

**ЧЕРВЯКОВА
ДАРЬЯ БОРИСОВНА**

**ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ
RecAX21 И RecAX53 (*Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli*),
ОБЛАДАЮЩИХ ПОВЫШЕННОЙ РЕКОМБИНОГЕННОСТЬЮ**

03.00.03

молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Учреждения Российской академии наук «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН».

Научные руководители доктор биологических наук,
профессор **Владислав Александрович Ланцов**,
Петербургский институт ядерной физики РАН,

доктор биологических наук,
профессор **Владимир Генадьевич Королев**,
Петербургский институт ядерной физики РАН.

Официальные оппоненты: член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор **Георгий Борисович Смирнов**
НИИ эпидемиологии и микробиологии РАН
им. Н. Ф. Гамалея,

доктор биологических наук,
профессор **Валерий Анатольевич Поспелов**,
Институт цитологии РАН.

Ведущее учреждение: Биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургского
государственного университета

Защита состоится «20» ноября 2009 года в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт института: www.cytspb.rssi.ru Электронный адрес: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Факс: +7 (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «19» октября 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Данная работа посвящена актуальной теме – выявлению молекулярных основ гиперрекомбинации.

Гомологическая рекомбинация (ГР) представляет собой один из фундаментальных биологических процессов, происходящих в живой клетке. Она необходима для репарации повреждений ДНК, репликации генома, правильной сегрегации хромосом в мейозе, а также является основным механизмом поддержания генетической изменчивости популяций. Фундаментальную роль белка RecA в регуляции метаболизма ДНК отражает его высокая консервативность в эволюции: его структурные и функциональные гомологи были обнаружены во всех трех царствах живого – у бактерий, архей и эукариот (Ланцов, 2007).

Образуя активный филамент на ДНК, белок RecA выполняет несколько функций в бактериальной клетке. Он осуществляет основной процесс ГР – трансферазную реакцию; участвует в репарации ДНК; обладает копротеазной активностью: катализирует саморасщепление белка LexA и ряда других репрессоров, приводящее к индукции SOS-ответа; белок RecA также задействован в SOS-мутагенезе (Ланцов, 2007; Сох, 2007).

В свете важной биологической роли белка RecA особого внимания заслуживают такие белки RecA, которые обладают усиленными рекомбинационными характеристиками. Изучение свойств таких белков позволит детальнее понять осуществляемую этим белком трансферазную реакцию и выделить наиболее важные для осуществления обмена гомологическими нитями ДНК его характеристики.

В настоящее время известны два механизма, приводящие к повышению частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) в клетке: SOS-зависимый и SOS-независимый (Lanzov, 2002). В первом случае ЧРО увеличивается преимущественно за счет накопления белка RecA в клетке при RecA-опосредованной дерепрессии SOS-регулона, а во втором случае к высоким значениям ЧРО приводит повышенная активность самого белка RecA, вызванная его структурными особенностями.

Белок RecA из *Pseudomonas aeruginosa* (RecAPa) вызывает повышение ЧРО в 6,5 раза, по сравнению с белком RecA из *Escherichia coli* (RecAЕс), и не приводит к индукции SOS-функций клетки (Namsaraev *et al.*, 1998). С гиперрекомбиногенностью белка RecAPa коррелирует повышенная, по сравнению с белком RecAЕс, стабильность его нуклеопротеиновых филаментов, более активное вытеснение белком RecAPa белка SSB с одонитевой ДНК (онДНК) и связывание с двунитевой ДНК (днДНК), а также повышенная активность белка RecAPa в инициации реакции переноса нити ДНК (Namsaraev *et al.*, 1998).

Для более детального исследования рекомбинационных свойств белка RecA были созданы 54 химерных гена *recA*, состоящих из фрагментов генов *recA* из *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* (Ogawa *et al.*, 1992). Генетический анализ выявил среди них 31

рекомбинационно полноценный ген *recAX* (Bakhlanova *et al.*, 2001). Наше внимание привлекли 3 химерных гена: пара *recAX20* и *recAX21*, а также ген *recAX53*.

Химерные белки RecAX21 и RecAX20 представляют собой белки RecAEc, N-концевые домены которых заменены соответствующими фрагментами белка RecAPa (рис. 1) (Ogawa *et al.*, 1992). По сравнению с белком RecAEc, белок RecAX20 содержит пять аминокислотных замен (а. з.): Q7K, K8R, K19R, S25A и I26V, причем 2 последние из перечисленных аминокислот (а. к.) предположительно участвуют в мономер-мономерных контактах (Story *et al.*, 1992, 1992a). Химерный белок RecAX21 отличается от белка RecAX20 единственной а. з. L29M, задействованной в межмономерных взаимодействиях (Story *et al.*, 1992, 1992a). При этом рекомбиногенность белков RecAX21 и RecAX20 различается значительно: величины ЧРО, характеризующие химерные белки RecAX21 и RecAX20 и контрольные белки RecAEc и RecAPa, соотносятся следующим образом: RecAEc : RecAX20 : RecAX21 : RecAPa = 1:1 : 3 : 6.5 (Bakhlanova *et al.*, 2001).

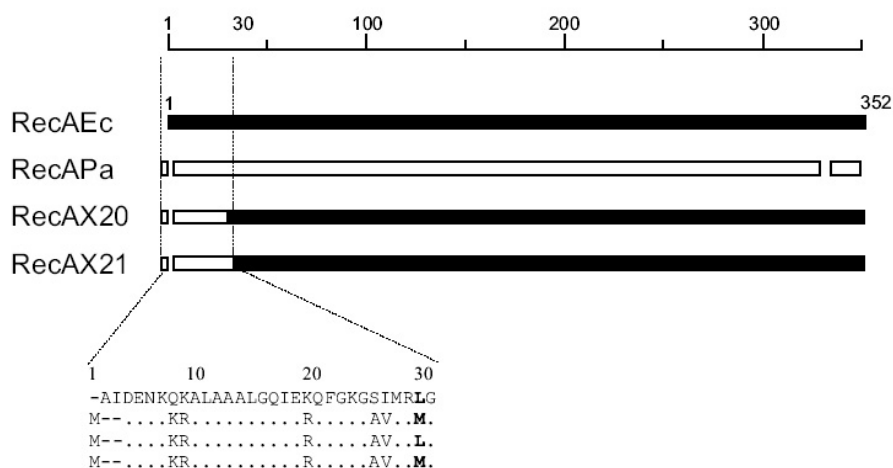


Рисунок 1. Структура химерных белков RecAX20 и RecAX21. Показано выравнивание аминокислотных последовательностей белков RecAX20 и RecAX21 относительно белков RecAEc и RecAPa

Химерный белок RecAX53 представляет собой белок RecAEc, у которого участок центрального домена с 170 до 250 а. к. заменен соответствующим фрагментом белка RecAPa (Ogawa *et al.*, 1992). По сравнению с белком RecAEc, химерный белок RecAX53 содержит 12 а. з. из белка RecAPa: M170L, M175L, L178I, A179T, L182I, Q184N, S185A, T187C, L189V, I228T, E236D, N237E (рис. 2). Перечисленные а. з. присутствуют в α -спирали F, β -слое 5 и в участке, следующим сразу за β -слоем 6 (с 228 по 241 а. к.), - в структурных элементах белка, принимающих участие почти во всех функциях белка RecA: в создании межмономерных контактов, в связывании и гидролизе АТФ, а также в связывании с ДНК (Chen *et al.*, 2008). Согласно структуре неактивного белка RecA (Story *et al.*, 1992, 1992a), ни одна из

присутствующих в белке RecAX53 а. з. (по сравнению с белком RecAЕс) не участвует в каких-либо взаимодействиях напрямую (Story *et al.*, 1992, 1992a).

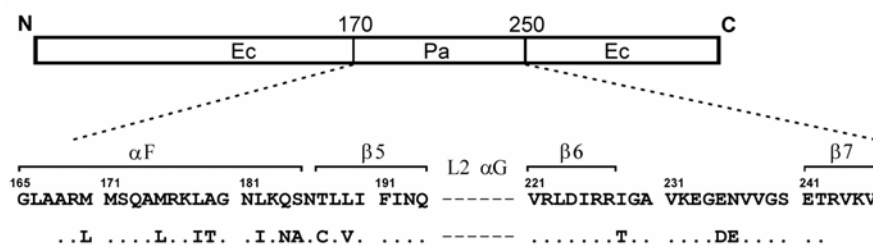


Рисунок 2. Структура химерного белка RecAX53. Внизу показан фрагмент выравнивания последовательностей белков RecAЕс (верхний ряд) и белка RecAPa (нижний ряд) с указанными в участке белка RecAPa а. к., отличающимися от а. к. белка RecAЕс (идентичные белку RecAЕс а. к. в белке RecAPa обозначены точками)

Химерный белок RecAX53 продемонстрировал наибольшую рекомбинационную активность среди всех химерных белков RecAX, охарактеризованных генетически (Bakhlanova *et al.*, 2001): ЧРО белков RecAЕс, RecAPa и RecAX53 в клетках *E. coli* соотносятся следующим образом: 1 : 6,5 : 8,9.

