

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 575.116.12

ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИКИ ФИЛАМЕНТАЦИИ БЕЛКА RecA, ВЫЗВАННОЕ
АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ D112R ЛИБО ЗАМЕЩЕНИЕМ АТР
НА dАТР, ПРИВОДИТ К УСТОЙЧИВОСТИ ФИЛАМЕНТА
К ДЕЙСТВИЮ БЕЛКА RecX

© 2011 г. А. В. Дудкина^{1,2}, А. В. Швецов¹, И. В. Бахланова¹, Д. М. Байтин^{1,2*}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, 188300

²Санкт-Петербургский Государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, 195251

Поступила в редакцию 04.05.2010 г.

Принята к печати 13.10.2010 г.

Обнаружено, что мутантный белок RecA D112R более устойчив к действию своего негативного регулятора – белка RecX, чем белок дикого типа *in vitro* и *in vivo*. С помощью методов молекулярного моделирования мы показали, что аминокислотный остаток в положении 112 не может приблизиться к RecX на расстояние менее 25–28 Å. Таким образом, прямой контакт между аминокислотным остатком и RecX невозможен. Белок RecA D112R активнее конкурирует с белком SSB за сайты связывания на оцДНК и, следовательно, отличается от RecA дикого типа по динамике филаментации на оцДНК. С другой стороны, при замене АТР на dАТР белок RecA дикого типа, меняя динамику филаментации на оцДНК, также становится более устойчивым к RecX. На основе этих данных сделан вывод о том, что в устойчивости филамента RecA к RecX динамика филаментации играет существенно большую роль, чем межбелковые взаимодействия RecA–RecX, обсуждаемые ранее. Мы предлагаем также усовершенствованную модель регуляции филамента RecA белком RecX, в рамках которой элонгация филамента RecA вдоль оцДНК блокируется белком RecX на участке оцДНК, расположенном за пределами филамента.

Ключевые слова: белок RecA, белок RecX, филамент, регуляция.

CHANGING OF FILAMENTATION DYNAMICS OF RECA PROTEIN, INDUCED BY D112R AMINO ACID SUBSTITUTION OR ATP TO dATP REPLACEMENT, RESULTS IN FILAMENT STEADINESS TO THE RecX PROTEIN ACTION, by A. V. Dudkina^{1,2}, A. V. Schvetsov¹, I. V. Bakhlanova¹, D. M. Baitin^{1,2*} (Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, 188300 Russia; *e-mail: dimabaitin@yahoo.com). It is known that RecX is a negative regulator of RecA protein. We found that the mutant RecA D112R protein exhibits increased resistance to RecX protein comparatively to wild-type RecA protein *in vitro* and *in vivo*. Using molecular modeling we showed, that amino acid located in position 112 can not approach RecX closer than 25–28 angstroms. Thus, direct contact between amino acid and RecX is impossible. RecA D112R protein more actively competes with SSB protein for the binding sites on ssDNA and, therefore, differs from the wild-type RecA protein by dynamics of filamentation on ssDNA. On the other hand, after the replacement of ATP by dATP, the wild-type RecA protein, changing the dynamics of filamentation on ssDNA, also becomes more resistant to RecX. Based on these data it is concluded that the dynamics of filamentation has a great, if not dominant role in the stability of RecA filament to RecX relative to the role of RecA–RecX protein–protein interactions discussed earlier. We also propose an improved model of regulation of RecA by RecX protein, where RecA filament elongation along ssDNA is blocked by RecX protein on the ssDNA region, located outside the filament.

Keywords: RecA protein, RecX protein, filament, regulation.

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 [1–3]. Синапсису гомологичных молекул предшествует пресинаптическая стадия, в ходе которой

филамент RecA в присутствии АТР и Mg²⁺ кооперативно мультимеризуется в направлении 5' → 3' вдоль оцДНК. При этом на один мономер RecA приходятся 3 н. оцДНК. Различают два основных этапа мультимеризации RecA на ДНК. Первый этап – инициация филамента, или нуклеация, которая заключается в посадке нескольких мономеров RecA на

Принятые сокращения: IPTG – изопропилтио-β-D-галактозид; белок SSB – белок, связывающий одноцепочечную ДНК.
* Эл. почта: dimabaitin@yahoo.com

оцДНК. Второй – расширение филамента вдоль ДНК, или элонгация, в ходе которой новые мономеры RecA последовательно присоединяются к исходным, образуя непрерывный филамент. Элонгация филамента сопровождается гидролизом АТФ. Когда размер филамента составляет 7–10 мономеров, скорость гидролиза АТФ выходит на максимальный уровень. Разборка филамента происходит в том же направлении, что и сборка: мономеры RecA отделяются от филамента с 5'-конца относительно оцДНК, гидролизуют при этом одну молекулу АТФ [4–7]. Интересно, что при одновременной инициации нескольких независимых филаментов в различных участках ДНК в месте их стыка образуются короткие бреши длиной 1–2 н. Так как эти бреши в силу своего размера остаются недоступными для связывания мономером RecA, они служат естественными ограничителями длины филамента. Вместе с тем частота встречаемости брешей в филаменте и динамика их появления окончательно не изучены [8].

