inhibition of RecA Protein Activities By A Conformationally Stable Alpha-Helical Peptide With Optimized Sequence, 11th International Conference on Protein Stabilisation (ProtStab2016), Istanbul Military Museum, Istanbul, Turkey, 9 – 11 May 2016
6. G Pobegalov, A Alekseev, G Cherevatenko, M Khodorkovskii, D Baitin, Single-molecule insights into dissociation of RecA filaments from duplex DNA by RecX, Школа-конференция с международным участием «3rd International School and Conference Saint-Petersburg OPEN 2016», 28 - 30 марта 2016
7. Georgii Pobegalov, Alexandr Alekseev, Anton Sabantsev, Alexey Melnikov, Mikhail Khodorkovskiy, Dmitry Baitin «Real-Time RecA Filament Disassembly in the Presence of RecX Monitored using Single-Molecule Manipulation by Optical Tweezers» Biophysical Journal, Volume 108, Issue 2, Supplement 1, p69a, 27 January 2015 Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, 07-11.02.2015

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams D.E., West S.C. Unwinding of closed circular DNA by the *Escherichia coli* RuvA and RuvB recombination/repair proteins // J. Mol. Biol. – 1995. – V.247. – N.3. – P.404–417.
2. Adelberg E.A., Burns S.M. Genetic variation in the sex factor of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1960. – V.79. – P.321–330.
3. Adzuma K. Stable synapsis of homologous DNA molecules mediated by the *Escherichia coli* RecA protein involves local exchange of DNA strands // Genes. And Develop. –1992. – V.6. – N.9. – P.1679–1694.
4. Adzuma K. No sliding during homology search by RecA protein //Journal of Biological Chemistry. – 1998. – T. 273. – №. 47. – C. 31565–31573.
5. Alam M.K., Alhazmi A., DeCoteau J.F., Luo Y., Geyer C.R. RecA Inhibitors Potentiate Antibiotic Activity and Block Evolution of Antibiotic Resistance // Cell Chem Biol. – 2016. – Vol. 23. – P. 381–391.
6. Alexseyev A. A., Baitin D. M., Kuramitsu S., Ogawa T., Ogawa H., & Lanzov V. A. A recombinational defect in the C-terminal domain of *Escherichia coli* RecA2278-5 protein is compensated by protein binding to ATP // *Molecular microbiology*. –1997. – V. 23-P. –255–265.
7. Amundsen S.K., Smith G.R. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery //Cell. –2003.–V.112. –P. 741–744.
8. Arnold D.A., Kowalczykowski S.C. Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD enzyme // J. Biol. Chem. –2000. –V. 275. –P. 12261–12265.
9. Arenson T.A., Tsodikov O.V. and Cox M.M. Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA // J. Mol. Biol. – 1999. – V.288. – P.391–401.

10. Asai T. and Kogoma T. The RecF pathway of homologous recombination can mediate the initiation of DNA damage-inducible replication of the *Escherichia coli* chromosome // J. Bacteriol. – 1994. – V.176. – P.7113–7114.
11. Bagdasarian M., Bailone A., Angulo J.F., Scholz P., and Devoret R. PsiB, an anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an *Escherichia coli* K-12 recipient // Mol. Microbiol. – 1992. – V.6. – P.885–893.
12. Bagdasarian M., Bailone A., Bagdasarian M.M., Manning P.A., Lurz R., Timmis K.N. and Devoret R. An inhibitor of SOS induction, specified by a plasmid locus in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – V.83. – P.5723–5726.
13. Bailone A., Backman A., Sommer S., Celerier J., Bagdasarian M.M., Bagdasarian M. and Devoret R. PsiB polypeptide prevents activation of RecA protein in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. – 1988. – V.214. – P.389–395.
14. Beernink H.T.H. and Morrical S.W. RMPs: recombination/replication mediator proteins // TIBS. - 1999. – V.24. – P.385–389.
15. Bell J. C., Plank J.L., Dombrowski C.D.,^{1,2,*} and Kowalczykowski S.C. Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA // Nature. – 2012. – T. 491. – №. 7423. – C. 274.
16. Bellio P., Brisdelli F., Perilli M., Sabatini A., Bottoni C., Segatore B., Setacci D., Amicosante G., Celenza G. Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli* // Phytomedicine. – 2014. – Vol. 21. – P. 430–434.
17. Byrne R.T., Chen S.H., Wood E.A., Cabot E.L., Cox M.M. *Escherichia coli* genes and pathways involved in surviving extreme exposure to ionizing radiation // J Bacteriol. – 2014. – V. –196. –P.3534–45.
18. Byrne R., Audrey J., Klingele, Cabot E., Schackwitz W., Martin J., Wang Z., Wood E., Pennacchio C., Pennacchio L., Perna N.,⁴ Battista J., Cox M.M. Evolution of extreme resistance to ionizing radiation via genetic adaptation of DNA repair // Elife. – 2014. – V.3–P.01322.

19. Bianchi M.E. and Radding C.M. Insertions, deletions and mismatches in heteroduplex DNA made by RecA protein // *Cell*. – 1983. – V.35. – P.511–520.
20. Bianco P. and Weinstock G. Characterization of RecA1332 *in vivo* and *in vitro*. A role for alpha-helix E as a liaison between the subunit-subunit interface and the DNA and ATP binding domains of RecA protein // *Genes to Cells*. – 1998. – V.3. – P.79–97.
21. Bianco P.R. and Kowalczykowski S.C. RecA protein // London: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. – 2005.
22. Bidnenko V., Seigneur M., Penel-Colin M., Bouton M.F., Ehrlich S.D. and Michel B. *sbcs sbcC* null mutations allow RecF-mediated repair of arrested replication forks in *rep recBC* mutants // *Mol. Microbiol.* – 1999. – V.33. – P.846–857.
23. Blaho J.A. and Wells R.D. Left-handed Z-DNA and genetic recombination // *Prog. Nucleic Acid Res.* – 1989. – V.37. – P.107–126.
24. Blaho J.A. and Wells R.D. Left-handed Z-DNA binding by the RecA protein of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262. – N.13. – P.6082–6088.
25. Bork J.M., Cox M.M. and Inman R.B. RecA protein filaments disassemble in the 5' to 3' direction of single-stranded DNA // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.45740–45743.
26. Brandsma, J. A., Bosch, D., de Ruyster, M., & van de Putte, P. Analysis of the regulatory region of the *ssb* gene of *Escherichia coli* // *Nucleic acids research*.- 1985. – V 13. –P. 5095–5109.
27. Brendel V., Brocchieri L., Sandler S.J., Clark A.J. and Karlin S. Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms // *J. Mol. Evol.* – 1997. – V.44. – P.528–541.
28. Brenner S.L., Mitchell R.S., Morrical S.W., Neuendorf S.K., Schutte B.C., Cox M.M. RecA protein-promoted ATP hydrolysis occurs throughout RecA nucleoprotein filaments // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.269. – N.9. – P.4011–4016.

