

РЕКОМБИНОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БЕЛКОВ RecA: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПОСЛЕДСТВИЯ ДЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

© И. В. Бахланова,^{1,2} Д. М. Байтин^{1,2,*}

¹ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, 195251, и

² Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл., 188300;

* электронный адрес: dimabaitin@yahoo.com; ibakh2003@mail.ru

Обзор посвящен проблеме контроля гомологической рекомбинации в бактериальной клетке. Обсуждаются возможные способы повышения рекомбиногенности рекомбиназы А и последствия гиперрекомбинации для клетки. Белок RecA — центральный фермент гомологичной рекомбинации в бактериальной клетке. Образуя правозакрученный спиральный филамент на оцДНК, он обеспечивает поиск гомологии между двумя молекулами ДНК и обмен гомологичных нитей. Белок RecA не только защищает клетку от воздействия ионизирующей радиации и УФ-облучения, но также может полностью осуществлять рекомбинационный процесс в ходе нормального клеточного роста. Эволюция рекомбиногенных свойств ограничена возможностями метаболизма других систем клетки. Увеличение рекомбиногенности возможно искусственно, но это негативно отражается на репликативном аппарате и клеточном делении. Таким образом, уровень природной рекомбиногенности представляет собой эволюционный компромисс между позитивными и негативными сторонами рекомбинации.

Ключевые слова: рекомбиназа, АТФаза, RecA, SOS-ответ.

Принятые сокращения: УФ-облучение — ультрафиолетовое облучение, оцДНК — одноцепочечная ДНК, дцДНК — двухцепочечная ДНК.

Ферменты гомологической рекомбинации найдены во всех трех царствах живых организмов, хотя и называются по-разному — RecA у Bacteria, RadA у Archaea и Rad51 у Eukarya (Brendel et al., 1997). Все три белка — аналоги, состоящие из трех доменов (N-концевого, центрального и C-концевого) и сохраняющие существенную структурную гомологию лишь в центральном домене. Наиболее изученным из перечисленных белков является белок RecA из *Escherichia coli* (RecA_{Ec}). Особую актуальность изучение структурно-функциональной организации белка RecA приобрело в свете данных об универсальности структуры нуклеопротеинового филамента, образуемого RecA-подобными белками. Молекулярный механизм обмена нитей между гомологичными молекулами ДНК аналогичен для про- и эукариот. Таким образом, данные, полученные при изучении бактериального белка RecA, могут быть полезны для исследования механизмов рекомбинации и репарации у высших организмов, включая человека. В частности, последние исследования выявили, что молекулярные ингибиторы белка RecA могут быть также эффективны при подавлении Rad51-зависимой гомологической рекомбинации в эукариотической клетке и, следовательно, в терапии онкологических заболеваний (Huang et al., 2011). Вместе с тем значимость исследования прокариотических рекомбиназ отнюдь не ограничена использованием их как модельной системы

для белка Rad51. Важной целью обзора является обсуждение потенциала рекомбиногенности, заложенного в белке RecA, и причин ее природного ограничения. Белок RecA функционально участвует в общей резистентности патогенных бактерий к действию антибактериальных препаратов и является активатором бактериального SOS-ответа. Поэтому он является удачной мишенью для химических соединений и пептидных ингибиторов, потенциально способных блокировать бактериальный SOS-ответ (Alam et al., 2016).

Энзиматический контроль гомологической рекомбинации

Белок RecA — центральный фермент гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации. Структура и функции RecA сохраняют высочайшую консервативность среди бактерий. Белок RecA необходим для осуществления рекомбинационной репарации ДНК бактерий, а также для восстановления синтеза ДНК в местах вынужденной остановки репликативной вилки, произошедшей в ходе нормального клеточного роста. Рекомбиназная активность белка RecA являлась предметом пристального изучения *in vivo* и *in vitro* на протяжении более 30 лет. Наиболее изученной является система гомо-

логической рекомбинации клеток *E. coli* (Roca et al., 1990; Cox et al., 2000; Kowalczykowski et al., 2000; Cox, 2007). При УФ-облучении клеток *E. coli* образуются одонитевые разрывы ДНК, которые восстанавливаются при непосредственном участии белка RecA. При действии на клетку ионизирующей радиации RecA осуществляет репарацию двухнитевых разрывов. Главная функция белка RecA — поиски гомологии между двумя молекулами ДНК и обмен гомологичных нитей. Этому этапу предшествует пресинаптическая стадия, в ходе которой RecA в присутствии молекулы АТФ и магния кооперативно мультимеризуется вдоль одноцепочечной ДНК (оцДНК) (Menetski et al., 1988). 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. При этом изменяется экспрессия более 40 генов, в том числе и самого гена *recA*. Белки, которые экспрессируются в ходе SOS-ответа, участвуют почти во всех метаболических путях клетки. Среди них есть такие, которые участвуют в регуляции клеточного деления (SfiA (SulA)), обеспечивают метаболизм ДНК в ходе репликации и репарации (SSB, polV и UvrD), обеспечивают экзотоксическое действие на окружающие бактерии (collicin) (Glazebrook et al., 1983; Schoemaker et al., 1984). Некоторые белки и белковые комплексы входят в непосредственное взаимодействие с филаментом RecA. Эти белки регулируют активность филамента через белок-белковые взаимодействия. В настоящее время известно около десятка вспомогательных белков, непосредственно участвующих в регуляции активности филамента RecA: это RecO, RecF, RecR, RecX, PsiB, DinI, SSB и некоторые другие. Все они могут быть подразделены на группы позитивных и негативных регуляторов, хотя это деление достаточно условно, поскольку некоторые из них, подавляя одни функции филамента, активируют другие (Bagdasarian et al., 1992; Shan et al., 1997; Venkatesh et al., 2002; Stohl et al., 2003; Drees et al., 2004; Lusetti et al., 2004; Renzette et al., 2007; Ragone et al., 2008; Petrova et al., 2009).