В настоящее время известно около 10 различных белков, принимающих непосредственное участие в регуляции активности филамента RecA. Это RecO, RecF, RecR, RecX, PsiB, DinI, SSB [9–12]. Один из основных регуляторов – белок SSB, который взаимодействует с оцДНК, будучи естественным препятствием для инициации филамента белком RecA. Вместе с тем, если инициация филамента на оцДНК произошла, то SSB не препятствует дальнейшему расширению филамента вдоль оцДНК, или стадии элонгации. Более того, белок SSB расплавляет вторичную структуру ДНК, позволяя филаменту RecA занять все свободные сайты оцДНК. Доказано, что между белками RecA и SSB отсутствуют каких-либо специфические белок-белковые взаимодействия [13–16].

Белок RecX – негативный регулятор белка RecA как *in vivo*, так и *in vitro*. Показано, что RecX, взаимодействуя непосредственно с RecA, препятствует элонгации филамента, приводя к его полной диссоциации от оцДНК [11, 17–20]. Ранее мы показали, что белки RecX и SSB – это функциональные антагонисты: в присутствии SSB значительно снижается негативное воздействие RecX на RecA. Эффект достигается при добавлении белков в реакционную смесь в любой последовательности и носит обратимый характер. Конкуренция осуществляется опосредованно, так как данных в пользу прямых межбелковых взаимодействий между RecX и SSB не найдено [21]. Молекулярный механизм, лежащий в основе этого наблюдения, окончательно не изучен.

В представленной работе мы, используя преимущества, которые дает точечная мутация D112R, продолжаем изучать механизм регуляции белка RecA белком RecX. Впервые эту мутацию получили в лаборатории К. Knight [22] для изучения области межмономерных взаимодействий. Как показано

ранее, по таким основным биохимическим показателям, как скорость гидролиза АТФ или степень олигомеризации, мутантный белок не отличается от белка дикого типа [22]. Вместе с тем мы обнаружили, что филамент RecA D112R более устойчив к действию RecX. В отличие от исследованного ранее мутантного белка RecA с делецией 17 С-концевых аминокислотных остатков (RecADС17), также обладающего высокой устойчивостью к белку RecX [23], в белке RecA D112R заменен только один аминокислотный остаток, расположенный вдали от С-концевого субдомена. Таким образом, полученные нами результаты позволяют взглянуть на механизм регуляции рекомбиназной активности RecA белком RecX с новой точки зрения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали NADH, лактатдегидрогеназу, пируваткиназу, фосфоенолпируват, поли(dT), АТФ, dАТФ производства фирмы “Sigma”, кольцевую онДНК M13mp18 (“New England BioLabs”).

Плазмиды pTRecA220 с генами *recAwt* или *recAD112R*, находящимися под контролем промотора *tac*, любезно предоставлены К. Knight [22]. Гены *recAwt* и *recAD112R* экспрессировали в клетках *Escherichia coli*, IPTG добавляли до концентрации 1 мМ. Белки RecAwt и RecA D112R выделяли и очищали согласно [24]. Концентрацию белков RecAwt и RecA D112R определяли по поглощению при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции $2.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Белки SSB и RecX, а также антитела к белку RecX любезно предоставлены М. Сох (Университет Висконсин-Мэдисон, США). Концентрацию белков SSB и RecX определяли при $\lambda 280$ с использованием коэффициентов молярной экстинкции 2.83×10^4 и $2.57 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Штаммы и плазмиды. Зависимость выживаемости клеток от дозы УФ-излучения изучали, используя штамм *E. coli* BLR $\Delta recA$ с плазмидами, несущими гены *recAwt* или *recAD112R* и *recX*. Штамм BLR (DE3) имеет генотип: *F- ompT hsdSB (rB - mB) gal dcm Δ (srl-recA)306::Tn10 (TcR)* (DE3). Плаزمида pRecAwt, содержащая ген *recAwt* под собственным промотором, сконструирована на основе вектора pUC19 согласно [25]. Плазмиды pUCrecAD112R на основе pRecAwt получены от фирмы “Евроген”. Плазмиды, несущие гены *recX* и *kan* (устойчивость к канамицину), получали, встраивая в вектор pET24b фрагмент плазмиды pEAW226 с геном *recX* (плазмиды любезно предоставлены М. Сох, Университет Висконсин-Мэдисон, США). С помощью эндонуклеаз рестрикции BamHI и XbaI из этой плазмиды был вырезан фрагмент 529 п.н., содержащий ген *recX*, и вставлен по этим же сайтам рестрикции в вектор pET24b (“Novagen”) под индуцируемый промотор T7-РНК-полимеразы. Уровень экспрессии