Химерные белки RecAX20, RecAX21 и RecAX53, так же как белки RecAЕс и RecAPa, не вызывают конститутивной индукции SOS-функций клетки, т.е. для белков RecAX21 и RecAX53 характерен SOS-независимый путь гиперрекомбинации (Bakhlanova *et al.*, 2001).

Нас заинтересовало, какие же рекомбинационно значимые биохимические характеристики лежат в основе повышенной рекомбиногенности химерных белков RecAX21 и RecAX53.

Поскольку химерные белки RecAX20 и RecAX21 различаются одной а. з., мы изучали свойства этих белков преимущественно друг относительно друга. Исследование биохимических характеристик химерного белка RecAX53 проводили в сравнении с белками-предшественниками RecAЕс и RecAPa.

Цель работы. Целью работы было выявление тех биохимических особенностей белков RecAX21 и RecAX53, которые лежат в основе их повышенной рекомбиногенности.

Задачи исследования:

- 1) создание экспрессионной системы для выделения и очистки белков RecAX20, RecAX21 и RecAX53;
- 2) сравнение биохимических свойств белков RecAX20 и RecAX21 и изучение биохимических характеристик белка RecAX53 относительно белков-предшественников RecAЕс и RecAPa по следующей схеме:

- выявление особенностей пресинаптических комплексов, формируемых химерными белками RecA;
- изучение характера взаимодействия химерных белков RecA с днДНК;

- исследование трансферазной активности в реакции переноса нити, катализируемой химерными белками RecA.

3) анализ полученных результатов и определение биохимических свойств белков RecAX21 и RecAX53, являющихся для них общими.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Белок RecAX20, отличающийся от белка RecAEc пятью а. з., по биохимическим характеристикам практически не отличается от белка RecAEc.
- 2) По сравнению с белками RecAX20 и RecAEc, белок RecAX21:
 - а) обладает пониженной скоростью гидролиза АТФ,
 - б) эффективнее конкурирует с белком SSB за связывание с онДНК,
 - в) эффективнее связывается с короткими онДНК,
 - г) медленнее диссоциирует с 5'-конца онДНК,
 - д) более эффективен в инициации переноса нити,
 - е) обладает неизменной стабильностью пресинаптических комплексов,
 - е) активнее связывается с днДНК.
- 3) По сравнению с белками RecAEc и RecAPa, гиперрекомбиногенный белок RecAX53:
 - а) обладает повышенной скоростью гидролиза АТФ,
 - б) эффективнее вытесняет белок SSB с онДНК,
 - в) активнее белка RecAEc, но менее эффективно, чем белок RecAPa, связывается с короткими онДНК,
 - г) характеризуется ускоренной диссоциацией с онДНК,
 - д) более активен в инициации реакции переноса нити,
 - е) обладает меньшей стабильностью пресинаптических комплексов,
 - ж) активнее связывается с днДНК.
- 4) Сравнительный анализ свойств белков RecAX21 и RecAX53 позволяет заключить, что их высокая рекомбиногенность обеспечивается:
 - а) эффективной конкуренцией с белком SSB за связывание с онДНК и
 - б) способностью к быстрой инициации реакции переноса нити.
- 5) Активное связывание химерных белков RecAX21 и RecAX53 с днДНК объясняет свойственный этим белкам SOS-независимый механизм гиперрекомбинации.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые выявлены характерные свойства химерных белков RecAX21 и RecAX53, лежащие в основе их повышенной рекомбиногенности. Выявлена корреляция между высокой рекомбиногенностью мутантных белков RecAX21 и RecAX53 и их повышенной агрессивностью в инициации реакции обмена гомологичными нитями ДНК, подтверждающая гипотезу о повышенной активности гиперрекомбиногенных белков именно на стадии инициации рекомбинационного обмена (Lanzov, 2002). Обнаружена связь между гиперрекомбиногенностью белков RecAX21 и

RecAX53 и их повышенной кинетической активностью. Предложена гипотеза о связи гиперрекомбиногенности белков RecA с изменениями в межмономерных взаимодействиях их нуклеопротеиновых филаментов. Найдена взаимосвязь между SOS-независимым механизмом гиперрекомбинации, свойственным белкам RecAX21 и RecAX53, и активным формированием этими белками нуклеопротеиновых филаментов на днднк.

Теоретическое и практическое значение работы. Проведенное исследование относится к числу фундаментальных. Оно позволило уточнить молекулярные механизмы, лежащие в основе гиперрекомбинации. Кроме фундаментальной роли, данное исследование может иметь и прикладной характер.

В перспективе гиперрекомбиногенные белки можно было бы использовать для повышения эффективности процедуры генетического модифицирования или даже генотерапии: создав конструкцию для временной экспрессии гиперрекомбиногенного белка RecA и введя ее в соматические клетки высших эукариот, можно было бы повысить (в норме низкую) частоту гомологической рекомбинации в клетке, увеличив тем самым эффективность адресной доставки генетического материала.

Точное знание структурно-функциональных взаимосвязей в белке RecA является необходимым условием для разработки новых антибиотиков, действие которых будет основываться на повышении эффективности известных антибактериальных препаратов путем ингибирования каких-либо функций белка RecA. Поскольку большинство антибиотиков вызывают повреждения ДНК, а репарация серьезных структурных повреждений ДНК (таких как одностранные бреши и двустранные разрывы ДНК) и восстановление репликации строго зависят от RecA, ингибиторы белка RecA могли бы усиливать эффективность антибиотиков (Wigle *et al.*, 2007). Белок RecA выполняет также основную роль в поддержании генетического разнообразия популяций и, в частности, в развитии устойчивости к антибиотикам. Одновременное применение ингибиторов белка RecA с антибиотиками смогло бы приостановить или даже воспрепятствовать развитию устойчивости бактерий к применяемым лекарствам.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на ежегодных конференциях молодых ученых Петербургского института ядерной физики (Гатчина, 1999–2001 гг.) и на XII Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2008 г.).

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 92 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальных результатов и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, содержащего 118 источников. Работа проиллюстрирована 23 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования: химерные белки RecAX20, RecAX21 и RecAX53. Для наработки перечисленных химерных белков использовали бактериальную экспрессионную систему на основе pET-векторов (Novogene, США). Химерные гены *recAX20*, *recAX21* и *recAX53* были перенесены из оригинальных плазмид pAK651-X20, pAK651-X21 и pUC19-X53 (Ogawa *et al.*, 1992) в экспрессионные векторы на основе pET-21b путем замещения фрагментов генов *recAPa* в векторе pET-21b-*recAPa* (Namsaraev *et al.*, 1998) (для *recAX20* и *recAX21*) и *recAEc* в векторе pET-21b-*recAEc* (Namsaraev *et al.*, 1998). Экспрессию химерных белков RecAX20, RecAX21 и RecAX53, а также контрольных белков RecAEc и RecAPa проводили в штамме BL21 (DE3) pLysS: $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^+) dcm gal (DE3) \Delta recA306$, несущем плазмиду pLysS. Штамм BL21 (DE3) входит в pET-экспрессионную систему (Novogene, США).

Выделение и очистку белков осуществляли по одной схеме, поскольку гены *recAEc*, *recAPa*, *recAX20*, *recAX21* и *recAX53* клонированы в вектор pET-21b. Белки RecA выделяли и очищали в три этапа. Обработанные лизаты клеток, содержащие экспрессированные белки RecA, осаждали полимином Р, проводили ионообменную хроматографию на предварительно подготовленном носителе – фосфоцеллюлозе P11 с последующей аффинной очисткой на колонке с онДНК-целлюлозой (Cox *et al.*, 1981).