В зависимости от типа повреждения ДНК активируются разные группы регуляторных белков. В случае двухнитевого разрыва реализуется сценарий работы системы RecBCD, тогда как в случае одонитевых повреждений — путь RecFOR (Clark, Sandler 1994). Раскручивание и экзонуклеазная деградация донорной двухнитевой ДНК белком RecBCD сопровождаются образованием молекулы ДНК с 3'-выступающим одонитевым концом. Комплекс RecBCD представляет собой мультифункциональный фермент, состоящий из субъединиц RecB, RecC и RecD. Он обладает ДНК-зависимой АТФазой, ДНК-геликазой, а также экзо- и эндонуклеазной активностями. Белок RecBCD прочно связывается с концом дцДНК и расплетает его в реакции, требующей гидролиза АТФ. В то же время фермент разрушает обе нити ДНК (более активно с 3'-конца и менее активно с 5'-конца), что приводит соответственно к образованию коротких и длинных фрагментов оцДНК. Приблизившись к последовательности *chi*, находящейся в строго определенной ориентации (3'-GGTGGTTCG-5'), белок RecBCD останавливается, субъединица RecD модифицируется, что приводит к по-

тере 3'- и к активации 5'-экзонуклеазной активности. Таким образом, дальнейшее раскручивание ДНК приводит к образованию одонитевых 3'-концов, который может быть использован белком RecA для инициирования рекомбинации (Arnold, Kowalczykowski, 2000; Churchill, Kowalczykowski, 2000; Cromie, Leach, 2000).

Примечательно, что RecBCD- и RecFOR-пути рекомбинационного процесса не разделены полностью между собой, в значительной степени они перекрываются, и при инактивации RecBCD-пути система RecFOR способна взять на себя его функцию. Несмотря на то что в каждом случае в процесс включаются разные энзиматические системы, рекомбинационные пути имеют одно общее свойство — они образуют 3'-выступающий конец оцДНК, покрытый филаментом RecA. Подавляющее число рекомбинационных событий инициируется именно 3'-концом оцДНК, и только небольшая часть инициируется ее 5'-концом (Razavy et al., 1996; Cromie et al., 2000).

Возможен ли процесс реализации гомологической рекомбинации в отсутствие SOS-ответа? При работе со штаммом, экспрессирующим нерасщепляемый мутантный вариант репрессора — LexA3, белки SOS-ответа не индуцируются. При этом белок RecA все же придает бактериям некоторую радиорезистентность, которая на несколько порядков выше, чем у делеционного мутанта по гену *recA*. Другой способ измерить рекомбиногенность в отсутствие SOS-ответа — это конъюгационная рекомбинация. В ходе бактериальной конъюгации у *E. coli* донор передает реципиенту большой фрагмент хромосомы или даже полную хромосому, которая быстро интегрируется в хромосому реципиента. Во время конъюгации одна нить ДНК донора своим 5'-концом входит в реципиентную клетку, где достраивается до двухнитевой формы с помощью так называемого конъюгационного синтеза ДНК, осуществляемого репликативным аппаратом реципиента.

Синтез комплементарной нити ДНК в реципиенте идет прерывисто, в направлении 3'→5' относительно донорной ДНК, с помощью фрагментов Оказаки. Входящий 5'-конец конвертируется в дцДНК, тогда как 3'-конец может оставаться одонитевым. До тех пор пока донорная ДНК полностью не достроена до двухнитевого состояния, она имеет смешанный характер, т. е. состоит из оц- и дцДНК с одонитевыми пробелами. Концы образовавшейся донорной дцДНК обрабатываются пресинаптическим комплексом RecBCD, и образующиеся при этом одонитевые 3'-концы внедряются в хромосому реципиента с образованием D-петель, которые в свою очередь становятся местами инициирования нового раунда репликации. Это приводит к тому, что фрагмент донорной ДНК оказывается интегрированным во вновь реплицированную хромосому.

Таким образом, метод выявления рекомбинантов позволяет не только оценить эффективность интеграции донорной ДНК в хромосому реципиента, но и измерить частоту рекомбинационных обменов на единицу длины ДНК. Подход на основе конъюгационной рекомбинации позволил изучить взаимосвязь гена *recA* и отдельных регуляторных генов отдельно от остальных участников SOS-ответа (Lloyd, 1978; Lovett, Clark, 1983; Lloyd, Buckman, 1995; Lanzov et al., 2003). Кроме того, как будет показано ниже, методы конъюгационной рекомбинации оказались идеальным способом проследить, как последствия гиперрекомбинации сказались на метаболизме бактериальной клетки.

Направленная эволюция радиорезистентности

Одним из самых интересных вопросов в исследовании гомологической рекомбинации является вопрос о возможном потенциале гиперрекомбиногенности, заложенном в белке RecA, и путях его изменчивости. Кроме того, важно оценить взаимосвязь этого потенциала от сопутствующего генетического фона.