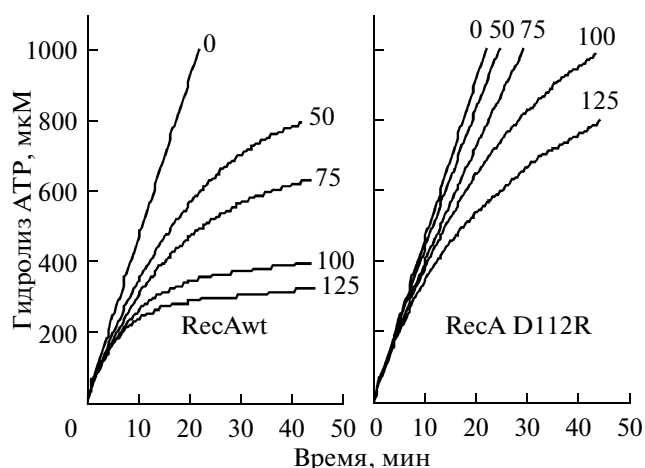


Рис. 1. Ингибирование ДНК-зависимой АТФазы белка RecA после добавления RecX в разных концентрациях. RecX добавляли в точке 0 по оси абсцисс. Реакцию проводили, как описано в “Экспериментальной части”. Реакционная смесь содержала 3 мкМ RecA, 0.5 мкМ SSB и 5 мкМ оцДНК. Концентрации RecX указаны на рисунке (нМ).

генов *recA* и *recX* контролировали с помощью иммуноблоттинга, как описано в [18, 26].

Степень гидролиза АТФ, катализируемого белком RecA, измеряли с помощью спектрофотометрического теста, в котором уровень образования ADP сопряжен с окислением NADH в NAD⁺ [5, 9]. Концентрацию NADH определяли по оптической плотности реакционной смеси при λ_{380} с использованием коэффициента экстинкции $1.21 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Реакцию проводили при 37°C в стандартном буфере TMD (25 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол), содержащем 2 мМ АТФ или dАТФ, АТФ или dАТФ-регенерирующую систему (4 мМ фосфоенолпирувата и 30 ед/мл пируваткиназы), а также NADH и 30 ед/мл лактатдегидрогеназы. Реакционная смесь содержала 5 мкМ оцДНК фага M13 либо поли(dT) и 3 мкМ RecA. Уровень гидролиза определяли с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800 и кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Модель комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX строили с помощью методов белкового докинга. Начальную модель для докинга строили из соображений, аналогичных описанным в [20]. Модели филамента белка RecA из *E. coli* дикого типа и его мутанта D112R строили на основе кристаллической структуры комплекса химерного белка RecA с дцДНК [27]. Белковый лиганд (RecX) и рецептор (RecA::АТФ::оцДНК) были подготовлены к докингу, добавлены недостающие атомы, в том числе атомы водорода. Для расчета взаимодействия между лигандом и рецептором использовали стандартный потенциал ЕСЕРР [28]. В качестве начального положения лиганда было выбрано его примерное по-

ложение в бороздке филамента, содержащего оцДНК, как показано методами электронной микроскопии [20]. Далее с помощью стандартных процедур пакета ICM-Pro 3.6 [29] рассчитаны сетки потенциалов для электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных взаимодействий и водородных связей лиганда, охватывающие всю область возможных взаимодействий (восемь мономеров RecA, фрагмент оцДНК длиной 36 н.). По сеткам потенциалов проведен белок-белковый докинг с твердым лигандом и рецептором с помощью стандартного протокола ICM-Pro. Из полученного набора конформаций выбрали неэквивалентные конформации лиганда, имеющие наиболее низкие энергии конформационных состояний. Эти конформации приводили к конформациям с наиболее низкими энергиями, не имеющими самопересечений и столкновений атомов, в соответствии со стандартным протоколом ICM-Pro и оставляли конформации RecX внутри филамента RecA, имеющие самую низкую энергию конформационных состояний.

Изучение зависимости выживаемости клеток от дозы УФ-излучения. Клетки *E. coli*, несущие плазмиды с геном *recX*, выращивали в среде LB до OD_{600} , равной 0.4–0.6, добавляли IPTG до конечной концентрации 0.3 мМ и растили в течение еще 1.5 ч для индукции синтеза белка RecX. Контрольные клетки *E. coli* также выращивали в среде LB, но без индукции. Клетки, после достижения OD_{600} , равной 0.7–0.9, осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин) и ресуспендировали в исходном объеме солевой среды (NaCl 0.9%). УФ-облучение (λ_{254}) проводили в чашках Петри на приборе “Хроматоскоп” при мощности дозы 100 мДж/м²/с, отбирая аликвоты культуры объемом 0.1 мл через равные временные интервалы (2 с). Облученные клетки разбавляли солевой средой, рассеивали на LB-агар и через 24 ч подсчитывали число колоний. УФ-облучение клеток, их разведение, рассев и выращивание проводили при освещении красным светом для избежания фотореактивации. С каждой культурой проводили по три независимых опыта. Погрешность измерения не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние мутации D112R на взаимодействие RecA с белками SSB и RecX

Количество белка RecA, находящегося в состоянии филамента на оцДНК, обычно оценивают по скорости гидролиза АТФ. Соответственно, изменение скорости гидролиза АТФ отражает не только количество RecA, которое перешло в свободное или, наоборот, связанное состояние, но и количество оцДНК в филаменте. В отсутствие белка SSB лишь небольшая доля кольцевой оцДНК фага M13 доступна для связывания белком RecA. Скорость гидролиза АТФ резко возрастает после добавления бел-