RecA-зависимый гидролиз АТФ регистрировали по падению поглощения при 340 (или 380) нм с помощью спектрофотометрического метода, связывающего гидролиз АТФ с окислением NADH (Kowalczykowski *et al.*, 1987). Реакции проводили при 37 °С в 90 мкл буфера ТМД (25мМ Трис-НСl (рН7,5), MgCl₂ (1 или 10 мМ), 0,1 мМ ДТТ), содержащего 1 мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему (2 мМ фосфоенолпирувата, 30 единиц/мл пируват киназы, 0,56 мМ NADH (2,7 мМ NADH в реакциях с днДНК) и 30 единиц/мл L-лактат дегидрогеназы), а также ДНК, определенный белок RecA и (или) белок SSB в указанных концентрациях. ДНК-независимый гидролиз АТФ в высокосолевых условиях проводили с 1 мкМ белка RecA в буфере ТАМД (25 мМ Трис-ацетата (рН7,5), 17,5 мМ ацетата магния и 1 мМ ДТТ), содержащем 2 мМ АТФ, 1,8 М ацетата натрия и АТФ-регенерирующую систему, как указано выше.

Реакцию переноса нити, катализируемую белками RecAX20 и RecAX21 проводили при 37 °С в буфере ТМД, содержащем 4 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 10 мкМ кольцевой онДНК фага M13mp18 и 6 мкМ соответствующего белка RecA. Перед добавлением 1 мкМ белка SSB смесь инкубировали в течение трех минут при 37 °С. Для расплавления вторичных структур на онДНК реакцию инкубировали еще 2 минуты в присутствии белка SSB. Реакцию переноса нити инициировали добавлением 70 мкМ линейаризованной с помощью рестриктазы *EcoRI* днДНК M13mp18. В указанные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты и реакцию останавливали добавлением 5

мМ EDTA, 0,5 % SDS, 0,1 мг/мл протеиназы К с последующим инкубированием в течение получаса при 37 °С. Затем проводили электрофорез в 1%-ом агарозном геле, с последующим окрашиванием раствором 0,5 мкг/мл бромид этидия. Положение ДНК в геле анализировали с помощью системы Kodak DC120 и программного обеспечения KDSID 2.0 (Amersham).

Флуоресцентный метод анализа скорости инициации реакции переноса нити ДНК.

Реакцию проводили при 37 °С в буфере ТМД, содержащем 10 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 21 мкМ онДНК M13mp8 и 2 мкМ соответствующего белка RecA. Смесь (100 мкл) прогревали при указанной температуре 3 минуты с указанным белком RecA, добавляли 2 мкМ SSB, инкубировали еще 5 минут, и реакцию иницировали добавлением 0,3 мкМ двунитевого олигонуклеотида, меченного FAM (фосфорамидитом флуоресцина). В указанные времена из реакционной смеси отбирали аликвоты объемом 16 мкл, реакции в которых останавливали добавлением 1,6 мкл 0,9 % раствора SDS и охлаждением на льду. От белков в образцах избавлялись обработкой 0,1 мг/мл протеиназой К с последующим инкубированием в течение получаса при 37 °С. Образцы наносили в лунки 1%-ого агарозного геля и проводили электрофорез. Положение ДНК и интенсивность флуоресценции определяли с помощью Typhoon 9410 Variable Mode Imager и программного обеспечения TotalLab v1.10 (Phoretix).

Точность результатов. Все приведенные результаты являются усредненными, по меньшей мере, из трех независимых экспериментов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью метода наименьших квадратов, с учетом коэффициентов Стьюдента для заданной надежности $P=0,9$. Относительная погрешность результатов не превышала 10 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Скорости гидролиза АТФ, характерные для химерных белков RecAX21, RecAX20 и RecAX53. Как видно из таблицы 1, значения параметра k_{cat} , отражающего число гидролизованных белком молекул АТФ в единицу времени на единицу фермента (т.е. скорость гидролиза АТФ), для белков RecAEс, RecAX20 и RecA Pa практически одинаковы, как в присутствии онДНК, так и в условиях, имитирующих наличие онДНК - при 1,8 М ацетата натрия. Значение параметра k_{cat} , полученное для химерного белка RecAX21, оказалось на треть меньше, чем у остальных белков; а величина k_{cat} , определенная для белка RecAX53, почти в 1,5 раза превышала соответствующие величины, измеренные для белков RecAEс, RecAX20 и RecA Pa (табл. 1).

Химерный белок RecAX53 оказался первым мутантным белком RecA, обладающим значительно повышенной гидролитической активностью.

Пониженные значения параметра k_{cat} , характерные для белка RecAX21, свидетельствуют о влиянии а. з. L29M на функционирование АТФ-гидролизующего участка (Chen *et al.*, 2008).

Несмотря на отсутствие в белке RecAX53 а. з. в АТФ-связывающем и гидролизующем доменах, в соответствии с последними данными о взаимосвязи RecA-RecA, RecA-онДНК и RecA-АТФ (Chen *et al.*, 2008), повышенная гидролитическая активность белка RecAX53 может быть обусловлена влиянием а. з., находящихся в α -спирали F и в β -слое 5.

Таблица 1. Гидролиз АТФ, катализируемый белками RecAX20, RecAX21, RecAX53, RecAEc и RecAPa, в присутствии поли(дТ) и без ДНК, в 1,8 М ацетата натрия

RecA	k_{cat} на поли(дТ) ₃₆₀₀ ^a	k_{cat} в 1,8 М NaAc ^b
RecAEc	29,2 ± 2,2	30 ± 1,2
RecAX20	29,5 ± 1,8	30 ± 2,1
RecAX21	20 ± 1,5	18,5 ± 1,7
RecAX53	45,2 ± 2,2	43,0 ± 2,1
RecAPa	31,5 ± 2,9	31,2 ± 0,7

^a Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 10 мМ MgCl₂, 1мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 10 мкМ поли(дТ)₃₆₀₀ и 1 мкМ указанного белка RecA.

^b Реакционные смеси содержали ТАМД, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 1,8 М ацетата натрия и 1 мкМ указанного белка RecA

Аффинность химерных белков RecAX20, RecAX21 и RecAX53 к онДНК. Отличия в скоростях гидролиза АТФ, выявленные для белков RecAX21 и RecAX53, могут быть связаны с их измененной аффинностью к онДНК: белок RecAPa обладает повышенной аффинностью к онДНК, по сравнению с белком RecAEc (Namsaraev *et al.*, 1998).

Наиболее точно сродство белка RecA к онДНК характеризует параметр STMP (Salt Titration Mid Point) – та концентрация соли (например, NaCl), которая необходима для диссоциации половины пресинаптических комплексов, образованных белком RecA, чему соответствует падение первоначальной скорости гидролиза АТФ в два раза (Menetski *et al.*, 1988).

Таблица 2. Стабильность комплексов RecA::АТФ::онДНК: устойчивость к воздействию соли NaCl

	RecAEc	RecAX20	RecAX21	RecAX53	RecAPa
STMP (мМ NaCl)	375 ± 25	400 ± 30	345 ± 30	300 ± 30	600 ± 40

Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 1 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 5 мкМ поли(дТ)₃₆₀₀ и 0,5 мкМ RecA. По достижении максимальной для данного белка RecA скорости гидролиза АТФ в реакцию порционно титровали раствор 5М NaCl до конечной концентрации 50 мМ и регистрировали падение скорости гидролиза АТФ после каждого добавления раствора соли. Значения STMP определяли по концентрациям NaCl, соответствующим половинам начальных скоростей гидролиза АТФ

Как видно из табл. 2, концентрация NaCl, необходимая для разрушения половины пресинаптических комплексов, образованных белком RecAX21, практически совпадает со значениями STMP, полученными для белков RecAEс и RecAX20, и почти вдвое ниже, чем соответствующая белку RecAPa величина. Комплекс RecAX53::АТР::поли(дТ) оказался несколько менее устойчивым к действию ионов хлора, чем такой же комплекс, образованный белком RecAEс, и тем более, чем нуклеопротеиновые филаменты, образованные белком RecAPa.

Из полученных результатов следует, что по стабильности пресинаптических комплексов, образованных белком RecAX21, и его аффинности к онДНК этот химерный белок скорее ближе к белкам RecAEс и RecAX20, чем к белку RecAPa. Химерный белок RecAX53 обладает пониженной стабильностью нуклеопротеиновых филаментов к воздействию NaCl, по сравнению с белками RecAEс и RecAPa.

Вытеснение химерными белками RecAX21, RecAX20 и RecAX53 белка SSB с кольцевой онДНК. С появляющимися в клетке одностранными участками ДНК связывается белок SSB, защищающий их от действия нуклеаз и дальнейшего процессинга. Инициация рекомбинационного обмена возможна только при условии создания белком RecA активного нуклеопротеинового филамента на онДНК (пресинаптического комплекса), т.е. белок SSB должен быть вытеснен с онДНК. Белок RecAEс осуществляет эту реакцию с помощью вспомогательных белков. Белки RecA, обладающие повышенной рекомбиниогенностью (такие как RecAPa и RecA441), активнее белка RecAEс вытесняют белок SSB с онДНК (Namsaraev *et al.*, 1998; Lavery *et al.*, 1990; Madiraju *et al.*, 1992). Скорость формирования пресинаптического комплекса определяется, в значительной степени, скоростью вытеснения белка SSB белком RecA с онДНК. При этом быстрота вытеснения белка SSB с онДНК коррелирует со скоростью ассоциации белка RecA с онДНК (Lavery *et al.*, 1992).