В лаборатории Майка Кокса штамм *E. coli* подвергали воздействию ионизирующей радиации в течение многих клеточных генераций, индуцируя, таким образом, направленную эволюцию радиостойчивого фенотипа. Как результат были получены дочерние линии штаммов, которые в тысячи раз превосходили по уровню радиостойчивости штамм-основатель (Harris et al., 2009; Byrne et al., 2014). Эволюционировавшие линии были способны выдерживать дозу облучения 3 кГр без драматических последствий для клетки. Бактерия *Deinococcus radiodurans*, возможно самая устойчивая к радиоизлучению, способна выдерживать дозу 5 кГр, сопоставимую с 3 кГр. Для человека эти дозы примерно в 1000 раз превышают дозу летального облучения.

Следует отметить, что селекция бактериальных штаммов *E. coli* сопровождалась комплексной перестройкой одновременно множества генов, механизмов и других компонентов системы клеточного метаболизма. Причем эти перестройки и изменения шли по разным эволюционным путям в разных бактериальных популяциях. Как правило, эволюционировавшая линия включала в себя комбинацию мутаций одновременно по нескольким генам. В белке RecA обнаружены всего две наиболее часто встречаемые замены в положениях 276 и 289. Они локализованы на поверхности белковой молекулы вблизи зоны большой бороздки (Byrne et al., 2014). Последующие исследования (Piechura et al., 2015) показали, что при перемещении мутантных генов обратно в исходный штамм-«основатель» они действительно придают ему некоторую устойчивость к радиации, но ее уровень оказался несопоставимым с теми уровнями, которые наблюдаются в случае «эволюционировавших» штаммов. Штаммы, экспрессирующие мутантные белки RecAD276A и RecAA289S, показали увеличение резистентности всего в 2 и 3 раза соответственно. Эксперименты на очищенных белках *in vitro* не обнаруживают значительных биохимических различий ни в реакции обмена гомологичных нитей ДНК, ни в АТФазной активности по сравнению с белком дикого типа (Piechura et al., 2015).

Мутантные белки RecA характеризуются повышенным сродством к однострелковой ДНК, что выражается в ускоренном вытеснении белка SSB относительно RecA дикого типа. Другое важное различие мутантных белков проявилось в чувствительности к концентрации АДФ. Известно, что RecA дикого типа функционирует в условиях *in vitro*, когда концентрация АДФ не превышает 10 % (Menetski et al., 1988). При достижении данной концентрации АДФ филамент разбирается и диссоциирует от ДНК. В случае с мутантными белками RecAD276A и RecAA289S превышение концентрации АДФ на 40–50 % относительно АТФ все еще не являлось ингибирующим (Piechura et al., 2015). Возможно, в будущем появятся данные о коррекции межбелковых взаимодействий мутантных белков с основными регуляторами, но пока такие данные отсутствуют.

Вместе с тем остаются вопросы. Почему же столь велико число мутаций в гене *recA*, прошедших жесткий фильтр эволюционного давления? Почему размах изменчивости гена оказывается настолько ограниченным, а изменения клетки в своем большинстве коснулись генов, не имеющих отношения к рекомбинационной репарации? Чтобы разобраться в этом, обратимся к молекулярному механизму возникновения адаптации бактерий к длительному стрессовому воздействию. В ходе бактериального SOS-ответа на повреждающее воздействие любой природы активируется работа полимеразы V, представляющей собой комплекс субъединиц UmuD²C. Полимеразу V относят к числу полимераз «error prone», работа которых характеризуется низкой точностью (Patel et al., 2010; Godman, 2014; Robinson et al., 2015). Экспрессируется полимеразы на поздних стадиях SOS-ответа, лишь через 45 мин после белка RecA, когда стресс принимает хроническую форму.

В ходе ошибочной подстановки нуклеотидов при репликации ДНК бактериальный мутагенез увеличивается более чем в 100 раз относительно нормы, что сопровождается массовым появлением мутантов. При том что абсолютное количество мутаций оказываются вредными, по всей видимости, полимеразы V является главным поставщиком материала для эволюционного отбора, хотя, наверное, не единственным. Данный факт даже начал получать свое развитие в индустрии антибиотиков. Действительно, недавние исследования показали, что совместное использование ингибиторов полимеразы V с антибактериальными агентами приводит к утере бактериальной клеткой возможности адаптироваться к изменениям на генетическом уровне. В последнее время в прикладных исследованиях все больше внимания начинают уделять поиску молекулярных ингибиторов, подавляющих генетическую изменчивость бактерий как ответ на действие антибиотика. Белок RecA — основная мишень в этом поиске (Cirz et al., 2005; Lee et al., 2005; Cline et al., 2007; Bellio et al., 2014; Nautiyal et al., 2014; Alam et al., 2016). Таким образом, наше видение проблемы заключается в том, что предопределенность эволюционной изменчивости гена *recA* заключена в ограничениях, наложенных на функционирование полимеразы V.