29. Bresler S.E., Krivonogov S.V. and Lanzov V.A. Scale of the genetic map and genetic control of recombination after conjugation in *Escherichia coli* K-12 // Mol. Gen. Genet. –1978. – V.166. – P.337–346.
30. Britt R.L., Haruta N., Lusetti S.L., Chitteni-Pattu S., Inman R.B. and Cox M.M. Disassembly of *Escherichia coli* RecA E38K/ Δ C17 nucleoprotein filaments is required to complete DNA strand exchange // J. Biol. Chem. – 2010. – V.285. – P.3211–3226.
31. Bryant F.R., Riddles P.W., Lehman I.R. Studies of the mechanism of DNA pairing by the RecA protein of *Escherichia coli* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1984. – V.49. – P.535–539.
32. Bujalowski W. and Lohman T.M. Limited co-operativity in protein-nucleic acid interactions. A thermodynamic model for the interactions of *Escherichia coli* single strand binding protein with single-stranded nucleic acids in the “beaded”, (SSB)₆₅ mode // J. Mol. Biol. – 1987. – V.195. – P.897–907.
33. 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.
34. Carroll J.D., Minton K.W. Expression of RecA in *Deinococcus radiodurans* // *J. Bacteriol.* –1996. –V.178. –P.130–135.
35. 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.
36. Cazenave C., Toulme J.J. and Helene C. Binding of RecA protein to single-stranded nucleic acids: spectroscopic studies using fluorescent polynucleotides // EMBO J. – 1983. – V.2. – P.2247–2251.
37. 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.
38. 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.
- 39.Churchill J.J., Kowalczykowski S.C. Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme //J. Mol. Biol. –2000. –V. 297. –P.537–542.
- 40.Cirz R.T., Chin J.K., Andes D.R., de Crecy-Lagard V., Craig W.A., Romesberg F.E. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance // PLoS Biol. – 2005. – Vol. 3. – P. e176.
- 41.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.
- 42.Clark A.J. and Sandler S.J. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place // Crit. Rev. Microbiol. – 1994. – V.20. – P.125–142.
- 43.Cline D.J., Holt S.L., Singleton S.F. Inhibition of *Escherichia coli* RecA by rationally redesigned N-terminal helix // Org Biomol Chem. – 2007. – Vol. 5. – P. 1525–1528.
- 44.Courcelle J., Carswell-Crumpton C., and Hanawalt P. *recF* and *recR* are required for the resumption of replication at DNA replication forks in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V.94. – P.3714–3719.
- 45.Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P.O. and Hanawalt P.C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli* // Genetics. – 2001. – V.158. – P.41–64.
- 46.Cox M.M. Motoring along with the bacterial RecA protein. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. –2007. –V. 8. –P.127–138.
- 47.Cox J.M., Abbott S.N., Chitteni-Pattu S., Inman R.B. and Cox M.M. Complementation of one RecA protein point mutation by another. Evidence for trans catalysis of ATP hydrolysis // J. Biol. Chem. – 2006. – V.281. – P.12968–12975.
- 48.Cox J.M., Li H., Wood E.A., Chitteni-Pattu S., Inman R.B. and Cox, M.M. Defective dissociation of a ‘Slow’ RecA mutant protein imparts an *Escherichia coli* growth defect // J. Biol. Chem. – 2008. – V.283. – P.24909–24921.

49. 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.
50. Cox M.M. and Lehman I.R. Enzymes of general recombination // *Annu. Rev. Biochem.* – 1987. – V.56. – P.229–262.
51. Cox M.M. and Lehman I.R. RecA protein-promoted DNA strand exchange. Stable complexes of RecA protein and single-stranded DNA formed in the presence of ATP and single-stranded DNA binding protein // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V.257. – P.8523–8532.
52. Cox M.M. Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein // *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* – 1999. – V.63. – P.311–366.
53. Cox M.M. Regulation of Bacterial RecA Protein Function // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – V.42. – P.41–63.
54. Cox M.M. The bacterial RecA protein as a motor protein // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003. – V.57. – P.551–577.
55. Cox M.M. The RecA protein // In *The Bacterial Chromosome*. Higgins, N.P. (ed.). Washington, DC: American Society of Microbiology. – 2004. – P.369–388.
56. Cox M.M. Why does RecA protein hydrolyze ATP? // *Trends Biochem. Sciences.* – 1994. – V.19. – P.217–222.
57. Cox M.M., Goodman M.F., Kreuzer K.N., Sherratt D.J., Sandler S.J., and Marians K.J. The importance of repairing stalled replication forks. // *Nature.* – 2000. – V. 404. – P. 37–41.
58. Cox M.M., McEntee K. and Lehman I.R. A simple and rapid procedure for the large scale purification of the RecA protein of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1981. – V.256. – P. 4676–4678.
59. Cox J.M., Tsodikov O.V., Cox M.M. Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within of RecA filament. // *PLoS Biol.* –2005. –V. 3. –P.231 –243.
60. Cole S.T. Characterisation of the promoter for the LexA regulated *sulA* gene of *Escherichia coli* // *Mol Gen Genet.* – 1983. – Vol. 189. – P. 400–404.

61. Cox, M.M., Battista, J.R. *Deinococcus radiodurans*—The consummate survivor // Nat. Rev. Microbiol. –2005. –V. 3. – P. 882–892.
62. Craig N.C., Roberts J.W. Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* RecA protein-directed cleavage of phage λ repressor // J. Biol. Chem. –1981. –V.256. –P.8039–8044.
63. Cromie G.A., Millar C.B., Schmidt K.H., Leach D.R. Palindromes 696 as substrates for multiple pathways of recombination in *Escherichia coli* // Genetics. –2000. –V.154. –P.513–522.
64. Cromie G.A., Leach D.R. Control of crossing over // Mol. Cell. –2000. –V. 6. – P.815–826.
65. De Mot R., Schoofs G. and Vanderleyden J. A putative regulatory gene downstream of *recA* is conserved in gram-negative and gram-positive bacteria // Nucleic Acids Research. – 1994. – V.22. – P.1313–1314.
66. Deschavanne P., Radman M. Counterselection of GATC sequences in enterobacteriophages by the components of the methyl-directed mismatch repair system // Journal of molecular evolution. – 1991. – T. 33. – №. 2. – C. 125–132.
67. DiCapua E., Schnarr M., Ruigrok R.W., Lindner P., Timmins P.A. Complexes of RecA protein in solution. A study by small angle neutron scattering // J. Mol. Biol. – 1990. – V.214. – N.2. – P.557–570.
68. Dixon D.A., Kowalczykowski S.C. The recombination hotspot, Chi, is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the *Escherichia coli* RecBCD enzyme // Cell. – 1993. – V.73. – P.87–96.
69. Drees J.C., Lusetti S.L. and Cox M.M. Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein—Modulation by the RecA C terminus and filament functional state // J. Biol. Chem. – 2004a. – V.279. – P.52991–52997.
70. 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.