На основании приведенных данных мы предположили, что химерные белки RecAX21 и RecAX53 будут отличаться от остальных белков по эффективности вытеснения белка SSB с онДНК и скорости ассоциации с онДНК.

Наиболее яркий результат для химерных белков RecAX20 и RecAX21 мы получили при концентрации ионов магния 1 мМ в реакционной смеси. Как показано на рис. 3А, белок RecAX21 активнее вытесняет белок SSB с онДНК, даже чем белок RecAPa. В данных условиях белки RecAEс и RecAX20 оказались вообще неспособными вытеснить белок SSB с онДНК. Белок RecAX53 также оказался более эффективным, чем белок RecAPa, в конкуренции с белком SSB за связывание с онДНК при концентрации ионов магния в реакционной смеси 10 мМ (рис. 3Б). При 1 мМ магния белок RecAX53 демонстрирует сходную с белком RecAEс активность в этом эксперименте.

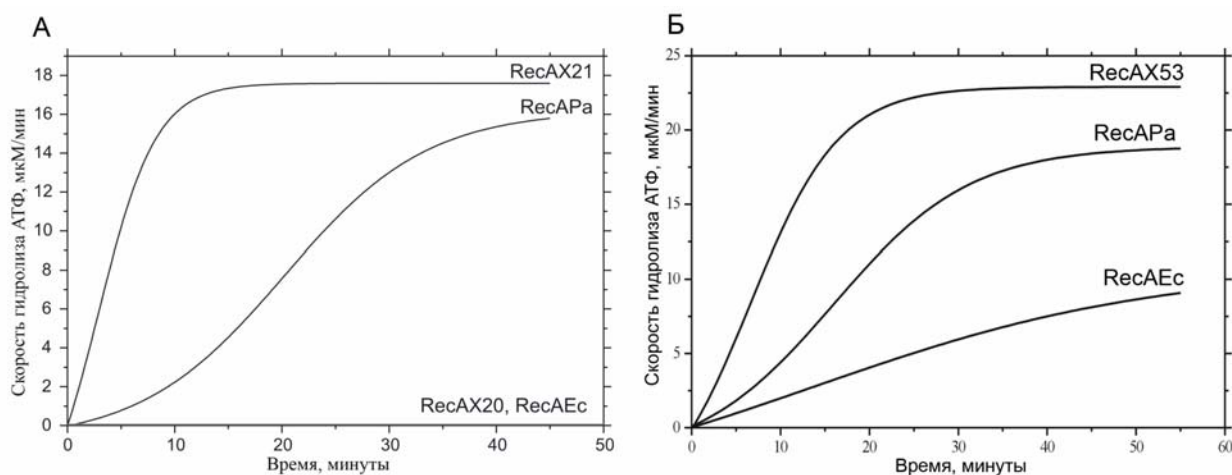


Рисунок 3. Кинетика вытеснения белка SSB с онДНК различными белками RecA: сравнение скоростей гидролиза АТФ. А. Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 1 мМ MgCl₂, 1мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 2 мкМ данного белка RecA, 3 мкМ кольцевой онДНК M13 и 0,6 мкМ SSB. Кольцевую онМ13 ДНК преинкубировали в реакционной смеси с белком SSB в течение двух минут, после чего реакцию инициировали добавлением указанного белка RecA. Б. Реакции проводили в тех же условиях, что и в А, за исключением того, что вместо 1 мМ MgCl₂ реакционные смеси содержали 10 мМ

Таким образом, химерные белки RecAX21 и RecAX53 быстрее вытесняют белок SSB с онДНК, чем белки RecAX20, RecAEc и даже RecAPa, и активнее образуют пресинаптические комплексы.

Формирование химерными белками RecAX20, RecAX21 и RecAX53 пресинаптических комплексов на коротких олигонуклеотидах. На способность белка RecA к полимеризации на онДНК влияет ее длина. Белок RecA становится полностью активной АТФазой только в том случае, когда он является частью кластера мономеров, связанных последовательно вдоль остова ДНК, превышающего по длине определенный размер – 10 мономеров (Bianco *et al.*, 1998).

Формирование белками RecA активных филаментов на коротких онДНК изучали с использованием коротких линейных онДНК – олиго(дТ). Наличие короткого одностороннего субстрата в реакционной смеси создает такие условия, при которых аффинность к онДНК и сила межмономерных взаимодействий, характерные для конкретного белка RecA, оказываются решающими факторами, влияющими на создание пресинаптических комплексов.

Как видно в рис. 4А, по эффективности образования нуклеопротеиновых филаментов на коротких олигонуклеотидах химерные белки RecAX20, RecAX21 и контрольные белки можно расположить следующим образом: RecAPa > RecAX21 > RecAX20 = RecAEc. Учитывая установленную ранее неизменную аффинность белка RecAX21 к онДНК, по сравнению с белками RecAX20 и RecAEc, лучшая способность белка RecAX21 к ассоциации с короткими олигонуклеотидами, по сравнению с теми же белками, свидетельствует об измененных межмономерных взаимодействиях. Полученный результат подтверждает предположение о влиянии а. з. L29M на межмономерные контакты в филаменте RecAX21.

Белок RecAX53 ведет себя сходным образом с RecAEc при использовании олиго(дТ) до 30 нуклеотидов длиной при 10 мМ MgCl₂ (рис. 4Б). Только начиная с 40-нуклеотидного олигонуклеотида, скорость гидролиза АТФ белка RecAX53 начинает превышать соответствующее значение белка RecAPa примерно в 1,2 раза. Поскольку k_{cat} белка RecAX53 в этих условиях примерно в 1,3 раза больше k_{cat} белков RecAEc и RecAPa, можно заключить, что на олигонуклеотидах до 30 нуклеотидов длиной включительно белок RecAX53 не способен создавать активный филамент. При 1 мМ MgCl₂ (рис. 4В) даже на 40-нуклеотидном субстрате белок RecAX53 не способен создавать активный филамент: его скорость гидролиза АТФ такая же, как и у белка RecAEc. А скорость гидролиза АТФ белка RecAPa на этом олигонуклеотиде превышает соответствующие значения белков RecAEc и RecAX53 в 2,6 раза.

