

## ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ГОМОЛОГИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ И ГИПЕРРЕКОМБИНАЦИИ В КЛЕТКЕ *E. coli*

© 2013 г. И. В. Бахланова<sup>1</sup>, А. В. Дудкина<sup>1,2</sup>, Д. М. Байтин<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, 188300

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург, 195251

Поступила в редакцию 22.03.2012 г.

Принята к печати 20.09.2012 г.

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. Ряд мутантных и природных белков RecA имеет повышенный рекомбинационный потенциал *in vitro* и *in vivo*, если сравнивать с белком RecA дикого типа из *Escherichia coli*, что приводит к гиперрекомбинации. Гиперактивность белка RecA в проведении рекомбинационного процесса во многом зависит от динамики его полимеризации на оцДНК, а также ДНК-трансферазных свойств, что может являться следствием не только специфических аминокислотных замен этого белка, но и сбоями в работе энзиматического аппарата клетки, включающего такие белки как RecO, RecR, RecF, RecX, DinI, SSB, PsiB. К настоящему времени функции каждого из этих белков, в основном, определены на молекулярном уровне, но роль некоторых из них при гиперрекомбинации еще только предстоит выяснить. Повышение рекомбиногенности *in vivo* не всегда полезно для клетки и поэтому ограничивается тем или иным способом. Кроме ограничений, наложенных возможностями энзиматического аппарата клетки, в ряду клеточных генераций геномные перестройки закрепляются в результате эволюционного отбора против гиперрекомбинации. Большинство из них направлено на подавление экспрессии гиперактивных белков RecA. Рассматриваются различные способы их регуляции в некоторых модельных системах.

**Ключевые слова:** белок RecA, SOS-ответ, филамент, регуляция, рекомбинация.

ENZYMATIC CONTROL OF HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN *Escherichia coli* CELLS AND HYPER-RECOMBINATION, by I. V. Bakhlanova<sup>1</sup>, A. V. Dudkina<sup>1</sup>, D. M. Baitin<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Russian Academy of Sciences, Gatchina, St. Petersburg, 188300 Russia, \*e-mail: dimabaitin@yahoo.com; <sup>2</sup>St. Petersburg State Polytechnical University, St. Petersburg, 195251 Russia). The RecA protein is a major enzyme of homologous recombination in bacterial cell. Forming a right-handed helical filament on ssDNA, it provides a homology search between two DNA molecules and homologous strand exchange. The RecA protein not only defends the cell from exposure to ionizing radiation and UV-irradiation, but also ensures the recombination process in the course of normal cell growth. A number of wild-type or mutant RecA proteins demonstrate increased recombinogenic properties *in vitro* and *in vivo* as compared with the wild-type RecA protein from *Escherichia coli*, which leads to hyper-recombination. The hyper-rec activity of RecA proteins during the recombination process in many depends on the filamentation dynamics on ssDNA and DNA-transferase properties. Changes in filamentation and DNA-transferase abilities of RecA protein may be the result of not only specific amino-acid substitutions, but also the functioning of the cell enzymatic apparatus, including such proteins as RecO, RecR, RecF, RecX, DinI, SSB, PsiB. To date, the function of each of these proteins is identified at the molecular level. However, the role of some of them in the cell metabolism remains to be seen. Increase in recombination *in vivo* is not always useful for a cell and faces various limitations. Moreover, in the bacterial cell some mechanisms are activated, that cause genomic reorganization, directed to suppress the expression of hyper-active RecA protein. The ways of hyper-active RecA protein regulation are very interesting, and they are studied in different model systems.

**Keywords:** RecA protein, ssDNA, filament, regulation, recombination.

DOI: 10.7868/S0026898413020031

Принятые сокращения: оцДНК – одноцепочечная ДНК; дцДНК – двуцепочечная ДНК; ЧРО – частота рекомбинационных обменов.