71. Egelman E.H. and Stasiak A. Structure of helical RecA-DNA complexes. II. Local conformational changes visualized in bundles of RecA-ATP gamma S filaments // *J. Mol. Biol.* – 1988. – V.200. – P.329–349.
72. Earl A.M, Mohundro M.M, Mian I.S, Battista J.R. The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression // *J Bacteriol.* – 2002. – V. 184. –P. 6216–24.
73. Eggington J.M, Haruta N., Wood E., Cox M.M. The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans* // *BMC Microbiol.* – 2004. – V.4. –P. 2.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Folta-Stogniew O'Malley S., Gupta R., Anderson K.S., Radding C.M. Exchange of DNA base pairs that coincides with recognition of homology promoted by *E. coli* RecA protein // *Molecular cell.* – 2004. – T. 15. – №. 6. – C. 965-975.
78. Forget A. L., Kowalczykowski S. C. Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a 3-dimensional homology search // *Nature.* – 2012. – T. 482. – №. 7385. – C. 423.
79. Foster P.L. Stress responses and genetic variation in bacteria // *Mut. Res.* – 2005. – V.569. – P.3–11.

80. Frank E.G., Hauser J., Levine A.S., Woodgate R. Targeting of the UmuD, UmuD', and MucA' mutagenesis proteins to DNA by RecA protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V.90. – P.8169–8173.
81. Freifelder D. Studies with *E. coli* sex factors // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1968. – V.33. – P.425–431.
82. Galletto R. and Kowalczykowski S.C. RecA // Curr. Biol. –2007. –V. 17(11). – P.395–397.
83. Galletto R., Amitani I., Baskin R.J., Kowalczykowski S.C. Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules. // *Nature*.- 2006. –V. 443. –P. 875–878.
84. 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.
85. Gamper H. B. et al. The synaptic complex of RecA protein participates in hybridization and inverse strand exchange reactions // *Biochemistry*. – 2003. – T. 42. – №. 9. – C. 2643–2655.
86. Glazebrook J., Forster W. and Strike P. Regulation of expression of the colicin gene of I1 group plasmid TP110 // *J Bacteriol.* –1983. – V.55–P.122–128.
87. Gonda D.K. and Radding C.M. The mechanism of the search for homology promoted by RecA protein // *J. Biol. Chem.* – 1986. – V.261. – P.13087–13096.
88. Gonda D.K., Shibata T. and Radding C.M. Kinetics of homologous pairing promoted by RecA protein: effects of end and internal sites in DNA // *Boichemistry*. –1985. –V.24. –P.413–420.
89. Gruenig M.C., Stohl E.A., Chitteni-Pattu S., Seifert S., Cox M.M. 2010. Less is more: *Neisseria gonorrhoeae* RecX protein stimulates recombination by inhibiting RecA // *J. Biol. Chem.* –2010. –V.285. –P.37188–37197.
90. Grunberg-Manago M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages // *Annu. Rev. Genet.* - 1999. – V.33. – P.193–227.

91. Gruber A.J., Erdem A.L., Sabat G., Karata K., Jaszczur M.M., Vo D.D., Olsen T.M., Woodgate R., Goodman M.F., Cox M.M. A RecA protein surface required for activation of DNA polymerase V // *PLoS Genet.* – 2015. – V.11. – P.1005066.
92. Goodman M. The Discovery of Error-prone DNA Polymerase V and Its Unique Regulation by RecA and ATP // *J Biol Chem.* – 2014. – V.289–P. 26772–26782.
93. Gutman P.D., Carroll J., Masters C., and Minton K. Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a *recA* gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* // *Gene.* – 1994. – V.141. – P. 31–35.
94. 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.
95. Haldane J.B.S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors // *J. Genet.* – 1919. – V.8. – P.299–309.
96. Handa N., Morimatsu K., Lovett S.T., Kowalczykowski S.C. Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli* // *Genes Dev.* – 2009. – V. 23. – P.1234–1245.
97. Handa N., Kowalczykowski S.C. A RecA mutant, RecA⁷³⁰, suppresses the recombination deficiency of the RecBC¹⁰⁰⁴D- χ^* interaction *in vitro* and *in vivo* // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V.365. – P. 1314–1325.
98. Harris D.R., Pollock S.V., Wood E.A. Cox M.M. Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2009. – V.191. – P. 5240–52.
99. Haruta N., Yu X., Yang S., Egelman E.H. and Cox M.M. A DNA pairing-enhanced conformation of bacterial RecA proteins // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – P.52710–52723.

100. Heuser J. and Griffith J. Visualization of RecA protein and its complexes with DNA by quick-freeze/deep-etch electron microscopy // *J. Mol. Biol.* – 1989. – V.210. – P.473–484.
101. Horii T., Ogawa T., Nakatani T., Hase T., Matsubara H., Ogawa H. Regulation of SOS-functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein // *Cell.* – 1981. – V.27. – P.515–522.
102. Hsu H.F., Ngo K.V., Chitteni-Pattu S., Cox M.M., Li H.W. Investigating *Deinococcus radiodurans* RecA protein filament formation on double-stranded DNA by real-time single-molecule approach // *Biochemistry.* –2011. –V.50. – P.8270–8280.
103. Ippen-Ihler K.A. and Minkley E.G.Jr. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli* // *Annu. Rev. Genet.* – 1986. – V.20. – P.593–624.
104. 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.
105. Joo C., McKinney S.A., Nakamura M., Rasnik I., Myong S., Ha T. Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution // *Cell.* –2006. –V. 126. –P. 515–527.
106. Kato R. and Kuramitsu S. Characterization of thermostable RecA protein and analysis of its interaction with single-stranded DNA // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – V.259. – P.592–601.
107. Kenyon C.J. and Walker G.C. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – V.77. – P.2819–2823.
108. Kim J., Heuser J. and Cox M.M. Enhanced RecA protein binding to Z DNA represents a kinetic perturbation of a general duplex DNA binding Pathway // *J. Biol. Chem.* – 1989. – V.164. – P.21848–21856.

109. Kim T., Chitteni-Pattu S., Cox B.L., Wood E.A., Sandler S.J., Cox M.M. Directed Evolution of RecA Variants with Enhanced Capacity for Conjugal Recombination // PLoS Genet. – 2015. – V11. –P:e1005278.
110. Kim J.I., Sharma A.K., Abbott S.N., Wood E.A., Dwyer D.W., Jambura A., Minton K.W., Inman R.B., Daly M.J., Cox M.M. RecA Protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization // J Bacteriol. –2002. – V. 84. – P. 1649–60.
111. Kim J.I., Cox M.M. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways // Proc. Natl. Acad. Sci. –2002. –V.99. –P.7917–7921.
112. Kojima M., Suzuki M., Morita T., Ogawa T., Ogawa H. and Tada M. Interaction of RecA protein with pBR322 DNA modified by N-hydroxy-2-acetylaminofluorene and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide // Nucl. Acids Res. – 1990. – V.18. – N.9. – P.2707–2714.
113. Konforti B.B. and Davis R.W. ATP hydrolysis and the displaced strand are two factors that determine of RecA-promoted DNA strand exchange // J. Mol. Biol. – 1992. – V.227. – P.38–53.
114. Konforti B.B. and Davis R.W. The preference for a 3' homologous end is intrinsic to RecA-promoted strand exchange // J. Biol. Chem. – 1990. – V.265. – P.6916–6920.
115. Konrad E.B. Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced recombination between chromosomal duplications // J. Bacteriol. – 1977. –V.130. –P.167–172.
116. Kowalczykowski S.C. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication // Trends Biochem Sci. –2000. –V.25. –P.156–165.
117. Kowalczykowski S.C., Clow J., Somani R., Varghese A. Effects of the *Escherichia coli* SSB protein on the binding of *Escherichia coli* RecA protein to single-stranded DNA. Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction //J. Mol. Biol. –1987. –V. 198. –P. 359.