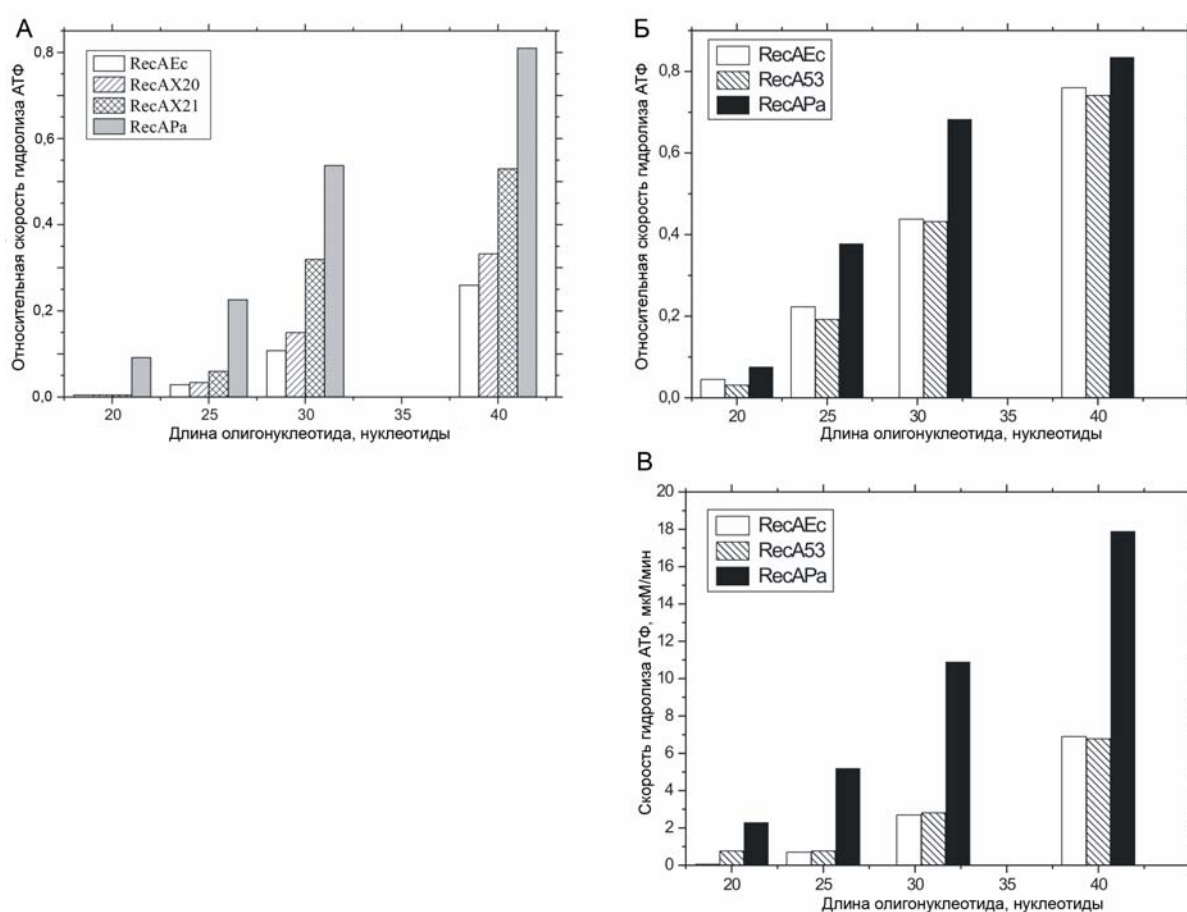


Рисунок 4. Связывание белков RecA с короткими олигонуклеотидами. **А.** Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 1 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 1мкМ анализируемого RecA и 100 мкМ олиго(дТ)_n, где n = 20, 25, 30, 40. Каждый столбец диаграммы показывает отношение средней максимальной скорости гидролиза АТФ данного белка RecA в комплексе с нуклеотидами указанной длины к максимальной скорости гидролиза АТФ с поли(дТ)₃₆₀₀. **Б.** Реакции проводили так же, как и в **А**, за исключением того, что вместо 1 мМ MgCl₂ реакционная смесь содержала 10 мМ. **В.** Реакции проводили так же, как и в **А**. По оси ординат указаны абсолютные максимальные скорости гидролиза АТФ, полученные для белков RecA на олигонуклеотидах указанных длин

Из полученных результатов следует, что, во-первых, при 10 мМ MgCl₂ характер связывания белка RecAX53 с короткими олигонуклеотидами такой же, как у белка RecAEc, а не у белка RecAPa, и, во-вторых, при 1 мМ MgCl₂ белок RecAX53 хуже, чем белок RecAEc,

формирует нуклеопротеиновые комплексы на коротких олигонуклеотидах. Эти данные свидетельствуют как о пониженной аффинности белка RecAX53 к онДНК (что находится в соответствии с результатами по STMP), так и об измененных (по сравнению с белком RecAEс) межмономерных взаимодействиях в филаментах этого белка.

Диссоциация химерных белков RecAX20, RecAX21 и RecAX53 с конца линейной онДНК. Филаменты RecA, сформированные на замкнутой онДНК, стабильны до тех пор, пока регенерируется АТФ. А филаменты RecA, образованные на линейной онДНК, подвергаются 5'-концевой разборке (Shan *et al.*, 1997). Диссоциация мономеров с 5'-конца онДНК строго АТФ-зависима: для осуществления реакции необходим гидролиз АТФ (Shan *et al.*, 1997). В присутствии белка SSB процессы диссоциации преобладают над процессами ассоциации мономеров RecA с онДНК, поскольку со свободными участками ДНК связывается белок SSB.

В эксперименте по конкуренции с белком SSB за связывание с онДНК химерные белки RecAX21 и RecAX53, наряду с активным вытеснением белка SSB с замкнутой онДНК, продемонстрировали ускоренную ассоциацию с онДНК. Мы предположили, что скорости диссоциации этих белков с конца онДНК также будут отличаться от соответствующих значений, определенных для белков RecAX20, RecAEс и RecAPa.

Диссоциацию мономеров RecA с конца онДНК (или разборку филаментов RecA) измеряли в эксперименте, в котором белок RecA вытесняется белком SSB с поли(дТ) (Lavery *et al.*, 1990). Этот опыт основан на том факте, что белок SSB характеризуется большим сродством к поли(дТ), чем белок RecA (Kowalczykowski *et al.*, 1987). В присутствии АТФ белок RecA создает активный филамент на онДНК. Добавление к уже сформированному комплексу RecA : : АТФ : : поли(дТ) белка SSB приводит к вытеснению мономеров RecA с онДНК, т.е. к разборке филамента RecA, что можно видеть, например, по падению скорости гидролиза АТФ. Кинетику разборки филаментов характеризуют параметром τ - периодом полураспада комплексов RecA : : АТФ : : поли(дТ).

Как видно в табл. 3, комплексы, образованные белками RecAEс и RecAX20,обладают одинаковой устойчивостью к вытеснению белком SSB с поли(дТ). Как и ожидалось, ввиду высокой аффинности белка RecAPa к онДНК (Namsaraev *et al.*, 1998; Baitin *et al.*, 2003), белок RecAPa не вытеснялся белком SSB с поли(дТ) ни при 1, ни при 10 мМ ионов магния в реакционной смеси. Филаменты, образованные химерным белком RecAX21 на поли(дТ) при 1 мМ MgCl₂, оказались более устойчивыми к вытеснению белком SSB, чем белки RecAEс и RecAX20, но менее, чем белок RecAPa (табл. 3). При 10 мМ MgCl₂ пресинаптические филаменты RecAX21 обладают такой же устойчивостью к вытеснению белком SSB с поли(дТ), как и нуклеопротеиновые филаменты белка RecAPa. В этом эксперименте белок RecAX21 оказался ближе к белку RecAPa.

Сравнивая полученные для химерного белка RecAX53 и его белков-предшественников RecAEс и RecAPa периоды полураспада комплексов RecA : : АТФ : : поли(дТ) τ (табл. 3), легко

видеть, что комплексы RecAX53 : : АТФ : : поли(дТ), при добавлении к ним белка SSB, распадаются даже быстрее, чем комплексы, образованные белком RecAEc.

Таблица 3. Устойчивость белков RecA к вытеснению белком SSB с поли(дТ)

	τ^* , минуты	
	1 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
RecAEc	< 1	4,5
RecAX20	< 1	4,5
RecAX21	5,5 ^a	> 30
RecAX53	< 1	3
RecAPa	> 30	> 30

*Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем указанные концентрации MgCl₂, 1мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 3 мкМ поли(дТ), 0,75 мкМ белка RecA и 0,6 мкМ белка SSB. После того, как скорость гидролиза АТФ белка RecA в комплексе с поли(дТ) и АТФ становилась постоянной, в реакцию добавляли белок SSB и регистрировали падение скорости гидролиза АТФ. Значения τ рассчитывали по аппроксимации данных методом наименьших квадратов к экспоненциальному распаду

На скорость разборки нуклеопротеиновых филаментов в данной системе влияют как аффинность к онДНК, так и прочность самого филамента RecA, т.е. сила межмономерных взаимодействий. Это означает, что либо аффинность к поли(дТ) у белка RecAX53 даже ниже, чем у RecAEc, либо сила межмономерных контактов меньше, либо и то, и другое вместе. Этот эксперимент согласуется с экспериментом по определению величины STMP, в том смысле, что в них проверяется стабильность комплексов RecA::АТФ::поли(дТ). В первом случае конкуренция с более аффинным к поли(дТ) белком SSB приводит к разборке филамента, а во втором – действие ионов NaCl приводит к ослаблению взаимодействий внутри нуклеопротеинового комплекса, но в обоих случаях результатом этих воздействий является диссоциация мономеров RecA с 5'-конца поли(дТ), необратимая в первом случае (Shan *et al.*, 1997). Таким образом, этот эксперимент еще раз подтверждает, что белок RecAX53 обладает низкой аффинностью к онДНК (в этом свойстве он подобен белку RecAEc) и, возможно, ослабленными межмономерными взаимодействиями.

Химерный белок RecAX21 обладает сходной с белками RecAX20 и RecAEc аффинностью к онДНК и содержит а. з. в интерфейсе межмономерных взаимодействий. Следовательно, именно изменения в межсубъединичных взаимодействиях RecAX21 лежат в основе замедленной, по сравнению с белками RecAX20 и RecAEc, разборки его филаментов.