Известно, что по мере прохождения полимеразой ДНК повреждений она образует комплекс с филаментом RecA, так называемую мутасому. Любые изменения, нарушающие межбелковые связи в мутасоме, должны приводить к отмене мутагенеза и как следствие — к отмене эволюции устойчивости. В отсутствие RecA комплекс UmuD²C не функционирует. Из данного тезиса следует, что для эволюционного процесса допустимы лишь те изменения в белке RecA, которые не сказываются на взаимодействии с мутасомой. Подтверждение этой теории последовало в 2015 г., когда Гудману (Gruber et al., 2015), ведущему эксперту по полимеразе V, удалось *in vivo* совместить мутасому с одним из самых рекомбиногенных мутантных белков RecA — RecAD112R. Данная мутация была получена искусственно и затрагивает зону интерфейса, который, как правило, вовлечен в межбелковые взаимодействия с другими белками. При полном сохранении гомологической рекомбинации клетка полностью лишилась индуцируемого мутагенеза (Gruber et al., 2015). Мутация помешала установлению важных белок-белковых взаимодействий с полимеразой и разъединила рекомбинацию и мутагенез. Таким образом, шансы на успешную эволюцию сохраняются только при достаточной

консервативности архитектуры межбелковых взаимодействий RecA и источников мутагенеза. Исходя из приведенных данных можно предположить, что рекомбиногенный потенциал, заложенный в белке RecA, теоретически должен намного превосходить тот уровень необходимой рекомбиногенности, при котором клетка сохраняет возможность к генетической изменчивости и адаптации.

Направленная эволюция конъюгационной рекомбиногенности RecA

Конъюгационная рекомбинация проводится непосредственно белком RecA в отсутствие масштабных повреждений ДНК, что значительно упрощает анализ причин и последствий рекомбиногенности. Есть два подхода к поиску гиперрекомбиногенных мутантов с равной степенью продуктивности — сайтнаправленный мутагенез интересующих участков гена *recA* и направленная эволюция рекомбиногенности *in vivo*. Отсутствие белков SOS-ответа и, что самое важное, низкая экспрессия полимеразы V позволяют проводить искусственный отбор трансконъюгатов, несущих гиперрекомбиногенные варианты белка RecA. Особенность подхода заключается в том, что плаزمид с геном *recA*, придающая клетке наибольший выход трансконъюгатов, трансформируется в исходный штамм *recA*⁺ и направляется в следующий цикл конъюгации. После череды повторных раундов конъюгации было отобрано около 20 мутантов, вызывающих гиперрекомбинацию (Kim et al., 2015). Интересно, что большинство мутантов несло одиночные аминокислотные замены RecA. Другой подход — направленная или, наоборот, хаотичная замена аминокислот в последовательности белка RecA, после чего все варианты анализируются в тесте на активность в конъюгационной рекомбинации. Таким образом, с помощью совокупности описанных подходов удалось получить ряд эффективных одиночных и множественных мутаций по всей длине белка RecA (Lloyd, 1978; Baitin et al., 2006, 2008; Bakhlanova et al., 2010; Kim et al., 2015). Часть мутантных белков исследовалась в биохимических экспериментах.

Отличительной особенностью большинства гиперрекомбиназ оказалась увеличенная способность мультимеризоваться на однонитевой ДНК, вытесняя при этом белок SSB. В действительности белок SSB является единственным активным конкурентным белком для RecA на однонитевой ДНК при конъюгации. Белок SSB должен полностью покрывать входящий однонитевой участок донорной хромосомы в клетке реципиента. Исходная концентрация SSB в клетке очень высокая, он экспрессируется с трех отдельно регулируемых промоторов, и в ходе SOS-ответа его количество увеличивается лишь в 2 раза. 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, сродству к ДНК. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что такая функция белка RecA, как поиск гомологии и переключение спаренности оснований цепи ДНК, также может быть источником гиперрекомбиногенности. Так, мутация D112R, приводящая к 50-кратному увеличению рекомбиногенности, является примером того, что рекомбинационный потенциал RecA не ограничен лишь способностью белка

филаментировать на однонитевой ДНК (Bakhlanova et al., 2010).

Какие же процессы мешают установлению высокой рекомбиногенности естественным образом? По логике, параллельный перенос генов должен был обеспечивать преимущество тех бактерий, которые наиболее активно проводят RecA-зависимую конъюгацию, а значит, передают наиболее действенные варианты мутаций гена *recA* клеткам-реципиентам. Такая естественная селекция отнюдь не требует ни мутагенеза, ни вообще подключения белков SOS-ответа. В реальности все происходит наоборот: происходит стремительное вырождение гиперрекомбиногенного фенотипа в течение нескольких десятков поколений.

Недавно нами было показано, что большинство супрессорных мутаций возникает не в самом гене *recA*, а в регуляторных участках хромосомы, оказывающих влияние на величину экспрессии белка (Bakhlanova et al., 2016). Это сайты промоторной области гена *recA* либо мутации в гене *pcnB*, отвечающем за копияность плазмиды, несущей ген *recA*. Низкая экспрессия мутантного белка оказалась преимуществом для бактерий в процессе роста и деления клеток (Bakhlanova et al., 2016). Мы обнаружили, что избыточная ДНК-связывающая активность мутантов приводит к задержке метаболизма ДНК и как следствие — к задержке роста бактериальной популяции. Такая задержка деления клеток была присуща большинству мутантов, полученных не только нашей исследовательской группой, но и других (Kim et al., 2015).

На молекулярном уровне в ходе нормального клеточного роста спонтанно образующиеся повреждения ДНК вызывают коллапс репликативной вилки и остановку репликации. После репарации найденных повреждений мутантный белок RecA в отличие от белка дикого типа остается устойчиво ассоциированным с хромосомой. Интересно, что коэкспрессия ингибиторов белка RecA, белков RecX совместно с самим RecA восстанавливала динамику клеточного роста и снимала давление селекции. Такая обратимость процессов роста лишь подтверждает временный характер ограничений, накладываемых рекомбиназой на метаболизм ДНК. Во всех описанных случаях гиперрекомбинация вступала в конфликт с процессом репликации и, возможно, с другими процессами клеточного метаболизма ДНК, становясь объектом негативной селекции. В рассмотренном примере естественный отбор нормы закрепил искусственную мутацию в гене *recA*, но компенсировал ее выражение появлением других, видимо наиболее нейтральных, изменений генома.