118. Kowalczykowski S.C. and Eggleston A.K. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins // *Annu. Rev. Biochem.* – 1994. – V.63. – P.991–1043.
119. Kowalczykowski S.C. and Krupp R.A. Effects of *Escherichia coli* SSB protein on the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein // *J. Mol. Biol.* – 1987. – V.193. – P.97–113.
120. Kowalczykowski S.C. Biochemistry of genetic recombination: energetics and mechanism of DNA strand exchange // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* – 1991. – V.20. – P.539–575.
121. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli* // *Microbiol. Rev.* – 1994. – V.58. – N.3. – P.401–465.
122. Kurumizaka H., Aihara H., Ikawa S. and Shibata T. Specific defects in double-stranded DNA unwinding and homologous pairing of a mutant RecA protein // *FEBS Lett.* – 2000. – V.477. – P.129–134.
123. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V.227. – P.680–685.
124. 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.
125. Lanzov V., Stepanova I., Vinogradskaja G. Genetic control of recombination exchange frequency in *Escherichia coli* K-12 // *Biochimie.* – 1991. – V.73. – P.305–312.
126. Lanzov V.A. Hyper-recombination in *Escherichia coli* with and without SOS response // *In Recent Research Development in DNA repair and Mutagenesis* (M. Ruiz-Rubio, E. Alejandro-Duran, and T. Roldan-Arjona, Eds). India: Kerala, Research Signpost. – 2002. – P. 21–38.

127. Lavery P.E. and Kowalczykowski S.C. Biochemical basis of the constitutive repressor cleavage activity of recA730 protein. A comparison to recA803 proteins // J. Biol. Chem. – 1992. – V.267. – P.20648–20658.
128. Lavery P.E. and Kowalczykowski S.C. Properties of RecA441 protein-catalyzed DNA strand exchange can be attributed to an enhanced ability to compete with SSB protein // J. Biol. Chem. – 1990. – V.265. – P.4004–4010.
129. Lauder S.D. and Kowalczykowski S.C. Asymmetry in the recA protein-DNA filament // J. Biol. Chem. – 1991. – V.266. – P.5450–5458.
130. Le, S., Chen, H., Zhang, X., Chen, J., Patil, K. N., Muniyappa, K., & Yan, J. Mechanical force antagonizes the inhibitory effects of RecX on RecA filament formation in *Mycobacterium tuberculosis* // Nucleic acids research. –2014. –V. 42. –P.11992–11999.
131. 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.
132. Leahy M.C. and Radding C.M. Topography of the interaction of recA protein with single-stranded deoxyoligonucleotides // J. Biol. Chem. – 1986. – V.261. – P.6954–6960.
133. Lee A.M., Ross C.T., Zeng B.B., Singleton S.F. A molecular target for suppression of the evolution of antibiotic resistance: inhibition of the *Escherichia coli* RecA protein by N(6)-(1-naphthyl)-ADP // J Med Chem. – 2005. – Vol. 48. – P. 5408–5411.
134. Lee J. Y. Terakawa T., Qi Z., Steinfeld J.B., Redding S., Kwon Y., Gaines W.A., Zhao W., Sung P., Greene E.C. Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases //Science. – 2015. – T. 349. – №. 6251. – C. 977–981.
135. Lee J.W. and Cox M.M. Inhibition of recA protein promoted ATP hydrolysis. 1. ATPgS and ADP are antagonistic inhibitors // Biochemistry. – 1990. – V.29. – P.7666–7676.

136. Lin, J., Chen, Z. Z., Tian, B., & Hua, Y. J. Evolutionary pathways of an ancient gene *recX* // *Gene*. –2007. –V. 387. –P.15–20.
137. Lindsley J.E., Cox M.M. Assembly and disassembly of RecA protein Filaments occur at opposite filament ends. Relationship to DNA strand exchange // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V.265. – P.9043–9054.
138. Lindsley J.E., Cox M.M. Dissociation pathway for recA nuclear protein filaments formed on linear duplex DNA // *J. Mol. Biol.* –1989. –V.205. – P.695–711.
139. Little J.W. and Mount D.W. The SOS regulatory system of *Escherichia coli* // *Cell*. – 1982. – V.29. – P.11–22.
140. Little J.W. Autodigestion of LexA and phage repressor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1984. – V.81. – P.1375–1379.
141. Lloyd R.G. Hyper-recombination in *Escherichia coli* K-12 mutants constitutive for protein X synthesis // *J. Bacteriol.* –1978. –V. 134. –P.929–935.
142. Lloyd R.G., Buckman C. Conjugal recombination in *Escherichia coli*: genetic analysis of recombinant formation in Hfr _ F_ crosses // *Genetics*. – 1995. –V. 139. –P.1123–1148.
143. Lloyd R.G. and Sharples G.J. Genetic analysis of recombination in prokaryotes // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1992. – V.2. – P.683–690.
144. Logan K.M., Forget A.L., Verderese J.P. and Knight K.L. ATP-Mediated Changes in Cross-Subunit Interactions in the RecA Protein // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – P.11382–11389.
145. Lohman T.M., Bujalowski W. and Overman L.B. Interactions of the *E. coli* single strand binding (SSB) protein with ss nucleic acids. Binding mode transitions and equilibrium binding studies // *Biochem. Pharmacol.* – 1988. – V.37. – P.1781–1782.
146. Long J.E., Renzette N.R., Centore R.C., Sandler S.J. Differential requirements of two *recA* mutants for constitutive SOS expression in *Escherichia coli* K-12. // *PLoS ONE*. –2008. –V. 3–P.e4100.

147. Long J.E., Renzette N.R., Sandler S.J. Suppression of constitutive SOS expression by *recA4162* (I298V) and *recA4164* (L126V) requires UvrD and RecX in *Escherichia coli* K-12 // *Mol. Microbiol.* -2009.-V.73.-P.226–239.
148. Long J.E., Massoni S.C., Sandler S.J. RecA4142 causes SOS constitutive expression by loading onto reversed replication forks in *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* 2010. –V.192. –P.2575–2582.
149. Lovett S.T., Clark A.J. Genetic analysis of regulation of the RecF pathway of recombination in *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* –1983. –V.153. –P. 1471–1478.
150. Lusetti S.L., Voloshin O.N., Inman R.B., Camerini-Otero R.D., Cox M.M. The DinI protein stabilizes RecA protein filaments // *J. Biol. Chem.* –2004. –V. 279. –P.30037–30046.
151. Lusetti 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.
152. Lusetti S.L. and Cox M.M. The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks // *Annu. Rev. Biochem.* – 2002. – V.71. – P.71–100.
153. Lusetti S.L., Drees J.C., Stohl E.A., Seifert H.S. and Cox M.M. The DinI and RecX proteins are competing modulators of RecA functions // *J. Biol. Chem.* – 2004a. – V.279. – P.55073–55079.
154. Lusetti S.L., Hobbs M.D., Stohl E.A., Chitteni-Pattu S., Inman R.B., Seifert, H.S. and Cox, M.M. The RecF protein antagonizes RecX function via direct interaction // *Mol. Cell.* – 2006. – V.21. – P.41–50.
155. van Loenhout M.T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA // *Nucl. Acids Res.* -2009. –V.37. –P.4089–4099.
156. 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.