Возможно, замедленная скорость диссоциации с онДНК, выявленная для химерного белка RecAX21, предопределяет характерные для него более низкие значения ЧРО, по сравнению с химерным белком RecAX53. А высокая кинетическая активность химерного

белка RecAX53 (он активно создает пресинаптические комплексы на онДНК и быстро покидает онДНК), по сравнению с белком RecAX21, позволяет ему чаще инициировать рекомбинационные обмены.

Эффективность химерных белков RecAX21 и RecAX20 в реакции переноса нити ДНК. Белки RecA441 и RecAPa, характеризующиеся SOS-независимым способом повышения ЧРО, проводят реакцию переноса нити сходным образом (Namsaraev *et al.*, 1998; Lavery *et al.*, 1990). По сравнению с белком RecAEс, оба эти белка являются более активными в формировании сцепленных молекул, но менее эффективными в завершении реакции переноса нити между линейной днДНК фага M13 и кольцевой онДНК того же фага (образовании конечного продукта реакции – никированной кольцевой днДНК) (Namsaraev *et al.*, 1998; Lavery *et al.*, 1990).

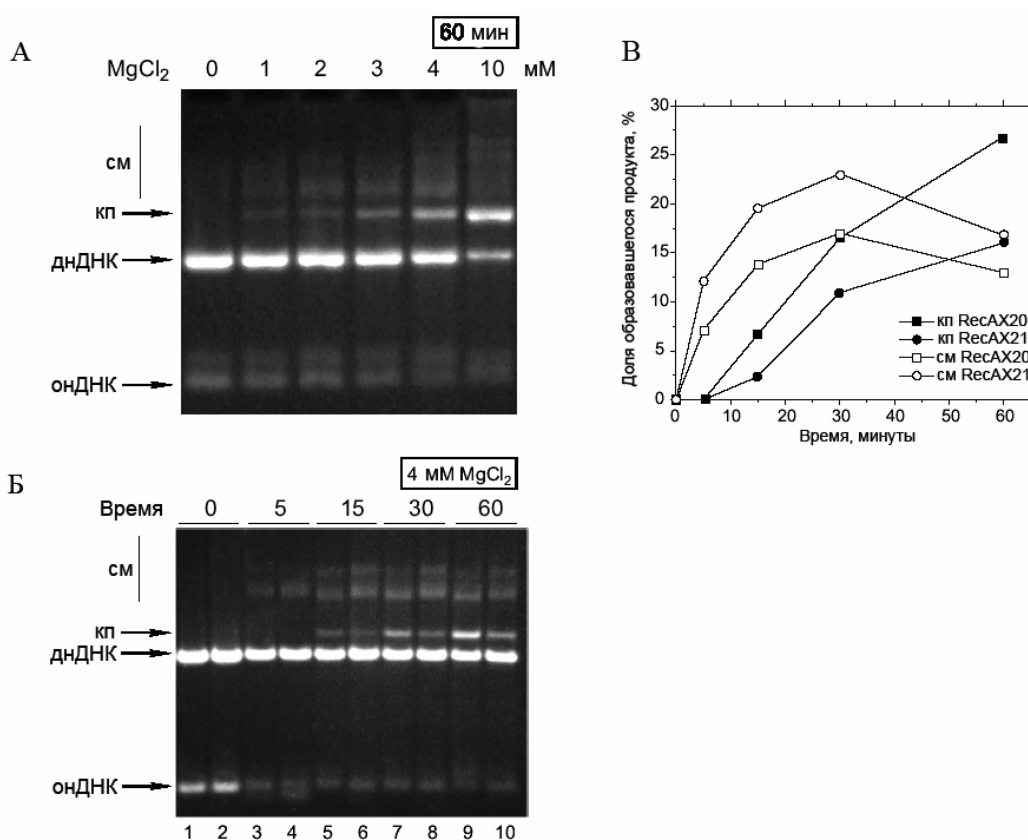


Рисунок 5. Реакция переноса нити: разделение в агарозном геле исходных компонентов реакции (кольцевой онДНК M13 и линейной днДНК M13) и продуктов реакции (сцепленных молекул (см) и конечных продуктов (кп) – кольцевых никированных днДНК M13). А. Доля см и кп в зависимости от концентрации ионов магния в реакции. Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем указанные концентрации MgCl₂, 1 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 10 мкМ онДНК M13 mp18, 1 мкМ SSB, 6 мкМ RecAEс и 18 мкМ днДНК M13. Б. Кинетика реакции переноса нити, катализируемой белком RecAX20 (нечетные дорожки) и белком RecAX21 (четные дорожки) при 4 мМ MgCl₂. Реакции проводились в тех же условиях, что и в А, только концентрация днДНК M13 была 70 мкМ, а белков RecA – по 6 мкМ. В. Относительные количества см и кп при анализе фотографии геля, представленного в Б, были рассчитаны, как описано в разделе «Материалы и методы»

Проведение реакции переноса нити с химерными белками RecAX20 и RecAX21 предварили подбором условий реакции, при которых сцепленные молекулы и конечные продукты были бы наиболее хорошо различимы. Реакции проводили на примере белка

ResAЕс, а условия подбирали, варьируя концентрацию ионов магния в реакционной смеси (рис. 5А). На рисунке 5А видно, что в реакции переноса нити, осуществляемой белком ResAЕс, преобразование сцепленных молекул в конечные продукты происходит медленно и наиболее хорошо различимо при 4 мМ MgCl₂.

На рисунке 5Б показана кинетика реакции переноса нити, проводимой белками ResAX20 и ResAX21 в выбранных условиях – при 4 мМ MgCl₂. Оценку эффективности образования сцепленных молекул и конечных продуктов реакции проводили посредством сканирования агарозных гелей и анализа полученных фотографий с помощью программного обеспечения KDSID 2.0 (рис. 5В). Как и ожидалось, белок ResAX21 оказался более эффективным в формировании сцепленных молекул, по сравнению с белком ResAX20, но менее активным в образовании конечных продуктов реакции – никированных кольцевых днднк (рис. 5Б, В).

В реакции переноса нити, осуществляемой химерным белком ResAX53, не удалось обнаружить его преимуществ, даже по сравнению с белком ResAЕс.

Белок ResAX53 активнее белков ResAЕс и ResAPa инициирует реакцию переноса нити. В предыдущем эксперименте не удалось выявить преимуществ химерного белка ResAX53 перед гиперрекомбиногенным белком ResAPa. Мы провели другой эксперимент, направленный на выявление разницы в осуществлении гомологичного обмена нитей ДНК между химерным белком ResAX53 и белками ResAЕс и ResAPa.

Как известно, основными этапами реакции переноса нити между филаментом ResA и гомологичной днднк являются спаривание и процесс обмена гомологичными нитями ДНК. Обе фазы реакции можно зарегистрировать с помощью флуоресцентного метода с использованием онднк и флуоресцентно-меченного двунитевого олигонуклеотида, комплементарного онднк.

При взаимодействии пресинаптического комплекса, образованного белком ResA на кольцевой онднк M13mp18, с комплементарным 34-мерным двунитевым олигонуклеотидом с тупыми концами, FAM-меченным по одному из 5'-концов, происходит спаривание и перенос флуоресцентно-меченной нити олигонуклеотида на кольцевую онднк M13mp18 (рис. 6А).

Как показано на рис. 6Б, в присутствии в реакционной смеси избытка онднк M13 (21 мкМ), по сравнению с концентрацией белка ResA (2 мкМ), белок ResAX53 оказался намного эффективнее (почти в 1,5 раза) белков ResAЕс и ResAPa в катализе реакции переноса нити между коротким двунитевым и замкнутым одностранным ДНК-субстратами. В условиях избытка онднк значительная ее фракция может быть не связана белком ResA в участке, комплементарном двунитевому олигонуклеотиду. И реакция обмена между гомологичными нитями ДНК не наступит до тех пор, пока белок ResA не сформирует нуклеопротеиновый филамент в участке онднк, гомологичном двунитевому олигонуклеотиду, что требует этапов сборки и разборки филамента. Полученный результат означает, что химерный мутант ResAX53 осуществляет необходимое перераспределение филамента быстрее белков ResAЕс и

RecAPa. С другой стороны, в условиях избытка белка RecA (14 мкМ) по сравнению с концентрацией онДНК (21 мкМ), все исследуемые белки RecA осуществляют перенос нити практически с одинаковой эффективностью (рис. 6В).

Полученные результаты подтверждают предположение о том, что химерный белок RecAX53 более агрессивен в инициации реакции переноса нити, чем белки RecAEc и RecAPa.