Таким образом, эволюция поддерживает баланс между различными сторонами метаболизма ДНК, находя компромисс между уровнем активности сразу многих белков рекомбинации и репарации. Белок RecA оставляет за собой неисчерпанный потенциал рекомбиногенности, которая остается невостребованной в бактериальной клетке, но может послужить подспорьем в решении многих биотехнологических задач.

RecA из экстремофильной бактерии *Deinococcus radiodurans*

D. radiodurans является одной из самых устойчивых к действию ионизирующего излучения бактерий. Система ответа на повреждение ДНК в *D. radiodurans* значительно отличается от *E. coli*. Энзиматический контроль активно-

сти RecA в *D. radiodurans* претерпел столь значительные изменения, что RecA из *D. radiodurans* сам по себе способен заметно компенсировать отсутствие RecA в *E. coli* при экспрессии с плазмидного вектора (Gutman et al., 1994; Carroll, Minton, 1996; Minton, 1996; Cox, Battista, 2005; Zahradka et al., 2006; Slade, 2009). В *D. radiodurans* имеется два паралога LexA, но они не отвечают за изменение экспрессии RecA и их функции остаются неясными (Narumi et al., 2001; Earl et al., 2002). Кроме того, отсутствует система регуляторов RecBCD. Вместе с тем система регуляторов RecFOR, наоборот, присутствует в полной мере (Montague et al., 2009; Satoh et al., 2012). Белок SSB из *D. radiodurans* имеет то же значение для RecA-зависимого обмена гомологичных нитей ДНК, что и белок SSB из *E. coli*. Более того, оба белка оказались взаимозаменяемыми *in vitro* (Eggington et al., 2004). Имеется в *D. radiodurans* и регуляторный белок RecX. Белок RecX является ингибитором белка RecA в *E. coli*. Механизм ингибирования и его назначение в клетке остаются мало изученными (Drees et al., 2004; Baitin et al., 2008; Ragone et al., 2008).

Недавно нами была продемонстрирована возможность комплементации белков RecX как *in vitro*, так и *in vivo* (Бахланова, Байтин, 2016). Ранее белок RecX из *D. radiodurans* исследовала лишь единственная научная группа, которая показала, что белок RecX в бактериях *D. radiodurans* репрессирует радиоустойчивость *in vivo* и ингибирует активность белка RecADr *in vitro* (Sheng et al., 2005). Также с помощью метода гель-шифт продемонстрирована способность RecX из *D. radiodurans* взаимодействовать не только с RecA, но и с ДНК (Sheng et al., 2010). Несмотря на схожесть функций, RecX из *D. radiodurans* отличается по аминокислотному составу главным образом тем, что несет дополнительные 45 аминокислота на N-конце белка в отличие от белка из *E. coli*. Молекулярная архитектура RecXD.rad и его комплексов неизвестна. Остается неясным, существуют ли какие-либо белок-белковые взаимодействия между RecX и другими регуляторными белками в *D. radiodurans*. В системе регуляторов рекомбинации *E. coli* с белком RecX непосредственно взаимодействует белок RecF. Регуляторное действие других белков на RecX, таких как DinI и SSB, основано на конкурентном связывании с ДНК или RecA.

Белок RecA *D. radiodurans* (RecADr) исследуется на протяжении почти 15 последних лет как *in vitro*, так и *in vivo*. Предпринято множество попыток экспрессировать белок RecADr в клетках *E. coli*, но повышения устойчивости к излучению добиться не удалось. В то же время продемонстрирован единственный пример, в котором RecAЕс частично компенсирует устойчивость к УФ-облучению в клетках *D. radiodurans* (Schlesinger, 2007). Для того чтобы выяснить причины функциональных различий белков RecAЕс и RecADr, необходимо обратиться к биохимическим исследованиям. Как показали исследования *in vitro*, молекулярный механизм реакции обмена гомологичных нитей ДНК с помощью белка RecADr имеет ряд специфических свойств. В отличие от белка RecAЕс белок RecADr имеет высокое сродство к дцДНК (Pobegalov et al., 2015). Более того, в присутствии белка SSB (как варианта SSBЕс, так и «родного» DdrB) белок RecADr даже лучше связывается с дцДНК, чем с оцДНК (Eggington et al., 2004). Таким образом, реакция обмена гомологичных нитей ДНК инициируется филаментом, образованным на дцДНК, т. е. реакция идет как бы в обратном направлении относительно классической модели, описанной для RecAЕс (Kim et al., 2002). Схема рекомбинацион-

ного процесса получила название «обратный перенос нити».

Филамент RecADr характеризуется рядом важных биофизических отличий от филамента RecAЕс. Недавно мы продемонстрировали, что RecADr имеет преимущество в гибкости филамента, образуемого на двухнитевой ДНК. Предположительно причина этой повышенной гибкости является результатом увеличения числа брешей в филаменте, представляющих собой одно- или двухнуклеотидные участки ДНК, которые не могут быть заполнены мономером RecADr. По всей видимости, повышенная гибкость филамента RecADr может давать преимущество для поиска гомологичных нитей ДНК (Pobegalov et al., 2015). Хотя доказательства этой теории еще предстоит получить.