157. Malkov V.A. and Camerini-Otero R.D. Photocross-links between single-stranded DNA and *Escherichia coli* RecA protein map to loops L1 (amino acid residues 157–164) and L2 (amino acid residues 195–209) // *J. Biol. Chem.* - 1995. - V.270. - P.30230–30233.
158. Marceau A. H., Bernstein D. A., Walsh B. W., Shapiro W., Simmons L. A., & Keck J. L. Protein interactions in genome maintenance as novel antibacterial targets // *PloS one.* - 2013. - T. 8. - №. 3.
159. Marrione P.E. and Cox M.M. RuvB protein-mediated ATP hydrolysis: functional asymmetry in the RuvB hexamer // *Biochemistry.* - 1995. - V.34. - P.9809-9818.
160. Masters M., Colloms M.D., Oliver I.R., He L., Macnaughton E.J., Charters Y. The *pcnB* gene of *Escherichia coli*, which is require for colE1 copy number maintenance, is dispensible. // *J Bacteriol.* -1993. -V.175-P.4405–4413.
161. Masui R., Mikawa T. and Kuramitsu S. Local folding of the N-terminal domain of *Escherichia coli* RecA controls protein-protein interaction // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V.272. - P.27707–27715.
162. Matic I., Rayssiguier C. and Radman M. Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species // *Cell.* -1995. -V.80. -P.507–515.
163. Mazin A.V. and Kowalczykowski S.C. The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. // *EMBO J.* -1998. -V.17. -P.1161–1168.
164. Menetski J.P., Varghese A., Kowalczykowski S.C. Properties of the high-affinity single-stranded DNA binding state of the *Escherichia coli* RecA protein // *Biochemistry.* -1988. -V. 27. -P.1205–1212.
165. McCool, J. D., Long, E., Petrosino, J. F., Sandler, H. A., Rosenberg, S. M. and Sandler, S. J. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy // *Molecular Microbiology.* - 2004. -V.53. -P.1343–1357.

166. McEntee K. Specialized transduction of *recA* by bacteriophage lambda // *Virology*. – 1976. – V.70. – P.221–228.
167. McGrew D.A. and Knight K.L. Molecular design and functional organization of the RecA protein. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2003. – V.38. – P.385–432.
168. McKenzie, G. J., Harris, R. S., Lee, P. L. & Rosenberg, S. M. The SOS response regulates adaptive mutation // *Proc Natl Acad Sci.* –2000. –V. 97. –P. 6646-6651.
169. Minton, K.W. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* // *Mutat. Res.* –1996. –V.363. P.1–7.
170. Montague M., Barnes C., Smith H.O., Chuang R.Y., Vashee S. The evolution of RecD outside of the RecBCD complex // *J Mol Evol.* –2009. –V.69. –P.360–71.
171. Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. 2003. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. // *Mol. Cell.* –2003.–V.11.–P.1337–1347.
172. Mo, S. A. Manning, M. Roggiani, M. J. Culyba, A. N. Samuels, P. D. Sniegowski, M. Goulian, R. M. Kohli. Systematically Altering Bacterial SOS Activity under Stress Reveals Therapeutic Strategies for Potentiating Antibiotics // *mSphere*. –2016. –V.1. –P.e00163–16.
173. Menetski J.P. and Kowalczykowski S.C. Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by dATP // *Biochemistry*. – 1989. – V.28. – P.5871–5881.
174. Menetski J.P. and Kowalczykowski S.C. Interaction of RecA protein with single-stranded DNA. Quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors // *J. Mol. Biol.* - 1985. – V.181 – P.281–295.
175. Menetski J.P. and Kowalczykowski S.K. Transfer of RecA protein from one polynucleotide to another. Effect of ATP and determination of the processivity of ATP hydrolysis during transfer // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262. – P.2093–2100.

176. Menetski J.P. and Kowalczykowski S.K. Transfer of RecA protein from one polynucleotide to another. Kinetic evidence for a ternary intermediate during the transfer reaction // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262. – P.2085–2092.
177. Menetski J.P., Bear D.G., Kowalczykowski S.C. Stable DNA heteroduplex formation catalyzed by the *Escherichia coli* RecA protein in the absence of ATP hydrolysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – V.87. – P.21–25.
178. Menetski J.P., Varghese A. and Kowalczykowski S.C. The physical and enzymatic properties of *Escherichia coli* RecA protein display anion-specific inhibition // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V.267. – P.10400–10404.
179. Menge K.L. and Bryant F.R. Effect of nucleotide cofactor structure on RecA protein-promoted DNA pairing. Three strand exchange reaction // *Biochemistry.* – 1992. – V.31. – P.5151–5157.
180. Meyer R.R., Laine P.S. The single-stranded DNA-binding protein in *Escherichia coli* // *Molbiol. Rev.* – 1990. – V.54. – P.342–380.
181. Mikawa T., Masui R. and Kuramitsu S. RecA protein has extremely high cooperativity for substrate in its ATPase activity // *J. Biochem.* – 1998. – V.123. – P.450–457.
182. Miller J.H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor Laboratory Press. –1972. –P.352–359.
183. Mitchell A.H. and West S.C. Hexameric rings of *Escherichia coli* RuvB protein. Cooperative assembly, processivity and ATPase activity // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V. 243. – P.208–215.
184. Moore T., McGlynn P., Ngo H.P., Sharples G.J. and Lloyd R.G. The RdgC protein of *Escherichia coli* binds DNA and counters a toxic effect of RecFOR in strains lacking the replication restart protein PriA // *EMBO J.* – 2003. – V.22. – P.735–745.
185. Morimatsu K. Horii T. and Takahishi M. Interaction of Tyr103 and Tyr264 of the RecA protein with DNA and nucleotide cofactors. Fluorescence study of engineered proteins // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V.228. – P.779–785.

186. Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair. // *Mol. Cell.* –2003. –V.11. –P.1337–1347.
187. Morriscal S.W. and Cox M.M. Stabilization of RecA protein-ssDNA complexes by the single-stranded DNA binding protein of *Escherichia coli* // *Biochemistry.* – 1990. – V.29. – P.837–43.
188. Müller. “Non-chemical” drugs: biologicals, protein therapeutics, vaccines and antisense therapeutics // *Clinical Pharmacology: Current Topics and Case Studies.* –2010. – P.309–321.
189. Naiman, K., & Fuchs, R. P. A defect in homologous recombination leads to increased translesion synthesis in *E. coli* // *Nucleic acids research.* –2016. – V.44. –P.7691–7699.
190. Narumi I., Satoh K., Kikuchi M., Funayama T., Yanagisawa T., Kobayashi Y., Watanabe H., Yamamoto K. The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation // *J Bacteriol.* –2001. –V.183. –P.6951–6.
191. Nautiyal A., Patil K.N., Muniyappa K. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2014. – Vol. 69. – P. 1834–1843.
192. Nayak S. and Bryant F.R. Differential rates of NTP hydrolysis by the mutant [S69G]RecA protein. Evidence for a coupling of NTP turnover to DNA strand exchange // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V.274. – P.25979–25982.
193. Nguyen T.T., Muench K.A. and Bryant F.R. Inactivation of the RecA protein by mutation of histidine 97 or lysine 248 at the subunit interface // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V.268. – P.3107–3113.
194. Norais C.A., Chitteni-Pattu S., Wood E.A., Inman R.B., Cox M.M. DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation // *J. Biol. Chem.* –2009. –V.284. –P.21402–21411.