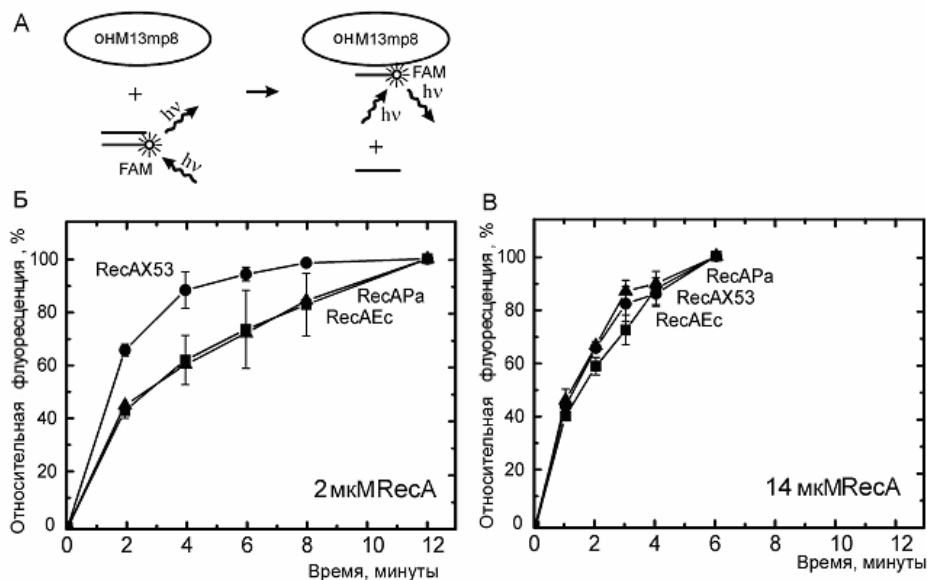


Рисунок 6. Агрессивность белка RecAX53 в инициации реакции переноса нити. А. Схема электрофорез-флуоресцентного метода. Б и В – кинетики реакций переноса нити белков RecAX53, RecAEc и RecAPa. Все реакции проводили при 37 °С в буфере ТМД, содержащем 10 мМ хлорида магния, 2 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 2 мкМ белка RecA (Б) или 14 мкМ (В) белка RecA и 21 мкМ онДНК М13 mp18. Пресинаптические комплексы RecA::АТФ::М13mp8 онДНК формировались в присутствии 2 мкМ белка SSB. В момент времени 0 0,3 мкМ 34-мерных дн-олигонуклеотидов добавляли в реакционную смесь и отбирали в указанные моменты времени аликвоты, анализируемые впоследствии по интенсивности флуоресценции ДНК в агарозном геле. Флуоресценцию завершенных реакций переноса (плато на графиках) принимали за 100 условных единиц. Флуоресценцию образцов нормировали на эту величину

Связывание химерных белков RecAX20, RecAX21 и RecAX53 с днДНК. Известно, что сайты связывания репрессора LexA и днДНК в белке RecA перекрываются (Chen *et al.*, 2008). Как упоминалось выше, для белка RecAPa характерен SOS-независимый путь гиперрекомбинации. В тоже время, белок RecAPa активнее образует нуклеопротеиновые филаменты на днДНК, чем белок RecAEc (Namsaraev *et al.*, 1998). На основании этих данных мы предположили, что химерные белки RecAX21, RecAX20 и RecAX53 могут отличаться от белков RecAEc и RecAPa по характеру связывания с днДНК.

При наличии односторонних участков в днДНК, белок RecA в первую очередь связывается с ними, а затем медленно распространяется на двусторонние участки (Pugh *et al.*, 1987). Реакция связывания белка RecA с днДНК pH-зависима: при pH = 6,3 реакция происходит заметно быстрее, чем при физиологических значениях pH (7,5) (Kowalczykowski *et al.*, 1987, Pugh *et al.*, 1987). Наиболее ярко различия между белками RecAEc и RecAPa в образовании нуклеопротеиновых филаментов на днДНК были обнаружены при субоптимальных условиях: pH=7,5 (Namsaraev *et al.*, 1998), поэтому сравнение химерных белков RecAX21 с RecAX20 и

химерного белка RecAX53 с белками-предшественниками по связыванию с днднк проводили при указанном рН. В предыдущих экспериментах наибольшую разницу между химерным белком RecAX21 и белками RecAX20, RecAЕс и RecАРа обнаруживали при содержании хлорида магния 1 мМ в реакционных смесях, поэтому ассоциацию этих белков с днднк проверяли в этих же условиях. Химерный белок RecAX53, напротив, демонстрировал низкую активность при 1 мМ MgCl₂ в предыдущих экспериментах. Обнаружить преимущества этого белка, в сравнении с белком RecАРа, удалось только при 10 мМ MgCl₂, поэтому эксперимент по изучению связывания белка RecAX53 с днднк проводили при 10 мМ MgCl₂.

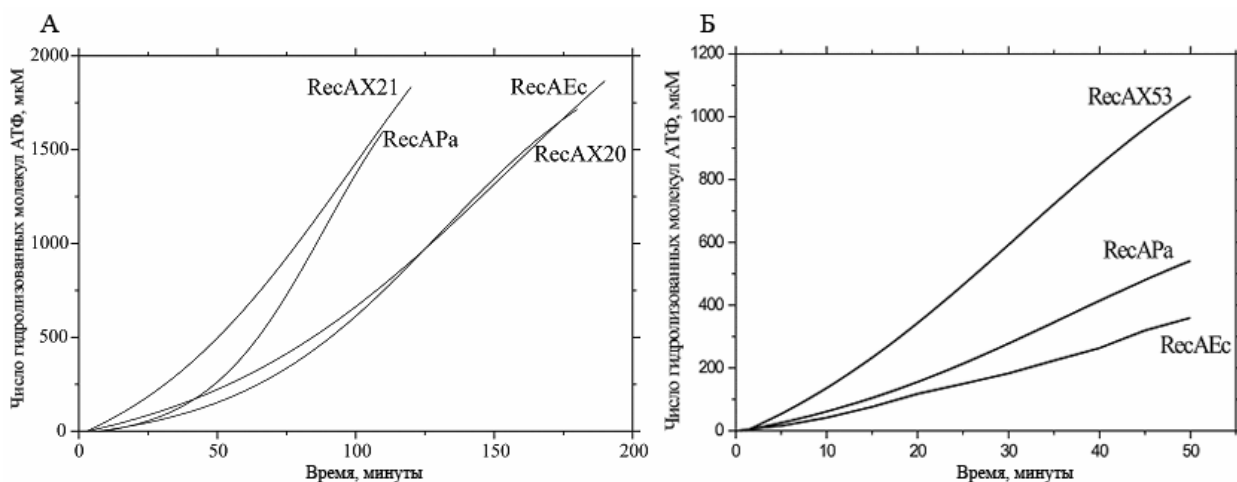


Рисунок 7. Связывание белков RecA с линейной днднк. А. Реакции проводили в ТМД, содержащем 1 мМ MgCl₂, 1,5 мМ АТФ, АТФ-регенерирующую систему, 8,4 мкМ днднк M13mp18, линеаризованной по *Eco* RI, и 3 мкМ белка RecA. Б. Реакции проводили, как в А, только при 10 (вместо 1) мМ MgCl₂. На графиках представлены зависимости числа гидролизованных молекул АТФ от времени для каждого белка RecA

Как видно в рис.7А, химерный белок RecAX21 является наиболее активным в ассоциации с днднк: он быстрее других белков преодолевает фазу медленной нуклеации и обладает практически такой же максимальной скоростью гидролиза АТФ, как и у белка RecАРа. При этом максимальные скорости гидролиза АТФ, характеризующие связывание белка RecA с днднк, оказались у белков RecAX20 и RecAЕс практически одинаковыми. Таким образом, по характеру связывания с днднк белок RecAX21 похож на белок RecАРа, а химерный белок RecAX20 – на белок RecAЕс.

Химерный белок RecAX53 также быстрее связывается с днднк, чем белок RecАРа и, тем более, чем белок RecAЕс (рис. 7Б). Таким образом, химерный белок RecAX53 превосходит белок RecАРа по эффективности ассоциации с днднк.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Химерный белок RecAX21, отличающийся от химерного белка RecAX20 всего одной а. к. L29M и характеризующийся повышенной почти в 3 раза рекомбиногенностью, обладает свойствами, способными объяснить характерную для него повышенную рекомбинационную активность: он эффективно вытесняет белок SSB с онДНК, быстро формируя пресинаптические комплексы, и активно образует интермедиаты в реакции переноса нити, т.е. белок RecAX21 более активен на стадии инициации рекомбинационного обмена. При этом химерный белок RecAX21 эффективнее белка RecAX20 образует пресинаптические комплексы на коротких однонитевых ДНК-субстратах и медленнее диссоциирует с онДНК, что указывает на измененные межмономерные контакты в филаменте этого белка.