Другое важное наблюдение было получено в 2016 г. — возможность фосфорилирования треониновых и тирозиновых остатков в RecADr. Доказано, что киназа RqkA участвует в модификации Y77F и T318A. Фосфорилированные варианты белка приобретают ряд отличительных свойств — повышенное сродство к одно- и двухнитевой ДНК, предпочтительное переключение кофактора с АТФ на дАТФ. Белок RecADr является чуть ли не единственным примером модифицированной прокариотической рекомбиназы. Фосфорилирование возникает только в ответ на радиационное воздействие. Сама киназа участвует в модификации сразу нескольких белков репарации. Возможно проведение фосфорилирования в *E. coli* при взаимной коэкспрессии RecADr и RqkA. Интересно, что если комплементация RecADr в клетках *E. coli* теоретически возможна, то, видимо, только ее немодифицированной формы. Известно, что дАТФ в отсутствие АТФ может служить кофактором для RecAЕс, но из-за недостаточной концентрации дАТФ *in vivo* этого, скорее всего, не происходит (Shan et al., 1997).

На основании перечисленных фактов следует, что механизм, благодаря которому RecADr может осуществлять процесс рекомбинационной репарации, претерпел такие значительные изменения, которые вряд ли совместимы с работой любой из энзиматических систем *E. coli*. Вместе с тем в нашей лаборатории продолжают попытки комплементировать RecADr в конъюгационной рекомбинации клеток *E. coli*, в которых условия эксперимента, возможно, позволят выявить рекомбиногенность и изучить ее особенности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-34-00023).

Список литературы

- Бахланова И. В., Байтин Д. М. 2016. Белки RecX *Deinococcus radiodurans* и RecX *Escherichia coli* способны замещать друг друга *in vivo* и *in vitro*. Генетика. 52 : 293—299. (Baklanova I. V., Baitin D. M. 2016. *Deinococcus radiodurans* RecX and *Escherichia coli* RecX proteins are able to replace each other *in vivo* and *in vitro*. Genetika. 52 : 293—299.)
- Alam M. K., Alhazmi A., DeCoteau J. F., Luo Y., Geyer C. R. 2016. RecA inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. Cell Chem. Biol. 23 : 381—391.
- Amundsen S. K., Smith G. R. 2003. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. Cell. 112 : 741—744.
- Arnold D. A., Kowalczykowski S. C. 2000. Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD enzyme. J. Biol. Chem. 275 : 12 261—12 265.