195. Ogawa T., Wabiko H., Tsurimoto T., Horii T., Masukata H. and Ogawa H. Characteristics of purified RecA protein and the regulation of its synthesis *in vitro* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. – 1979. – V.43. – P.909–915.
196. Ogawa T., Yu X., Shinohara A. and Egelman E.N. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament // Science. – 1993. – V.259. – P.1896–1899.
197. Pages V., Koffel-Schwartz N. and Fuchs R.P. *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli* // DNA Repair. – 2003. – V.2. – P.273–284.
198. Papavinasasundaram K.G., Movahedzadeh F., Keer J.T., Stoker N.G., Colston M.J. and Davis E.O. Mycobacterial *recA* is cotranscribed with a potential regulatory gene called *recX* // Mol. Microbiol. - 1997. – V.24. – P.141–153.
199. Parsons C. A., Stasiak A., West S. C. The *E. coli* RuvAB proteins branch migrate Holliday junctions through heterologous DNA sequences in a reaction facilitated by SSB // The EMBO journal. – 1995. – T. 14. – №. 22. – C. 5736.
200. Patel M., Jiang Q., Woodgate R., Cox M.M., Goodman M.F. A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V // Crit Rev Biochem Mol Biol. –2010. – V.45. –P.171–84.
201. Peterson E.J., Janzen W.P., Kireev D., Singleton S.F. High-throughput screening for RecA inhibitors using a transcriber adenosine 5'-O-diphosphate assay // Assay Drug Dev Technol. – 2012. – Vol. 10. – P. 260–268.
202. Petrova, V., Chitteni-Pattu S., Drees J.C., Inman R.B., Cox M.M. An SOS Inhibitor that binds to free RecA protein: The PsiB protein // Mol. Cell. –2009. –V. 36. –P.121–130.
203. Petukhov, M. et al. Design of stable alpha-helices using global sequence optimization // J Pept Sci. –2009. –V. 15. –P.359–365.
204. Piechura J.R., Tseng T.L., Hsu H.F., Byrne R.T., Windgassen T.A, Chitteni-Pattu S., Battista J.R., Li H.W., Cox M.M. Biochemical characterization of

- RecA variants that contribute to extreme resistance to ionizing radiation // DNA Repair (Amst). – 2015. – V.26. –P.30–43.
205. Pinsince J.M. and Griffith J.D. Early stages in RecA protein-catalyzed pairing. Analysis of coaggregate formation and non-homologous DNA contacts // J. Mol. Biol. – 1992. – V.228. – P.409–420.
206. Pugh B.F. and Cox M.M. High salt activation of RecA protein ATPase in the absence of DNA // J. Biol. Chem. – 1988. – V.263. – P.76–83.
207. Pugh B.F. and Cox M.M. Stable binding of RecA protein to duplex DNA // J. Biol. Chem. –1987. –V.262. –N.3. –P.1326–1336.
208. Pugh B.F., Schutte B.C. and Cox M.M. Extent of duplex DNA underwinding induced by recA protein binding in the presence of ATP // J. Mol. Biol. – 1989. – V.205. – P.487–492.
209. 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.
210. Rangarajan S., Woodgate R. and Goodman M.F. Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins // Mol. Microbiol. – 2002. – V.43. – P.617–628.
211. Rao B.J. and Radding C.M. Homologous recognition promoted by RecA protein via non-Watson-Crick bonds between identical DNA strands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V.90. – P.6646–6650.
212. Register J.C., Griffith J. The direction of RecA protein assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. // J. Biol. Chem. –1985. –V.260. –P.12308–12312.
213. Rajpurohit Y.S., Bihani S.C., Waldor M.K., Misra H.S. Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA regulates its activity and may contribute to radioresistance //J Biol Chem. –2016. –V.291. –P.16672–16685.
214. Rajarao G. K., Nekhotiaeva N., Good L. Peptide-mediated delivery of green fluorescent protein into yeasts and bacteria //FEMS Microbiol Lett. –2002. – V.215. –P. 267–272.

215. Razavy H., Szigety S.K., Rosenberg S.M. Evidence for both 3' and 5' single-strand DNA ends in intermediates in chi-stimulated recombination in vivo // *Genetics*. –1996. –V.142. –P.333–339.
216. Rehrauer W.M. and Kowalczykowski S.C. Alteration of the nucleoside triphosphate (NTP) catalytic domain within *Escherichia coli recA* protein attenuates NTP hydrolysis but not joint molecule formation // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V.268. – P.1292–1297.
217. Rehrauer W.M., Lavery P., Palmer E., Singh R.N. and Kowalczykowski S.C. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V.271. – P.23865–23873.
218. Renzette N., Gumlaw N., Sandler S.J. DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in *Escherichia coli* K-12. // *Mol. Microbiol.* –2007. –V.63. –P.103–115.
219. Shereda R.D., Kozlov A.G., Lohman T., Cox M.M., Keck J.L. SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* –2008. –V.43. –P.289–318.
220. Robinson A., McDonald J.P., Caldas V.E., Patel M., Wood E.A., Punter C.M., Ghodke H., Cox M.M., Woodgate R., Goodman M.F., van Oijen A.M. Regulation of Mutagenic DNA Polymerase V Activation in Space and Time // *PLoS Genet.* –2015. –V.11. –P.e1005482.
221. Roca A.I., Cox M.M. The RecA protein: structure and function. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* –1990. –V.25. –P.415–456.
222. Roy R., Kozlow A.G., Lohman T.M., Ha T. SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation // *Nature.* –2009. –V.461. – P.1092–1097.
223. Robu M.E., Inman R.B. and Cox M.M. RecA protein promotes the regression of stalled replication forks *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98. – P. 8211–8218.