\* Эл. почта: dimabaitin@yahoo.com

## ВВЕДЕНИЕ

Белок RecA — центральный фермент в комплексе, осуществляющим гомологическую рекомбинацию и рекомбинационную репарацию ДНК в бактериальной клетке. В ходе нормального клеточного роста белок RecA необходим при вынужденной остановке репликации, что сопровождается коллапсом репликативной вилки вблизи повреждения на оцДНК. При воздействии ионизирующей радиации на клетку RecA может участвовать в репарации двунитевых разрывов. Одна из функций белка RecA — поиски гомологии между двумя молекулами ДНК и обмен гомологичных нитей [1–6]. Этому этапу предшествует пресинаптическая стадия, в ходе которой RecA, в присутствии молекулы АТФ и магния, кооперативно мультимеризуется вдоль оцДНК. В стрессовой для клетки ситуации количество филаментов на поврежденных участках ДНК возрастает, что инициирует так называемую SOS-функцию белка. В норме SOS-состояние клетки контролируется репрессорным белком LexA, который при взаимодействии с филаментом RecA начинает интенсивно саморасщепляться, и по мере того, как концентрация LexA в клетке уменьшается, промоторы генов SOS-ответа открываются. При этом изменяется экспрессия более 40 генов, в том числе и самого гена *recA*.

Функции филамента RecA и его структура достаточно хорошо изучены. Молекулярный механизм поиска и обмена гомологичных нитей ДНК несколько лет назад был подробно описан Ланцовым [3].

Другой, не менее важный аспект рекомбинационного процесса, — регуляция RecA вспомогательными или регуляторными белками. Например, показано, что взаимодействие множества белков и белковых комплексов может оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на формирование филамента RecA. К настоящему времени опубликованы тысячи экспериментальных работ и обзоров, посвященных регуляции активности белка RecA и гомологической рекомбинации у прокариот. Задачей нашего обзора не является описание функций, структурных особенностей и биохимических характеристик всей палитры ферментов, экспрессируемых в ходе SOS-ответа клетки. Мы полагаем, что особый интерес представляет явление гиперрекомбинации и возможности ее регуляции, заложенные как в самой структуре белка RecA, так и в энзиматической системе клетки. Кроме того представляется важным понять те последствия, которые в бактериальной клетке сопровождают гиперрекомбинацию. Поэтому в данном обзоре мы сфокусируем внимание на гиперактивных природных, не принадлежащих *E. coli*, и на мутантных формах RecA, а также на основных регу-

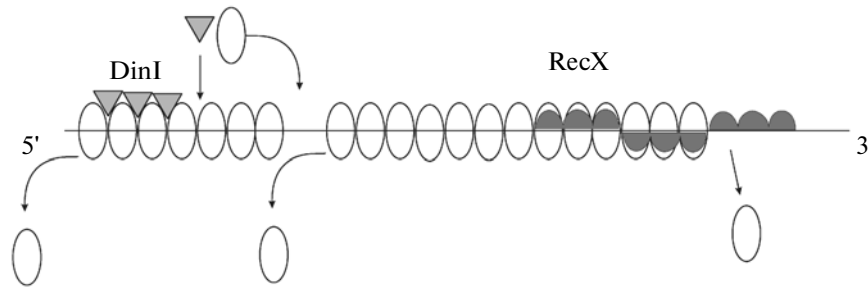
ляторных белках, от функций которых зависит проявление рекомбинационных свойств филамента. Мы покажем роль этих гиперактивных белков RecA на разных уровнях регуляции рекомбинационного процесса, включая конъюгационную рекомбинацию, SOS-ответ и устойчивость к УФ-облучению.

## ГИПЕРАКТИВНОСТЬ RecA И ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИЛАМЕНТА

Остановимся на функциях белка RecA, которые первостепенно важны для процесса его филаментации на оцДНК и изменение которых может привести к гиперактивности. Комплекс RecA с оцДНК представляет собой компактную спиральную структуру с шагом спирали 93.96 Å [7], диаметром спирали около 10 нм [8] и расстоянием между нуклеотидами 5 Å [9]. ОцДНК в таком комплексе растянута в 1.5 раза по сравнению со своей исходной длиной. Регуляция активности филамента большинством вспомогательных белков осуществляется через стимуляцию либо сборки, либо разборки филамента на ДНК. Таким образом, динамика взаимодействия RecA с ДНК является одним из ключевых факторов, определяющих протяженность филамента и, как следствие, его активность в поиске гомологии.