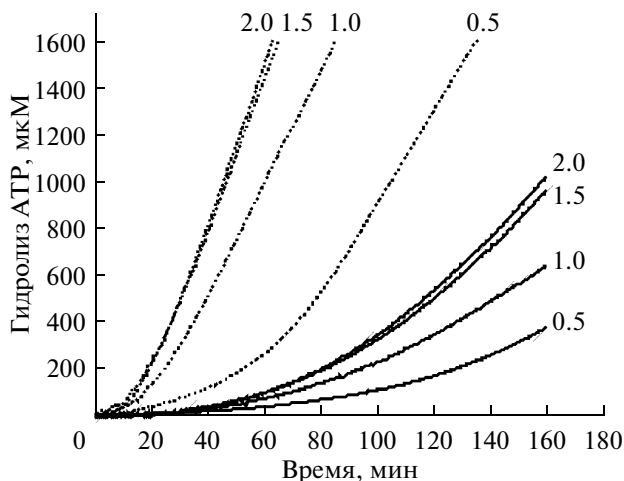


Рис. 2. Кинетика смещения белка SSB с оцДНК белками RecA и RecA D112R в присутствии RecX. RecA добавляли в момент времени $t = 0$. Концентрация RecA – 3 мкМ, RecX – 75 нМ, оцДНК – 5 мкМ. Концентрации SSB указаны на рисунке (мкМ). RecAwт показан сплошной линией, RecA D112R – пунктиром.

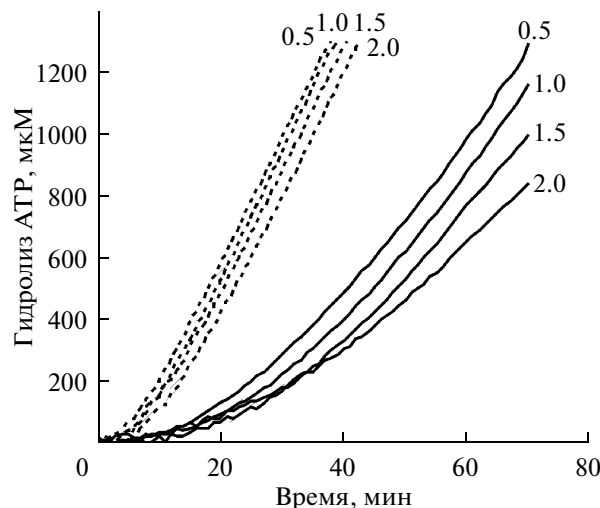


Рис. 3. Вытеснение белка SSB белком RecA в отсутствие RecX. RecA добавляли в момент времени $t = 0$. Концентрация RecA – 3 мкМ, оцДНК – 5 мкМ. Концентрации SSB указаны на рисунке (мкМ). RecAwт показан сплошной линией, RecA D112R – пунктиром.

ка SSB и достигает постоянного значения в течение нескольких секунд. Белок SSB добавляли из расчета 1 субъединица на 10 н. оцДНК, что достаточно для расплетания всей вторичной структуры оцДНК и соответствует условиям, принятым в подобных опытах. Здесь и далее мы использовали 5 мкМ ДНК и 0.5 мкМ либо больше белка SSB, т.е. насыщающие концентрации. Как показано ранее [21, 23], последующее добавление белка RecX в реакционную смесь вызывает падение скорости гидролиза АТР за счет диссоциации RecA от оцДНК. На рис. 1 показана кинетика ингибирования ДНК-зависимой АТРАЗы белка RecA после добавления RecX в различной концентрации. Белок RecX вводили в реакционную смесь в точке 0 по оси абсцисс. Скорость гидролиза АТР белком RecA снижается пропорционально концентрации RecX, достигая стационарного уровня. В присутствии 100 и 125 нМ RecX скорость гидролиза белка RecA дикого типа падает до нуля, что свидетельствует о полной диссоциации RecA из комплекса с ДНК. В этих же условиях RecA D112R более устойчив к действию RecX, чем RecA дикого типа. Качественно такой же результат достигается, если RecA добавлять в последнюю очередь, т.е. после белков SSB и RecX (рис. 2). После некоторой задержки, необходимой для инициации филамента RecA на оцДНК, связанной белком SSB, скорость гидролиза АТР начинает возрастать. Ранее мы показали [21], что белок SSB, служащий естественным препятствием для инициации филамента RecA на оцДНК, снижает ингибирующее действие RecX, т.е. стимулирует RecA в присутствии RecX. Как видно из рис. 2, тенденция к усилению АТРАЗной активности в ответ на увеличение концентрации SSB в смеси присуща и белку RecA дикого типа, и АТРАЗ

зе RecA D112R. Стимуляция АТРАЗной активности белков RecA возрастает до достижения определенного соотношения концентраций RecX и SSB, выше которого активность выходит на плато, что соответствует результатам, полученным ранее для RecA дикого типа [21]. Так, в присутствии 75–85 нМ RecX стимулирующий эффект SSB достигает насыщения при концентрации 1.5–2 мкМ.

Белок RecA D112R значительно быстрее преодолевает ингибирующее действие белка RecX при любых концентрациях SSB. Чтобы разделить вклад каждого из белков в кинетику реакции, мы провели опыт по вытеснению белка SSB белком RecA в отсутствие RecX (рис. 3).