- Bagdasarian M., Bailone A., Angulo J. F., Scholz P., Devoret R. 1992. 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.* 6 : 885—893.
- Baitin D. M., Bakhlanova I. V., Chervyakova D. V., Kil Y. V., Lanzov V. A., Cox M. M. 2008. Two RecA protein types that mediate different modes of hyperrecombination. *J. Bacteriol.* 190 : 3036—3045.
- Baitin D. M., Bakhlanova I. V., Kil Y. V., Cox M. M., Lanzov V. A. 2006. Distinguishing characteristics of hyperrecombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* acting in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188 : 5812—5820.
- Bakhlanova I. V., Dudkina A. V., Baitin D. M., Knight K. L., Cox M. M., Lanzov V. A. 2010. Modulating cellular recombination potential through alterations in RecA structure and regulation. *Mol. Microbiol.* 78 : 1523—1538.
- Bakhlanova I. V., Dudkina A. V., Wood E. A., Lanzov V. A., Cox M. M., Baitin D. M. 2016. DNA metabolism in balance: rapid loss of a RecA-Based hyperrec phenotype. *PLoS ONE.* 11 : e0154137.
- Bellio P., Brisdeli F., Perilli M., Sabatini A., Bottoni C., Segatore B., Setacci D., Amicosante G., Celenza G. 2014. Curcumin inhibits the SOS response induced by levofloxacin in *Escherichia coli*. *Phytomedicine.* 21 : 430—434.
- Brendel V., Brocchieri L., Sandler S. J., Clark A. J., Karlin S. 1997. Evolutionary comparisons of RecA-like proteins across all major kingdoms of living organisms. *J. Mol. Evol.* 44 : 528—541.
- Byrne R. T., Chen S. H., Wood E. A., Cabot E. L., Cox M. M. 2014. *Escherichia coli* genes and pathways involved in surviving extreme exposure to ionizing radiation. *J. Bacteriol.* 196 : 3534—3545.
- Churchill J. J., Kowalczykowski S. C. 2000. Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme. *J. Mol. Biol.* 297 : 537—542.
- Cirz R. T., Chin J. K., Andes D. R., de Crecy-Lagard V., Craig W. A., Romesberg F. E. 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* 3 : e176.
- Clark A. J., Sandler S. J. 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* 20 : 125—142.
- Cline D. J., Holt S. L., Singleton S. F. 2007. Inhibition of *Escherichia coli* RecA by rationally redesigned N-terminal helix. *Org. Biomol. Chem.* 5 : 1525—1528.
- Cox M. M. 2007. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 : 127—138.
- Cox M. M., Battista J. R. 2005. *Deinococcus radiodurans* — the consummate survivor. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 : 882—892.
- Cox M. M., Goodman M. F., Kreuzer K. N., Sherratt D. J., Sandler S. J., Marians K. J. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature.* 404 : 37—41.
- Cromie G. A., Leach D. R. 2000. Control of crossing over. *Mol. Cell.* 6 : 815—826.
- Cromie G. A., Millar C. B., Schmidt K. H., Leach D. R. 2000. Palindromes 696 as substrates for multiple pathways of recombination in *Escherichia coli*. *Genetics.* 154 : 513—522.
- Drees J. C., Lusetti S. L., Cox M. M. 2004. Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein: modulation by the RecA C terminus and filament functional state. *J. Biol. Chem.* 279 : 52 991—52 997.
- Earl A. M., Mohundro M. M., Mian I. S., Battista J. R. 2002. The IrrE protein of *Deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of recA expression. *J. Bacteriol.* 184 : 6216—6224.
- Egginton J. M., Haruta N., Wood E. A., Cox M. M. 2004. The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*. *BMC Microbiol.* 4 : 2. Doi: 10.1186/1471-2180-4-2.
- Glazebrook J. A., Forster J. W., Strike P. 1983. Regulation of expression of the colicin gene of I1 group plasmid TP110. *J. Bacteriol.* 155 : 122—128.
- Goodman M. F. 2014. The discovery of error-prone DNA polymerase V and its unique regulation by RecA and ATP. *J. Biol. Chem.* 289 : 26 772—26 782.
- 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. 2015. A RecA protein surface required for activation of DNA polymerase V. *PLoS Genet.* 11 : e1005066.
- Gutman P. D., Carroll J. D., Masters C. I., Minton K. W. 1994. Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a recA gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Gene.* 141 : 31—37.
- Handa N., Morimatsu K., Lovett S. T., Kowalczykowski S. C. 2009. Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Develop.* 23 : 1234—1245.
- Harris D. R., Pollock S. V., Wood E. A., Cox M. M. 2009. Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191 : 5240—5252.
- Hsu H. F., Ngo K. V., Chitteni-Pattu S., Cox M. M., Li H. W. 2011. Investigating *Deinococcus radiodurans* RecA protein filament formation on double-stranded DNA by a real-time single-molecule approach. *Biochemistry.* 50 : 8270—8280.
- Huang F., Motlekar N. A., Burgwin C. M., Napper A. D., Diamond S. L., Mazin A. V. 2011. Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS Chem. Biol.* 6 : 628—635.
- 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. 2002. RecA protein from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: expression, purification, and characterization. *J. Bacteriol.* 84 : 1649—1660.
- Kim T., Chitteni-Pattu S., Cox B. L., Wood E. A., Sandler S. J., Cox M. M. 2015. Directed evolution of RecA variants with enhanced capacity for conjugational recombination. *PLoS Genet.* 11 : e1005278.
- Kowalczykowski S. C. 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochemistry. Sci.* 25 : 156—165.
- Kowalczykowski S. C., Clow J., Somani R., Varghese A. 1987. 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.* 198 : 359.
- Kowalczykowski S. C., Krupp R. A. 1987. Effects of *Escherichia coli* SSB protein on the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of *Escherichia coli* RecA protein. Evidence that SSB protein facilitates the binding of RecA protein to regions of secondary structure within single-stranded DNA. *J. Mol. Biol.* 193 : 97—113.
- Lanzov V. A., Bakhlanova I. V., Clark A. J. 2003. Conjugational hyperrecombination achieved by derepressing the LexA regulon, altering the properties of RecA protein and inactivating mismatch repair in *Escherichia coli* K-12. *Genetics.* 163 : 1243—1254.
- Lee A. M., Ross C. T., Zeng B. B., Singleton S. F. 2005. 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.* 48 : 5408—5411.
- Lloyd R. G. 1978. Hyper-recombination in *Escherichia coli* K-12 mutants constitutive for protein X synthesis. *J. Bacteriol.* 134 : 929—935.
- Lloyd R. G., Buckman C. 1995. Conjugational recombination in *Escherichia coli*: genetic analysis of recombinant formation in Hfr \times F $_{-}$ crosses. *Genetics.* 139 : 1123—1148.
- Lovett S. T., Clark A. J. 1983. Genetic analysis of regulation of the RecF pathway of recombination in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 153 : 1471—1478.
- Lusetti S. L., Voloshin O. N., Inman R. B., Camerini-Otero R. D., Cox M. M. 2004. The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. *J. Biol. Chem.* 279 : 30 037—30 046.
- Mazin A. V., Kowalczykowski S. C. 1998. The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. *EMBO J.* 17 : 1161—1168.
- Menetski J. P., Varghese A., Kowalczykowski S. C. 1988. Properties of the high-affinity single-stranded DNA binding state of the *Escherichia coli* RecA protein. *Biochemistry.* 27 : 1205—1212.