Различают два основных этапа мультимеризации RecA на ДНК. Первый — инициация образования филамента, или нуклеация, при которой несколько мономеров RecA “сажаются” на оцДНК. Для этого достаточно пяти мономеров. На один мономер RecA приходится три нуклеотида оцДНК. Второй этап — удлинение филамента, или элонгация, в ходе которой новые мономеры RecA последовательно присоединяются к исходным на 3'-конце растущей цепи (рис. 1). По достижении филаментом длины в 6–10 мономеров начинается гидролиз АТФ, причем его скорость вдоль всего филамента одинакова ( $k_{\text{cat}} = 30 \text{ мин}^{-1}$ ). Гидролиз АТФ координирован и осуществляется в виде организованной волны, в которой с некоторой периодичностью задействованы все мономеры филамента. Разборка филамента происходит в том же направлении, что и сборка: мономеры RecA диссоциируют от филамента с 5'-конца относительно оцДНК с константой скорости  $k_{\text{off}} = 123$  мономеров в минуту на один конец филамента. При этом момент диссоциации концевой мономера непосредственно сопряжен с гидролизом молекулы АТФ [10–15].

Изменение одного или нескольких биохимических свойств белка *in vitro* в сторону повышения активности называют гиперактивностью. Возникает вопрос, изменяется ли АТФ-зависимая активность того или иного мутантного RecA в зависимости от изменения скорости диссоциации протомеров от



**Рис. 1.** Сборка и разборка филамента RecA. Отдельные кластеры разделены брешью. Белок DinI (треугольники) стабилизирует разборку филамента. Белок RecX (полусферы) провоцирует диссоциацию филамента от ДНК.

ДНК? Экспериментальные факты указывают на то, что не изменяется. Аминокислотная замена E38K приводит к тому, что диссоциация RecA от ДНК существенно уменьшается. При этом взаимообмен между пулом свободных мономеров, находящихся вне ДНК, и пулом мономеров, сидящих на ДНК, происходит значительно реже, чем в случае белка RecA дикого типа из *E. coli*. Однако скорость гидролиза АТФ мутантного белка RecAE38K почти не изменяется [16].

Другой пример – гиперактивный белок RecA из *P. aeruginosa*. Скорость гидролиза АТФ этого белка на 10% выше, чем белка из *E. coli*, тогда как скорость диссоциации от ДНК в три раза медленнее [17]. Но есть примеры и позитивной корреляции. В химерном белке RecAX53, состоящем из участков RecAEc и RecAPa, скорость гидролиза АТФ почти двукратно больше и скорость разборки крайне интенсивна [18]. Таким образом, хотя момент диссоциации концевой мономера действительно сопряжен с гидролизом молекулы АТФ, по-видимому, не каждый гидролитический акт приводит к отсоединению концевой мономера от филамента. Наконец, может, вероятно, происходить смыкание 3'- и 5'-концевых мономеров соседних филаментов [19]. Интересно, что при одновременной инициации нескольких независимых филаментов в различных участках ДНК в месте их стыка с достаточной частотой должны возникать короткие брешы длиной в один или два нуклеотида. Так как эти брешы, в силу своего небольшого размера, остаются недоступными для связывания мономером RecA, они служат естественными ограничителями длины филамента.

Таким образом, группа последовательно соединенных друг с другом мономеров, отделенных с обоих концов брешами от остальной цепи филамента, представляют собой отдельный кластер. Длина его должна варьировать в зависимости от соотношения кинетики нуклеации на ДНК и кинетики элонгации. Показано, что в присутствии негидролизуемого аналога АТФ – АТФ $\gamma$ S – частота нуклеации в пять раз выше, чем в присутствии АТФ [15]. Скорости элонгации и нуклеации могут

варьировать не только в зависимости от кофактора, но и от природы самого RecA. Например, скорость элонгации RecA из микроорганизма *Deinococcus radiodurans* ниже, чем скорость элонгации RecA из *E. coli*, тогда как частота возникновения точек его нуклеации на ДНК выше [20]. Вместе с тем, есть данные, что спустя некоторое время после начала образования филамента число брешей значительно уменьшается, хотя причина этого явления неясна [19]. В свою очередь, компьютерное моделирование в исследовании динамики филаментации RecA пока не помогает объяснить исчезновение или появление новых брешей [21]. По данным Кокса (Cox) и соавт. [22], на филамент, содержащий ДНК длиной 8 т.п.н., приходится всего 3–4 брешы.