SSB использовали в тех же концентрациях, как и в предыдущем опыте. Из рис. 3 видно, что RecA D112R вытесняет SSB значительно быстрее, чем RecA дикого типа. По-видимому, мутантный RecA более активно конкурирует за сайты связывания на оцДНК, чем RecA дикого типа и, следовательно, имеет повышенное сродство к оцДНК либо к молекуле RecA, уже находящейся в контакте с ДНК.

Белок RecA активно взаимодействует с оцДНК, лишенной сложной вторичной структуры и шпилек, например с поли(dT), без помощи SSB. Белок SSB не только не стимулирует поли(dT)-зависимую АТРАЗу, но более того – вытесняет RecA с 5'-конца любой линейной молекулы оцДНК, замещая освобожденные в ходе разборки филамента участки ДНК [30]. Использование поли(dT), лишенной сложной вторичной структуры, позволило нам вовлечь в реакцию RecA и RecX в отсутствие SSB. Добавление RecX в реакционную смесь, содержащую поли(dT), приводит к одномоментному резкому снижению скорости гидролиза до некоторого ко-

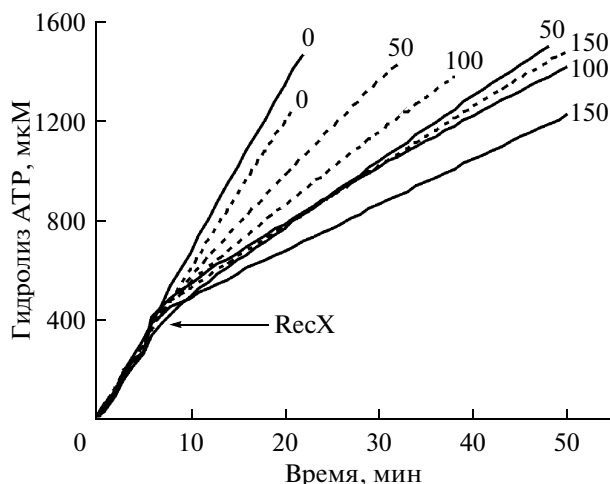


Рис. 4. Влияние RecX на АТРазную активность RecA на поли(dT). Момент добавления RecX показан стрелкой. Концентрация RecA – 3 мкМ, поли(dT) – 5 мкМ. Концентрация RecX (нМ) указана на рисунке. RecAwt – сплошная линия, RecA D112R – пунктирная линия.

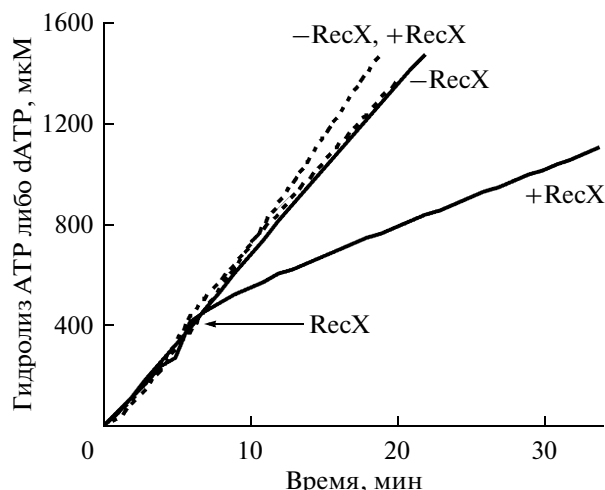


Рис. 5. Влияние белка RecX на RecA-зависимый гидролиз dATP. Концентрация RecA – 3 мкМ, поли(dT) – 5 мкМ, SSB – 0.5 мкМ, RecX – 100 нМ. Момент добавления RecX отмечен стрелкой. RecA::АТР – сплошная линия, RecA::dАТР – пунктирная линия.

нечного значения, что не наблюдалось в опытах с оцДНК фага M13. В отличие от кольцевой оцДНК фага M13 длиной около 7000 н. средняя длина поли(dT) равна 226 н. Предполагается, что белок RecA образует на поли(dT) более короткие филаменты с меньшим временем разборки, чем у филаментов на оцДНК фага M13. Вместе с тем, отсутствие белка SSB делает процесс разборки филамента менее сложным. Несмотря на то, что различие между мутантным RecA и белком дикого типа оказалось не слишком большим, RecA D112R обладал достоверно большей устойчивостью к RecX (рис. 4).

Белок RecA может создавать филамент на оцДНК в присутствии dATP. Скорость гидролиза dATP превышает скорость гидролиза АТР на 15–20%. Известно, что RecA, заряженный молекулой dATP вместо АТР, активнее конкурирует с белком SSB за сайты связывания на оцДНК, так как у него меняется сродство к оцДНК [9, 31]. Мы впервые изучили действие RecX на RecA в присутствии dATP. Так же, как и в предыдущем опыте, использовали поли(dT) и не использовали белок SSB. На рис. 5 видно, что белок RecA значительно более устойчив к действию RecX, если АТР замещен на dATP. Подобная замена повышает стабильность филамента RecA как дикого типа, так и мутантного, в реакции с RecX и носит, видимо, универсальный характер.