- Minton K. W. 1996. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutat. Res.* 363 : 1—7.
- Montague M., Barnes C., Smith H. O., Chuang R. Y., Vashee S. 2009. The evolution of RecD outside of the RecBCD complex. *J. Mol. Evol.* 69 : 360—371.
- 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.* 11 : 1337—1347.
- Narumi I., Satoh K., Kikuchi M., Funayama T., Yanagisawa T., Kobayashi Y., Watanabe H., Yamamoto K. 2001. The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following gamma irradiation. *J. Bacteriol.* 183 : 6951—6956.
- Nautiyal A., Patil K. N., Muniyappa K. 2014. Suramin is a potent and selective inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for anti-bacterial drug discovery. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 : 1834—1843.
- Patel M. L., Jiang Q., Woodgate R., Cox M. M., Goodman M. F. 2010. A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45:171—184.
- Petrova V., Chitteni-Pattu S., Drees J. C., Inman R. B., Cox M. M. 2009. An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Mol. Cell.* 36 : 121—130.
- 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. 2015. Biochemical characterization of RecA variants that contribute to extreme resistance to ionizing radiation. *DNA Repair (Amst.)* 26 : 30—43.
- Pobegalov G., Cherevatenko G., Alekseev A., Sabantsev A., Kovaleva O., Vedyaykin A., Morozova N., Baitin D., Khodorkovskii M. 2015. *Deinococcus radiodurans* RecA nucleoprotein filaments characterized at the single-molecule level with optical tweezers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466 : 426—430.
- Ragone S., Maman J. D., Furnham N., Pellegrini L. 2008. Structural basis for inhibition of homologous recombination by the RecX protein. *EMBO J.* 16 : 2259—2269.
- Rajpurohit Y. S., Bihani C., Waldor M. K., Misra H. S. 2016. Phosphorylation of *Deinococcus radiodurans* RecA regulates its activity and may contribute to radioresistance. *J. Biol. Chem.* In press.
- Razavy H., Szigety S. K., Rosenberg S. M. 1996. Evidence for both 3' and 5' single-strand DNA ends in intermediates in chi-stimulated recombination *in vivo*. *Genetics.* 142 : 333—339.
- Renzette N., Gumlaw N., Sandler S. J. 2007. DinI and RecX modulate RecA-DNA structures in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 63 : 103—115.
- 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. 2015. Regulation of mutagenic DNA polymerase V activation in space and time. *PLoS Genet.* 11 : e1005482.
- Roca A. I., Cox M. M. 1990. The RecA protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 : 415—456.
- Rose T. B., Audrey J. K., Eric L. C., Wendy S. S., Martin J. A., Wang Z., Wood E. A., Pennacchio C., Nicole T., Battista J. R., Cox M. M. 2014. Evolution of extreme resistance to ionizing radiation via genetic adaptation of DNA repair. *Elife.* 3:e01322.
- Roy R., Kozlow A. G., Lohman T. M., Ha T. 2009. SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation. *Nature.* 461 : 1092—1097.
- Satoh K., Kikuchi M., Ishaque A. M., Ohba H., Yamada M., Tejima K., Onodera T., Narumi I. 2012. The role of *Deinococcus radiodurans* RecFOR proteins in homologous recombination. *DNA Repair (Amst.)* 11 : 410—8.
- Schoemaker J. M., Gayda R. C., Markovitz A. 1984. 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.* 158 : 551—561.
- Shan Q., Bork J. M., Webb B. L., Inman R. B., Cox M. M. 1997. RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins. *J. Mol. Biol.* 265 : 519—540.
- Sheng D., Li M., Jiao J., Sheng X., Deng W., Hua Y. 2010. Repression of *recA* induction by RecX is independent of the RecA protein in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 192 : 3540—3544.
- Sheng D., Liu R., Xu Z., Singh P., Shen B., Hua Y. 2005. Dual negative regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiation resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA Repair (Amst.)* 4 : 671—678.
- Schlesinger D. J. 2007. Role of RecA in DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 274 : 342—347.
- Shereda R. D., Kozlov A. G., Lohman T. M., Cox M. M., Keck J. L. 2008. SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43 : 289—318.
- Slade D., Lindner A. B., Paul G., Radman M. 2009. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell.* 136 : 1044—1055.
- Smith G. R. 1991. Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms. *Cell.* 64 : 19—27.
- Stohl E. A., Brockman J. P., Burkle K. L., Morimatsu K., Kowalczykowski S. C., Seifert H. S. 2003. *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278 : 2278—2285.
- Venkatesh R., Ganesh N., Guhan N., Reddy M. S., Chandrasekhar T., Muniyappa K. 2002. RecX protein abrogates ATP hydrolysis and strand exchange promoted by RecA: insights into negative regulation of homologous recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 12 091—12 096.
- Zhradka K., Slade D., Bailone A., Sommer S., Aeverbeck D., Petranovic M., Lindner A. B., Radman M. 2006. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature.* 443 : 569—573.

RECOMBINOGENIC POTENTIAL OF RecA PROTEIN:
EVOLUTIONARY OPPORTUNITIES AND CONSEQUENCES FOR BACTERIAL CELL*I. V. Bakhlanova*^{1,2} *D. M. Baitin*^{1,2, *}¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and² Petersburg Nuclear Physics Institute B. P. Konstantinov National Research Center «Kurchatov Institute»,
Gatchina, Leningrad Region, 188300;

e-mail: dimabaitin@yahoo.com; ibakh2003@mail.ru

The review is devoted to the problem of control of homologous recombination in a bacterial cell. Possible ways to improve recombinogenic activity of the recombinase A and its consequences for the cell are discussed. RecA protein is a central enzyme of homologous recombination in the bacterial cell. By forming the right-twisted spiral filament, it provides the search for homology between two DNA molecules, and the exchange of the homologous strands. RecA protein not only protects cells from ionizing radiation and UV radiation, but can also fully carry out the recombination process during normal cellular growth. Evolution of the recombinogenic properties is limited by metabolism abilities of the other cell systems. It is possible to increase recombinogenesis artificially, but it is accompanied by negative effect on the replicative apparatus and cell division. Therefore, the level of natural recombinogenesis represents an evolutionary compromise between the positive and negative aspects of recombination.

Key words: homologous recombination, recombinase, RecA, SOS response, ATPase.