Здесь следует отметить, что результаты исследований в разных лабораториях несколько отличаются и зависят от использованного метода, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Если такой метод, как “method single molecule”, позволяет напрямую регистрировать изменение физических параметров филамента RecA, то метод, основанный на применении *in vitro* других белков, участвующих в конкурентном связывании ДНК в сложной биохимической реакции, дает лишь косвенные данные о филаментации RecA. Как правило, эти данные основаны на изменении скорости гидролиза АТФ. Действительно, если конкурирующий за ДНК какой-либо белок приводит к уменьшению скорости RecA-зависимого гидролиза АТФ, то это свидетельствует лишь о разборке филамента RecA. Однако, несмотря на доступность такого метода, результаты сложно интерпретировать. Так, данные анализа кривых ингибирования RecA-зависимой АТФазы белком RecX могут быть верны только в том случае, если RecX взаимодействует с филаментом исключительно на сайте, где расположена брешь согласно предложенной ранее модели [22]. Более детальное ее обсуждение мы представим в главе, посвященной регуляторным белкам. Но сам подход содержит в себе серьезные противоречия. Например, замещение RecX

из *E. coli* на аналогичный белок из *Neisseria gonorea* приводит к значительно более быстрому распаду филамента RecA. И это несмотря на то, что разборка филамента, казалось бы, должна находиться только в зависимости от числа брешей в самом филаменте — и ни от чего другого [23]. Этот факт, на наш взгляд, свидетельствует о том, что метод анализа с использованием RecX мало объективен, либо следует признать, что RecX из *N. gonorea* ингибирует активность RecA каким-то иным способом.

Возвращаясь к гиперактивным мутантным и природным рекомбиназам, важно отметить, что гиперактивные RecA-белки характеризуются значительными различиями в динамике их филаментации на оцДНК. Наблюдаются либо высокая скорость сборки филамента, либо — в других случаях — низкая скорость разборки [16–18]. Аналогичные изменения филаментации можно воспроизвести *in vitro* и на белке дикого типа. Так, замещение кофактора белка RecA АТФ на dАТФ приводит к значительному изменению характера филаментации, в ходе которой белок дикого типа проявляет себя при действии на него регуляторных белков иначе и становится подобен гиперактивному мутанту [23]. Однако в связи с тем, что концентрация dАТФ в бактериальной клетке недостаточна, этот результат невозможно применить для моделирования гиперрекомбиниогенности *in vivo*, и он остается лишь биохимическим трюком.

Таким образом, гиперактивные возможности RecA, в большой степени, определяются такими факторами, как динамика филаментации, непрерывность или прерывистость филамента, — независимо от того, вызваны они заменой кофактора, изменением каталитической активности АТФ-разного домена или удачным сочетанием аминокислот белка в нужном месте.