Активность химерного белка RecAX20 во всех проведенных исследованиях была практически такой же, как и у белка RecAЕс, несмотря на различия в 5 а. к. Совокупность перечисленных фактов позволяет утверждать, что именно а. з. L29M в сайте межмономерных взаимодействий приводит к повышению рекомбиногенности белка RecAX21.

Наиболее гиперрекомбиногенный белок RecA, известный к настоящему времени, - химерный белок RecAX53, обладает следующими характеристиками, позволяющими обосновать свойственную ему гиперрекомбиногенность: он эффективно вытесняет белок SSB с онДНК и является очень активным на стадии инициации рекомбинационного обмена. Кроме этого, химерный белок RecAX53 оказался более динамически активным, чем белки-предшественники RecAЕс и RecAPa: он быстрее ассоциирует с онДНК, чем белок RecAPa и быстрее белка RecAЕс диссоциирует с онДНК. Поскольку химерный белок RecAX21 медленнее диссоциирует с онДНК (при высокой скорости ассоциации с онДНК), чем белок RecAЕс (но быстрее, чем белок RecAPa), мы предполагаем, что именно высокая динамичность белка RecAX53 позволяет ему чаще инициировать рекомбинационные обмены, по сравнению с химерным белком RecAX21.

Химерный белок RecAX53 содержит 12 а. з. в центральном домене, по сравнению с белком RecAЕс: M170L, M175L, L178I, A179T, L182I, Q184N, S185A, T187C, L189V, I228T, E236D, N237E (Ogawa *et al.*, 1992). Среди перечисленных аминокислотных позиций есть одна, непосредственно задействованная в межмономерных контактах (Chen *et al.*, 2008): M170L, а а. з. M175L и L178I соседствуют с а. к., участвующими в межпротомерных взаимодействиях (174, 176 и 177).

На основании анализа рекомбинационных свойств химерных белков RecAX21 и RecAX53, а также ввиду установленного факта, свидетельствующего о том, что гиперрекомбиногенность химерного белка RecAX21 тоже обусловлена измененными межмономерными взаимодействиями, мы предполагаем, что именно измененные межпротомерные контакты, характерные для этих химерных белков, являются структурной основой их повышенной рекомбиногенности.

ВЫВОДЫ

- 1) Химерный белок RecAX20, отличающийся от белка RecAEc пятью а. з., по биохимическим характеристикам практически не отличается от белка RecAEc.
- 2) Химерный белок RecAX21, отличающийся от белка RecAX20 единственной а. з. L29M, по сравнению с белками RecAX20 и RecAEc:
 - а) эффективнее конкурирует с белком SSB за связывание с онДНК;
 - б) активнее формирует интермедиаты в реакции переноса нити;
 - в) наиболее эффективен во взаимодействии с днДНК;
 - г) обладает измененными межмономерными взаимодействиями.
- 3) Химерный белок RecAX53, по сравнению с белками RecAEc и RecAPa, обладает:
 - а) повышенной скоростью гидролиза АТФ;
 - б) более активной ассоциацией и диссоциацией с онДНК;
 - в) более эффективной конкуренцией с белком SSB за связывание с онДНК;
 - г) более активным связыванием с днДНК;
 - д) меньшей стабильностью пресинаптических комплексов;
 - е) наиболее активен в инициации реакции обмена гомологичными нитями ДНК.
- 4) Высокая рекомбиногенность химерных белков RecAX21 и RecAX53 обеспечивается:
 - а) эффективной конкуренцией с белком SSB за связывание с онДНК и
 - б) способностью к быстрой инициации реакции переноса нити.
- 5) Активное связывание белков RecAX21 и RecAX53 с днДНК объясняет свойственный им SOS-независимый механизм гиперрекомбинации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Chervyakova D.**, Kagansky A., Petukhov M. and Lanzov V. 2001. [L29M] substitution in the interface of subunit-subunit interactions enhances *Escherichia coli* RecA protein properties important for its recombinogenic activity. *J. Mol. Biol.* **314**: 923-35.
2. Baitin D., Bakhlanova I., **Chervyakova D.**, Kil Y., Lanzov V. and Cox M. 2008. Two RecA protein types that mediate different modes of hyperrecombination. *J. Bacteriol.* **190**(8): 3036–3045.
3. **Червякова Д.** и Ланцов В. 2008. «Гиперрекомбиногенность химерного белка RecAX53 (*Escherichia coli/Pseudomonas aeruginosa*) определяется его повышенной динамичностью». *Экологическая генетика*. VI (4): 47-54.
4. **Червякова Д.** и Ланцов В. 2008. «Функциональные особенности химерного белка RecAX53 (*Escherichia coli/Pseudomonas aeruginosa*), лежащие в основе его гиперрекомбиногенности». *Сборник тезисов 12-ой конференции «Биология Нука XXI века»*. С. 113.

5. **Червякова Д.**, Каганский А. 2000. Биохимические свойства химерного белка RecAX21(*E.coli/P.aeruginosa*), определяющие его повышенную рекомбиногенность. *Сборник работ конференции молодых ученых ПИЯФ*.
6. **Червякова Д.** 2002. Биохимические свойства химерного белка RecAX53, определяющие его гиперрекомбиногенность. *Сборник работ конференции молодых ученых ПИЯФ*.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ланцов В. 2007. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК. *Молекулярная биология*. **41**(3): 1-12.
2. Baitin D., Zaitsev E. and Lanzov V. 2003. Hyper-recombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* with enhanced activity of its primary DNA binding site. *J.Mol.Biol.* **328**:1-7.
3. Bakhlanova I., Ogawa T., Lanzov V. 2001. Recombinogenic activity of chimeric recA genes (*Pseudomonas aeruginosa*/*Escherichia coli*): a search for RecA protein regions responsible for this activity. *Genetics*. **159**(1): 7-15.
4. Bianco P. and Weinstock G. 1998. 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*. **3**: 79-97.
5. Chen Z, Yang H, Pavletich N.. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*. May 22; **453**: 489-4.
6. Cox M., McEntee K. and Lehman I. 1981. A simple and rapid procedure for the large scale purification of the RecA protein of *Escherichia coli*. *JBC*. **256**(9): 4676.
7. Cox M. 2007. Regulation of Bacterial RecA Protein Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **42**: 41–63.
8. Lanzov, V. 2002. Hyper-recombination in *Escherichia coli* with and without SOS response. *In Recent Research Development in DNA repair and Mutagenesis*. P.: 21-38. (M. Ruiz-Rubio, E. Alejandro-Duran, and T. Roldan-Arjona, Eds). India: Kerala, Research Signpost.
9. Kowalczykowski S., Clow J., Somani R., 1987. 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*. Jan 5; **193**(1): 81-95.
10. Lavery, P., and Kowalczykowski, S. 1990. Properties of RecA441 protein-catalyzed DNA strand exchange can be attributed to an enhanced ability to compete with SSB protein. *J. Biol. Chem.* **265**: 4004-10.
11. Lavery P., Kowalczykowski S. 1992. Biochemical basis of the constitutive repressor cleavage activity of recA730 protein. A comparison to recA441 and recA803 proteins. *J Biol Chem*. Oct 15; **267**(29): 20648-58.

12. Madiraju M., Lavery P., Kowalczykowski S. and Clark A. 1992. Enzymatic properties of the RecA803 protein, a partial suppressor of *recF* mutations. *Biochemistry*. **31**: 10529–10535.
13. Menetski J., Varghese A. and Kowalczykowski S. 1988. Properties of the high affinity single-stranded DNA binding state of the Escherichia coli RecA protein. *Biochemistry*. P.: 1205-1212.
14. Namsaraev E., Baitin D., Bakhlanova I., Alexseyev A., Ogawa H. and Lanzov V. 1998. Biochemical basis of hyper-recombinogenic activity of *Pseudomonas aeruginosa* RecA protein in Escherichia coli cells. *Mol. Microbiol.* **27**: 727-38.
15. Ogawa T., Shinohara A., Ogawa H., Tomizawa J. 1992. Functional structures of the recA protein found by chimera analysis. *J Mol Biol.* **226**(3): 651-60.
16. Shan Q., Bork J., Webb B., Inman R. and Cox M. 1997. RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *J. Mol. Biol.* **265**: 519-40.
17. Story R., Weber I., Steitz T. 1992. The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. *Nature*. **355**: 318-325.
18. Story R. and Steitz T. 1992a. Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature*. **355**: 374.
19. Wigle T., Singleton S. 2007. Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **17**(12): 3249-53.