Влияние мутации D112R на УФ-выживаемость штаммов в присутствии и в отсутствие синтеза RecX

Известно, что дополнительный синтез белка RecX *in vivo* приводит к увеличению чувствительности бактериальной клетки к УФ-излучению. На-

пример, если УФ-облучение клеток сопровождается индукцией синтеза RecX IPTG, то наблюдается снижение выживаемости клеток, несущих плазмиду с геном *recX*, в отличие от условий, в которых синтез RecX не индуцировали. Отсутствие же хромосомного гена *recX* почти не влияет на выживаемость *E. coli*. Полная делеция *recX* едва заметно увеличивает чувствительность к УФ-излучению [16]. Как сказано выше, мутантный белок RecA D112R характеризуется повышенной устойчивостью к RecX *in vitro*. С целью изучения влияния RecX на белок RecA D112R *in vivo* мы оценили выживаемость клеток *E. coli*, несущих плазмиды с генами *recAwt* и *recAD112R*, после УФ-облучения. В отсутствие экспрессии гена *recX* штаммы, несущие RecA дикого типа и RecA D112R, имели сходную УФ-выживаемость. Эти данные хорошо согласуются с опубликованными ранее результатами [22]. Вместе с тем, добавление IPTG индуцировало экспрессию плазмидного гена *recX*, что, как и ожидалось, приводило к снижению УФ-выживаемости штамма, несущего RecA дикого типа, где фактор отношения угла наклона кривых равен 1.52 (рис. 6). Угол наклона кривой выживаемости штамма с плазмидой, несущей ген *recA*, отличается от угла наклона кривой бесплазмидного штамма в 2.6 раза. Экспрессия гена *recX* не влияет на выживаемость штамма, несущего RecA D112R, где фактор остается равным единице. Таким образом, показано, что устойчивость RecA D112R к RecX повышена не только *in vitro*, но и *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аминокислотная замена D112R значительно изменяет свойства белка RecA *in vitro* и *in vivo*. Мутант-

ный белок RecA проявляет устойчивость к действию белка RecX и одновременно более эффективно конкурирует с белком SSB за сайты связывания на оцДНК, чем белок RecA дикого типа. Результаты изучения конкуренции за ДНК между RecA D112R и белком SSB свидетельствуют о том, что мутантный белок активнее мультимеризуется на оцДНК, чем RecA дикого типа. Такая активность в формировании филамента может объясняться повышенным сродством к оцДНК либо усилением межмономерных взаимодействий между субъединицами мутантного белка. Последнее представляется наиболее вероятным, если учесть, что замена D112R расположена в области межмономерного контакта структуры филамента [22]. Интерес к механизму регуляции филамента RecA белком RecX появился в течение нескольких последних лет [19–21], поэтому изучение RecA D112R становится актуальным. Сложность интерпретации результатов заключается в том, что белок RecX способен взаимодействовать как непосредственно с белком RecA, так и с оцДНК, причем оба типа взаимодействия, по-видимому, могут кооперативно усиливать друг друга. Таким образом, наша основная задача состояла в изучении механизма устойчивости филамента, образуемого мутантным белком, к действию RecX. Ранее был описан другой мутантный белок RecA, проявляющий подобное свойство в отношении RecX, — белок RecAΔ17. Согласно [23], 17 делетируемых C-концевых аминокислотных остатков необходимы для регуляции взаимодействия RecA с белком RecX. Позднее мы показали, что SSB способствует устойчивости белка RecA к действию RecX [21]. Это наблюдение позволяет предложить модель, в которой повышенная устойчивость мутанта RecA D112R к RecX может определяться в ходе особых конкурентных отношений с белком SSB. Действительно, при высокой концентрации SSB наклон кривой активности АТФазы, определенной в присутствии белка RecX, не слишком сильно отличается от такой кривой, полученной в отсутствие RecX (рис. 2, рис. 3). Вместе с тем, в опыте с поли(dT) и при полном отсутствии SSB показано, что филамент RecA D112R обладает устойчивостью к RecX.

Для того, чтобы определить положение мутации D112R в белке RecA относительно белка RecX, с помощью методов молекулярного моделирования и докинга воспроизвели модель комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX (рис. 7а) так же, как это было сделано ранее [20]. Эту модель мы подвергли модификации (рис. 7б). В пространственных структурах этого комплекса RecX образует непосредственный контакт с шестью мономерами RecA (рис. 7а) либо с тремя мономерами RecA (рис. 7б) и оцДНК. Из этих моделей можно заключить, что минимальное расстояние от RecX до аминокислотного остатка в положении 112 в комплексе RecA::оцДНК::АТФ::RecX составляет около 28 Å, что фактически исключает возможность прямого влияния замены D112R на