### РЕГУЛЯЦИЯ ФИЛАМЕНТАЦИИ RecA ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ

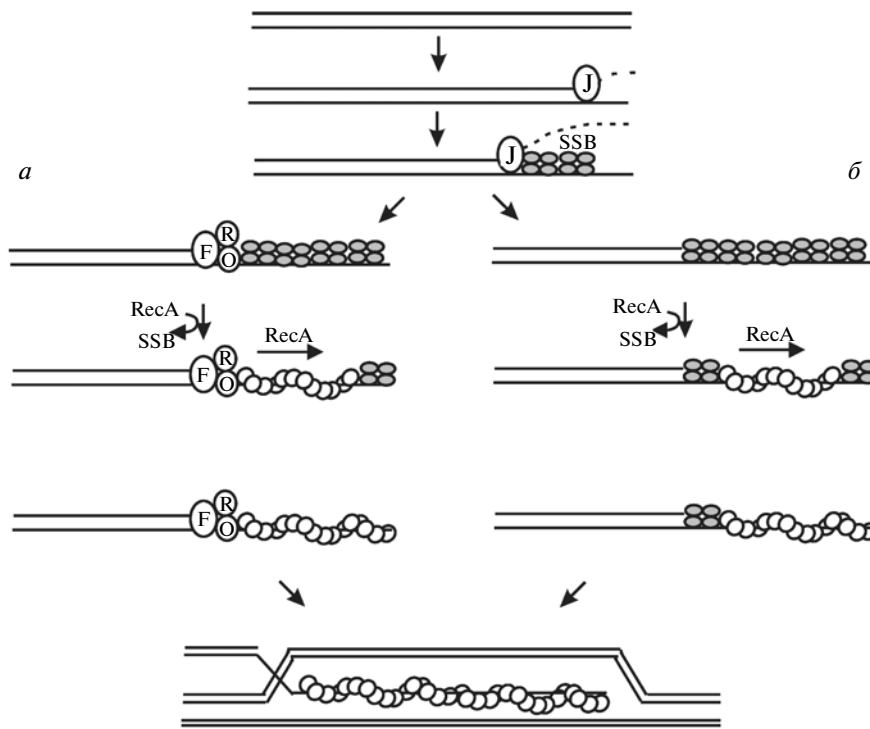
Итак, возможности гомологической рекомбиназы во многом зависят от факторов, влияющих на динамику филаментации на оцДНК. Изменение этой динамики может быть не только результатом специфических аминокислотных замен в рекомбиназе, но и влияния энзиматического аппарата клетки. Различают всего два пути развития рекомбинационных событий в зависимости от типа повреждения ДНК (однонитевой или двунитевой разрыв). В случае двунитевого разрыва реализуется сценарий пути RecBCD, тогда как в случае однонитевого повреждения — путь RecFOR. Раскручивание и экзонуклеазная деградация двунитевой донорной ДНК белком RecBCD сопровождается образованием молекулы ДНК с 3'-выступающим однонитевым концом. Комплекс RecBCD

представляет собой мультифункциональный фермент, состоящий из субъединиц RecB, RecC и RecD. Он обладает ДНК-зависимой АТФазной, ДНК-геликазной, 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 мелких и крупных фрагментов оцДНК. Приблизившись к последовательности *chi*, находящейся в строго определенной ориентации (3'-GGTGGTCG-5'), белок RecBCD останавливается, субъединица RecD модифицируется, что приводит к потере 3'- и к активации 5'-экзонуклеазной активности. Таким образом, дальнейшее раскручивание ДНК приводит к образованию однонитевого 3'-конца, который может быть использован белком RecA для инициирования рекомбинации.

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 из случаев в процесс подключаются разные энзиматические системы, рекомбинационные пути имеют одно общее свойство — они образуют 3'-выступающий конец оцДНК, покрытый филаментом RecA [24–27]. Подавляющее число рекомбинационных событий иницируется именно 3'-концом оцДНК, и только небольшая часть иницируется 5'-концом [28, 29].

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. Единственный из регуляторных белков (белок PsiB) связывается в растворе со свободной формой RecA, но не взаимодействует — сколько-нибудь заметно — с SSB, LexA или ДНК [30]. Природный промотор гена *psiB*, расположенный на F-плазмиде, активируется только в ходе бактериальной конъюгации и только в клетке реципиента [31]. Таким образом, функция белка PsiB — ингибирование SOS-ответа клетки в ходе конъюгации, когда образуются протяженные участки оцДНК. Связываясь с белком RecA, белок PsiB понижает его эффективную концентрацию, оставляя оцДНК интактной.

С другой стороны, в отсутствие SOS-ответа, доступ белка RecA к оцДНК заблокирован белком SSB. Белок SSB — один из самых важных участни-



**Рис. 2.** *а* – Комплекс RecFOR способствует посадке RecA на оцДНК, покрытую белком SSB в месте перехода оцДНК в дцДНК. *б* – Комплекс RecOR способствует посадке RecA вдоль всей молекулы оцДНК. Гиперактивные рекомбиназы осуществляют посадку без помощи комплекса RecOR.