224. Roca A.I. and Cox M.M. RecA protein: structure, function and role in recombinational DNA repair // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. – 1997. – V.56. – P.129–223.
225. Roman L.J. and Kowalczykowski S.C. Relationship of the physical and enzymatic properties of *Escherichia coli* RecA protein to its strand exchange activity // Biochemistry. – 1986. – V.25. – P.7375–7385.
226. Ronayne E. A., Wan, Y. S., Boudreau, B. A., Landick, R., & Cox, M. M. P1 Ref endonuclease: a molecular mechanism for phage-enhanced antibiotic lethality // PLoS genetics. – 2016. – T. 12. – №. 1.
227. Rould E.R., Muniyappa K. and Radding C.M. Unwinding of heterologous DNA by RecA protein during the search for homologous sequences // J. Mol. Biol. – 1992. – V.226. – P.127–139.
228. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. // Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor. N.Y. - 1989.
229. Sancar A. and Hearst J.E. Molecular matchmakers // Science. - 1993. – V.259. – P.1415–1420.
230. Sano Y. Role of the *recA*-related gene adjacent to the *recA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 1993. – V.175. – P.2451-2454.
231. Saraste M., Shibbald P.R. and Wittinghofer A. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins // Trends Biochem. Sci. – 1990. – V.15. – P.430–434.
232. Satoh K, Kikuchi M, Ishaque AM, Ohba H, Yamada M, Tejima K, Onodera T, Narumi I. The role of *Deinococcus radiodurans* RecFOR proteins in homologous recombination // DNA Repair (Amst). –2012. –V.11. –P.410–8.
233. Sexton, J.Z., Wigle, T.J., Hel, Q., Hughes, A.M., Smith, R.G., Singleton, F.C., Williams, L.A., and Yeh, L.A. Novel inhibitors of *E. coli* RecA ATPase activity // Curr. Chem. Genomics.-2010. – V.4. –P.34–42.
234. Schoemaker R., Gayda, and Markovitz A. Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the *sulA* protein, a key

- to lon-associated filamentation and death // *J Bacteriol.* –1984. –V.158. –P.551–561.
235. Shah R., Cosstick R. and West S.C. The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts // *EMBO J.* – 1997. – V.16. – P.1464–1472.
236. Shan Q. and Cox M.M. RecA filament dynamics during DNA strand exchange reactions // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272. – P.11063–11073.
237. Shan Q. and Cox M.M. RecA protein dynamics in the interior of RecA nucleoprotein filaments // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V.257. – P.756–774.
238. Shan Q. Bork J.M. Webb B.L. Inman R.B. and Cox M.M. RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins // *J. Mol. Biol.* - 1997. – V.265. – P.519–540.
239. Shan Q., Cox M.M. and Inman R.B. DNA strand exchange promoted by RecA K72R. Two reaction phases with different Mg^{2+} requirements // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V.271. – P.5712–5724.
240. Sheng D., Liu R., Xu Z., Singh P., Shen B., Hua Y. Dual negative regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiation resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans* // *DNA Repair (Amst).* –2005. –V.4. – P.671–8
241. Sheng D, Li M, Jiao J, Sheng X, Deng W, Hua Y. Repression of *recA* induction by RecX is independent of the RecA protein in *Deinococcus radiodurans* // *J Bacteriol.* –2010. –V.192. –P.3540–4.
242. Shinohara T., Ikawa S., Iwasaki W., Hiraki T., Hikima T., Mikawa T., Arai N., Kamiya N., Shibata T. Loop L1 governs the DNA-binding specificity and order for RecA-catalyzed reactions in homologous recombination and DNA repair // *Nucleic Acids Res.* –2015–V.43. –P.973–986.
243. Schlesinger D.J. Role of RecA in DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans* // *FEMS Microbiol Lett.* –2007. –V.274. –P.342–7.

244. Slade D., Lindner A. B., Paul G., and Radman, M. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans* // Cell 2009. –V. 136. –P. 1044–1055.
245. Smith G.R. Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms // Cell. –1991. –V.64. –P.19–27.
246. Schlachter K., Phuong P., Cox M.M. and Goodman M.F. Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation // Chem. Rev. – 2006. – V.106. – P.406–419.
247. Schutte B.C. and Cox M.M. Homology-dependent changes in adenosine 5'-triphosphate hydrolysis during RecA protein promoted DNA strand exchange: evidence for long paranemic complexes // Biochemistry. – 1987. – V.26. – P.5616–5625.
248. Schutte B.C. and Cox M.M. Homology-dependent underwinding of duplex DNA in recA protein generated paranemic complexes // Biochemistry. – 1988. – V.27. – P.7886–7894.
249. Shevelev I.V., Kravetskaya T.P., Legina O.K. and Krutyakov V.M. 'External' proofreading of DNA replication errors and mammalian autonomous 3'→5' exonucleases // Mutat. Res. – 1996. – V.352. – P.51–55.
250. Shibata T., DasGupta C., Cunningham R. and Rading C.M. Purified *Escherichia coli* RecA protein catalyzes homologous pairing of superhelical DNA and single-stranded fragments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – V.76. – N.4. – P.1638–1642.
251. Silver M.S. and Fersht A.R. Investigation of binding between RecA protein and single-stranded polynucleotides with the aid of a fluorescent deoxyribonucleic acid derivative // Biochemistry. – 1983. – V.22. – P.2860–2866.
252. Simmons L., Foti J., Cohen S., Walker G. The SOS Regulatory Network // EcoSal Plus. –2008. –V.3.

253. Slilaty S.N., Rupley J.A., Little J.W. Intramolecular cleavage of LexA and phage lambda repressor: dependence of kinetic on repressor concentration, pH, temperature and solvent // *Biochemistry*. – 1986. – V.25. – P.6866–6875.
254. Smith, P. A. & Romesberg, F. E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation // *Nat Chem Biol*. –V.3. – 2007. –P.549–556.
255. Sommer S., Becherel O. J., Coste G., Bailone A., & Fuchs, R. P. Altered translesion synthesis in *E. coli* Pol V mutants selected for increased recombination inhibition // *DNA repair*. –V.2. –P.1361–1369.
256. Stasiak A. Three-stranded DNA structure; is this the secret of DNA homologous recombination? // *Mol. Microbiol*. – 1992. – V.6. – N.22. – P.3267–3276.
257. Stohl E.A. and Seifert H.S. The *recX* gene potentiates homologous recombination in *Neisseria gonorrhoeae* // *Mol. Microbiol*. – 2001. – V.40. – P.1301–1310.
258. 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.
259. 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.
260. Story R.M. and Steitz T.A. Structure of the RecA protein-ADP complex. // *Nature*. – 1992. – V.355. – P.374–376.
261. 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.
262. Sutton M.D., Smith B.T., Godoy V.G. and Walker G.C. The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance // *Annu. Rev. Genet*. – 2000. – V.34. – P.479–497.

263. Takahashi M. and Norden B. Structure of RecA-DNA complex and mechanism of DNA strand exchange reaction in homologous recombination // *Adv. Biophysics.* - 1994. – V.30. – P.1–35.
264. Tateishi S., Horii T., Ogawa T. and Ogawa H. C-terminal truncated *Escherichia coli* RecA protein RecA5327 has enhanced binding affinities to single- and double-stranded DNAs // *J. Mol. Biol.* - 1992. – V.223. – P.115–129.
265. Tsang S.S., Chow S.A. and Radding C.M. Networks of DNA and RecA protein are intermediates in homologous pairing // *Biochemistry.* – 1985. – V.24. – P.3226–3232.
266. Ullsperger C.J. and Cox M.M. Quantitative RecA protein binding to the hybrid duplex product of DNA strand exchange // *Biochemistry.* - 1995. – V. 34. – P.10859-10866.
267. Umezu K. and Kolodner R.D. Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V.269. – P.30005–30013.
268. Umezu K., Chi N.W. and Kolodner R.D. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V.90. – P.3875–3879.
269. Umlauf S.W., Cox M.M., Inman R.B. Triple-helical DNA pairing intermediates formed by RecA protein. // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V.265. – P.16898–16912.
270. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information // *Nucleic Acids Research.* -2015.-V. 43.-P.D204-D212.
271. VanLoock M.S., Yu X., Yang S., Galkin V.E., Huang H., Rajan S.S., Anderson W.F., Stohl E.A., Seifert H.S. and Egelman E.H. Complexes of RecA with LexA and RecX differentiate between active and inactive RecA nucleoprotein filaments // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V.333. – P.345–354.