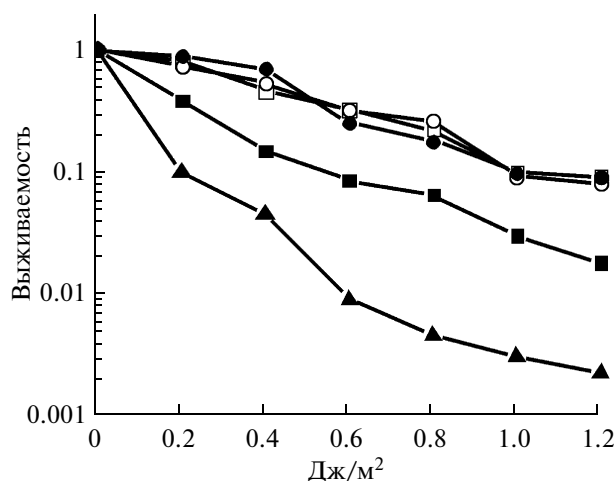


Рис. 6. Изучение зависимости выживаемости клеток от дозы УФ-излучения. Методика опыта описана в “Экспериментальной части”. (▲) — BLRΔrecA; (□) — BLR precX recA; (■) — BLR precX recA + IPTG; (○) — BLR precX pUCD112R; (●) — BLR precX pUCD112R + IPTG.

взаимодействие с белком RecX. Более того, ни при каких конформационных изменениях, не нарушающих структуру филамента белка RecA, аминокислотный остаток в положении 112 не может приблизиться к RecX на расстояние менее 25–28 Å. Таким образом, прямой контакт между этим аминокислотным остатком и RecX невозможен.

Исходя из перечисленных данных, мы заключаем, что в основе повышенной устойчивости RecA D112R к RecX скорее всего лежит изменение динамики взаимодействия филамента с оцДНК. На сегодняшний день существуют две модели, описывающие механизм ингибирования филамента белком RecX. Согласно первой из них, белок RecX связывается с растущим концом филамента, который граничит с брешью, блокируя присоединение следующего мономера. Согласно второй модели, белок RecX вызывает диссоциацию мономеров от всего филамента в местах случайного связывания с RecA. Обе модели исключают активное связывание RecX с ДНК за пределами филамента [19, 20]. Мы предлагаем модель ингибирования, в которой мономеры мутантного белка в ходе элонгации филамента эффективно опережают связывание RecX с растущим концом филамента. Действительно, возможно построение комплекса RecA::оцДНК::АТФ::RecX, в котором RecX одной частью связывается с филаментом, тогда как его другая часть вовлечена в непосредственное взаимодействие с ДНК перед филаментом. В этом случае доступ следующего мономера к растущему концу филамента заблокирован, так как RecX занимает пространство, необходимое для элонгации (рис. 7б). Полная энергия такого комплекса равна –127.53 ккал/моль и сопоставима с энергетическим состоянием комплекса, где RecX не взаимодействует с ДНК за пределами филамента, а