272. van Loenhout M.T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA. // *Nucl. Acids Res.* - 2009.-V.37.-P.4089–4099.
273. van der Heijden T, Dekker C. Monte Carlo simulations of protein assembly, disassembly, and linear motion on DNA // *Biophys. J.* -2008.-V.95.- P.4560–4569.
274. Venkatesh R., Ganesh N., Guhan N., Reddy M.S., Chandrasekhar T. and Muniyappa K. RecX protein abrogates ATP hydrolysis and strand exchange promoted by RecA: Insights into negative regulation of homologous recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2002. – V.99. – P.12091–12096.
275. Verhoef C. and de Haan P.G. Genetic recombination in *Escherichia coli*. I. Relation between linkage of unselected markers and map distance // *Mutat. Res.* - 1966. - V.3. - P.101–110.
276. Vierling S., Weber T., Wohlleben W. and Muth G. Transcriptional and mutational analyses of the *Streptomyces lividans recX* gene and its interference with RecA activity // *J. Bacteriol.* - 2000. – V.182. – P.4005–4011.
277. Vlašić I., Mertens R., Seco E. M., Carrasco B., Ayora S., Reitz G., Moeller R. *Bacillus subtilis* RecA and its accessory factors, RecF, RecO, RecR and RecX, are required for spore resistance to DNA double-strand break // *Nucleic acids research*, -2014.-V.42.-P.2295–2307.
278. Voloshin O.N., Ramirez B.E., Bax A. and Camerini-Otero R.D. A model for the abrogation of the SOS response by an SOS protein: a negatively charged helix in DinI mimics DNA in its interaction with RecA // *Gene Develop.* - 2001. – V.15. – P.415–427.
279. Voter A. F. et al. A High-Throughput Screening Strategy to Identify Inhibitors of SSB Protein–Protein Interactions in an Academic Screening Facility // *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D.* – 2018. – C. 24

280. Wang J., Sarov M., Rientjes J., Hollak H., Kranz H. An improved recombineering approach by adding RecA to lambda Red recombination // *Mol. Biotechnol.* – 2006. – V.32. – P.43–53.
281. Wang Y. and Adzuma K. Differential proximity probing of two DNA binding sites in the *Escherichia coli* RecA protein using photo-cross-linking methods // *Biochem.* - 1996. – V.35. – P.3563–3571.
282. Weinstock G.M., McEntee K. And Lehman I.R. ATP-dependent renaturation of DNA catalyzed by the RecA protein of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1979. - V.76. - N.1. - P.126–130.
283. Weinstock G.M., McEntee K. and Lehman I.R. Hydrolysis of nucleoside triphosphates catalyzed by the recA protein of *Escherichia coli*. Hydrolysis of UTP // *J. Biol. Chem.* - 1981. – V.256. – P.8856–8858.
284. Wigle T.J. and Singleton S.F. Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2007. - V.17. - P.3249–3253.
285. Wittung P., Funk M., Jernström B., Nordén B. and Takahashi M. Fluorescence-detected interactions of oligonucleotides in RecA complexes // *FEBS Lett.* - 1995. – V.368. – P.64–68.
286. Wood T.H. and Walmsley R.H. Conjugation in *Escherichia coli* K-12 and its modification by irradiation // *Biophys. J.* - 1969. - V.9. - P.391–420.
287. Yasuda T., Morimatsu K., Horii T., Nagata T. and Ohmori H. Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI // *EMBO J.* - 1998. – V.17. – P.3207–3216.
288. Yu X. and Egelman E.H. Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible // *J. Mol. Biol.* – 1992. – V.227. – P.334–346.
289. Yu X. and Egelman E.H. The LexA repressor binds within the deep helical groove of the activated RecA filament // *J. Mol. Biol.* - 1993. - V.231. - P.29–40.

290. Yu X, Jacobs S.A., West S.C., Ogawa T. and Egelman E.H. Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2001. – V.98. – P.8419–8424.
291. Zaitsev E. N. and Kowalczykowski S. C. Enhanced monomer-monomer interactions can suppress the recombination deficiency of the *recA142* allele // Mol. Microbiol. – 1999. – V.34. – P.1–9.
292. Zahradka K., Slade D., Bailone A., Sommer S., Averbeck D., Petranovic M., Lindner A.B., Radman M. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans* // Nature.-2006.-V.443.- P.569–73.
293. 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.
294. Zlotnick A., Mitchell R.S. and Brenner S.L. RecA protein filaments bind two molecules of single-stranded DNA with off rates regulated by nucleotide cofactor // J. Biol. Chem. – 1990. – V.265. – P.17050–17054.
295. Zhumabayeva B., Chang C., McKinley J., Diatchenko L. and Siebert P.D. Generation of full-length cDNA libraries enriched for differentially expressed genes for functional genomics // Biotechniques. – 2001. – V.30. – P.512–520.
296. Бреслер С.Е. и Ланцов В.А. Индуцированная рекомбинация у *Escherichia coli* K-12: рекомбиногенный эффект *tif 1* // Докл. Акад. Наук. - 1978. - Т.238. - С.715–717.
297. Кассандрова О.Н., Лебедев В.В. Обработка результатов измерений. // Москва: Наука. - 1970.
298. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК // Молекулярная биология. - 2007. - Т.41. - С.1–12.
299. Ланцов В.А., Бахланова И.В., Дудкина А.В. и Киль Ю.В. Регулирование рекомбиназной активности у бактерий // Бреслеровские чтения 2 (2006): Молекулярная генетика, биофизика и медицина сегодня. – ред. Ланцов В. – Издательство ПИЯФ РАН – 2007. – С. 110–123.

300. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. // Москва: Мир. - 1976.
301. Остерман Л.Ф. Хроматография белков и нуклеиновых кислот // Москва: Наука. - 1986.

Благодарности

Работа в разное время проводилась в трех научных лабораториях. Автор признателен администрации ОМРБ ПИЯФ за возможность проведения эффективной научной работы, руководству Биохимического отдела Университета Мадисон-Висконсин в лице Майка Кокса, руководству научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» в лице Ходорковского М.А.. Кроме того автор безмерно благодарен Ланцову В.А., Петухову М.Г., Тимковскому А.Л., Вербенко В.Н., Кабоеву О.К., Фроловой Л. и множеству тех людей с кем имел возможность работать, обсуждать и решать научные и технические проблемы. Особая благодарность Бахлановой И.В., чья постоянная поддержка ощущалась на протяжении всего срока выполнения проекта.