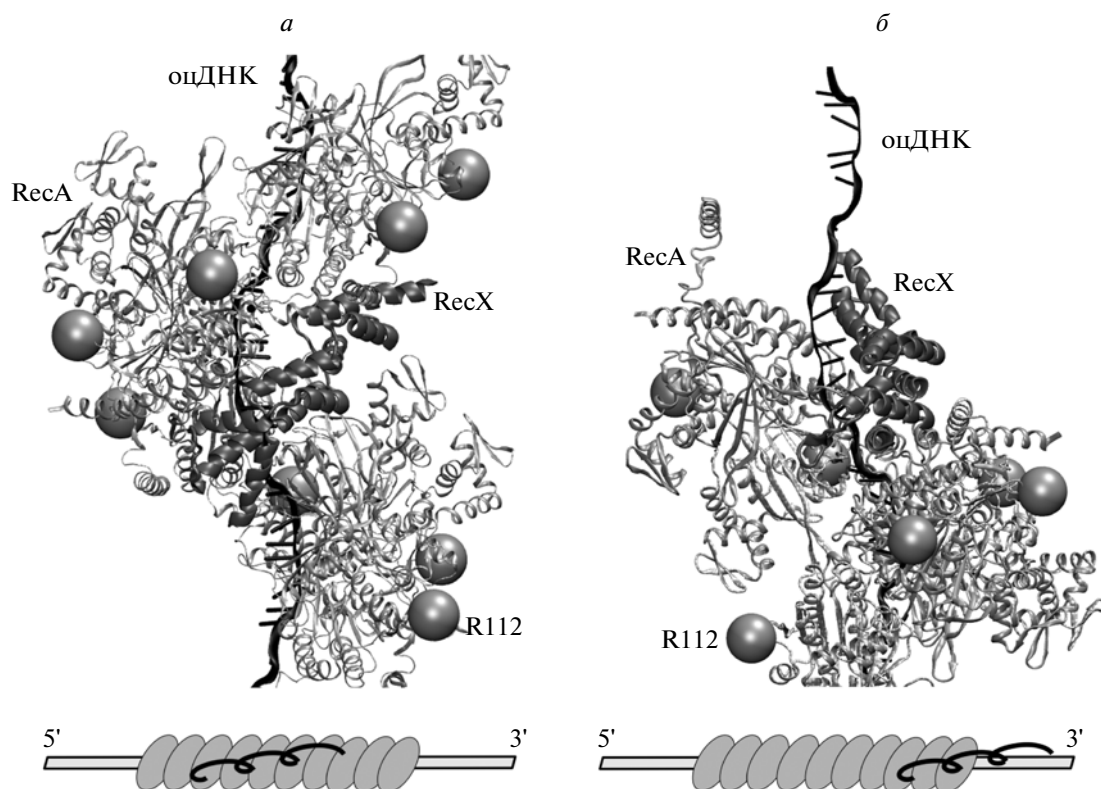


Рис. 7. Модель комплекса RecA::оцДНК::АТР::RecX. Белок RecX показан темным цветом. Сферами выделены места локализации замены D112R. *a* – RecX полностью встроен в филамент и образует контакт с шестью мономерами; *б* – RecX образует контакт с тремя мономерами, выходя за пределы филамента. Часть молекулы RecX взаимодействует со свободной от RecA оцДНК перед филаментом, занимая пространство, необходимое для присоединения следующих мономеров RecA.

полностью встроен в филамент (-127.51 ккал/моль). Такая модель ингибирования не только может объяснить преимущество RecA с повышенной динамикой филаментации, вызванной заменой D112R либо АТР \rightarrow dАТР, но и одновременно разъясняет природу антагонизма между белками SSB и RecX. Занимая сайт оцДНК перед филаментом, белок SSB, возможно, удерживает пространство на этом участке ДНК от взаимодействия с RecX, позволяя новым мономерам RecA достраивать филамент.

Методы докинга белков RecA и RecX предоставляют возможность выявлять аминокислотные остатки RecA, непосредственно контактирующие с белком RecX. Таким образом, дальнейшее изучение белков RecA с мутациями по этим аминокислотам создаст основу для более полного понимания механизмов регуляции филамента RecA и SOS-ответа белком RecX.

Авторы признательны А.Л. Тимковскому, М.Г. Петухову, Г. Рычкову, а также В.Н. Вербенко за обсуждение результатов и помощь в оформлении работы.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-01229) и

Грантом министерства образования и науки РФ (№ 2.2.1.1/12882).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roca A.I., Cox M.M. 1990. The RecA protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 415–456.
2. 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.
3. Ланцов В.А. 2007. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК. *Молекуляр. биология.* **41**, 467–477.
4. Register J.C., Griffith J. 1985. The direction of RecA protein assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. *J. Biol. Chem.* **260**, 12308–12312.
5. Bork J.M., Cox M.M., Inman R.B. 2001. RecA protein filaments disassemble in the 5' to 3' direction on single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **276**, 45740–45743.
6. Joo C., McKinney S.A., Nakamura M., Rasnik I., Myong S., Ha T. 2006. Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution. *Cell.* **126**, 515–527.

7. Galletto R., Amitani I., Baskin R.J., Kowalczykowski S.C. 2006. Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules. *Nature*. **443**, 875–878.
8. van Loenhout M.T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. 2009. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA. *Nucleic. Acids Res.* **37**, 4089–4099.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.C., Lauder S.D., Rehrauer W.M. 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **58**, 401–465.
16. 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.
17. 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. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 12091–12096.
18. 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.
19. Drees J.C., Lusetti S.L., Chitteni-Pattu S., Inman R.B., Cox M.M. 2004. A RecA filament capping mechanism for RecX protein. *Mol. Cell.* **15**, 789–798.
20. 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.
21. Baitin D.M., Gruenig M.C., Cox M.M. 2008. SSB antagonizes RecX-RecA interaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 14198–14204.
22. Eldin S., Forget A.L., Lindenmuth D.M., Logan K.M., Knight K.L. 2000. Mutations in the N-terminal region of RecA that disrupt the stability of free protein oligomers but not RecA-DNA complexes. *J. Mol. Biol.* **299**, 91–101.
23. 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**, 52991–52997.
24. Cox M.M., McEntee K., Lehman I.R. 1981. A simple and rapid procedure for the large scale purification of the recA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 4676–4678.
25. Alexseyev A.A., Baitin D.M., Kuramitsu S., Ogawa T., Ogawa H., Lanzov V.A. 1997. A recombinational defect in the C-terminal domain of *Escherichia coli* RecA2278-5 protein is compensated by protein binding to ATP. *Mol. Microbiol.* **23**, 255–265.
26. 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.
27. Chen Z., Yang H., Pavletich N.P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*. **453**, 489–494.
28. Nemethy G., Kenneth D., Palmer K., Yoon C., Paterlini G., Zagari A., Shirley R., Scheraga H. 1992. Energy parameters in polypeptides. 10. Improved geometrical parameters and nonbonded interactions for use in the ECEPP/3 algorithm, with application to proline-containing peptides. *J. Phys. Chem.* **96**, 6472–6484.
29. Abagyan R., Frishman D., Argos P. 1994. Recognition of distantly related proteins through energy calculations. *Proteins*. **19**, 132–140.
30. Madiraju M.V., Lavery P.E., Kowalczykowski S.C., Clark A.J. 1992. Enzymatic properties of the RecA803 protein, a partial suppressor of recF mutations. *Biochemistry*. **31**, 10529–10535.
31. Menetski J.P., Kowalczykowski S.C. 1989. Enhancement of *Escherichia coli* RecA protein enzymatic function by dATP. *Biochemistry*. **28**, 5871–5881.