ков метаболизма бактериальной клетки. Его экспрессия в значительной степени SOS-независима. Длительное время предполагалось, что белки RecA и SSB взаимодействуют напрямую. Однако, несмотря на значительную роль, которая, по-видимому, присуща белку SSB в рекомбинационном процессе, их связь осуществляется опосредованно – через ДНК либо другие медиаторные белки. Белок SSB, взаимодействует с оцДНК, связывая это естественное препятствие для инициации филамента белком RecA. В силу особенностей его взаимодействия с ДНК процесс элонгации филамента RecA на оцДНК, наоборот, не встречает препятствия в виде белка SSB. Более того, белок SSB расплавляет вторичную структуру ДНК, позволяя филаменту RecA занять все свободные сайты на оцДНК [32–34]. На более поздних стадиях рекомбинационного процесса белок SSB катализирует завершающую стадию реакции обмена гомологичных нитей. Связываясь с 5'-концом высвобождаемой из рекомбинационного комплекса нити, он предотвращает реинициацию филамента RecA и обеспечивает направленный ход реакции с последующим разделением нитей ДНК [35].

Таким образом, на каждом из этапов рекомбинационного процесса существует тонкая функциональная взаимосвязь белков RecA и SSB. Большинство же других вспомогательных белков участвует в регуляции этого “бесконтактно-

го” взаимодействия. Так, белки RecF, RecO и RecR помогают белку RecA инициировать филамент на оцДНК, занятой белком SSB. Они многократно ускоряют кинетику нуклеации RecA. Примечательно, что различают два варианта белковых комплексов: RecOR и RecFOR. Комплекс RecOR стимулирует инициацию филамента RecA на сайтах, расположенных вдоль всей оцДНК, покрытой белком SSB (рис. 2*б*). Функция комплекса RecFOR куда более универсальна с точки зрения ее значимости для клетки. Он стимулирует инициацию филамента *in vitro* в месте перехода оцДНК в дцДНК (рис. 2*а*). Подобные структуры ДНК должны образовываться в клетке непосредственно после 5'-нуклеазной деградации белком RecJ одной из комплементарных нитей ДНК. Белковый комплекс RecFOR связывается с ДНК в месте стыка оц- и дцДНК. После этого комплекс “загружает” мономеры RecA, используя дцДНК как платформу, от которой филамент RecA интенсивно расширяется в зону оцДНК, покрытой белком SSB. Скорость расширения при данной стимуляции максимальна – относительно скорости при всех других известных условиях. С другой стороны, комплекс RecFOR препятствует проникновению мономеров в зону дцДНК, играя роль своеобразного клапана [36–38].

После того, как филамент RecA с помощью комплекса RecFOR сформировал протяженный

филамент вдоль оцДНК, в игру вступают белки DinI и RecX. Белок DinI, связываясь с бороздкой филамента RecA, стабилизирует его разборку (рис. 1). Примечательно, что связывание филамента с DinI полностью исключает поиск гомологичной дцДНК и последующую реакцию обмена нитей. Покрытый белком DinI, филамент RecA переходит в режим некоего “законсервированного” состояния. Доступ гомологичной ДНК в бороздку филамента для переключения спаривания нитей ДНК заблокирован присутствием в бороздке белка DinI. Если работа белков RecO, RecF и RecR никак не угнетает рекомбинационную функцию RecA, то функция белка DinI представляется менее однозначной. Являясь позитивным регулятором филамента RecA, белок DinI блокирует связывание филамента не только с гомологичной дцДНК, но и с белком RecX [39, 40].

Белок RecX – негативный регулятор белка RecA как *in vivo*, так и *in vitro*. Показано, что RecX, взаимодействуя непосредственно с RecA, препятствует элонгации филамента, “принуждая” его диссоциировать от оцДНК [41–43]. Разработано несколько моделей угнетения филаментации RecA белком RecX. Согласно одной из них, RecX находит брешь в филаменте и, связываясь с ближайшим мономером, прерывает полимеризацию мономеров вдоль нити ДНК (рис. 1). При этом динамика диссоциации мономеров от 5'-конца филамента не нарушается, но прекращается процесс сборки, а именно – этапа достройки филамента с 3'-конца за счет присоединения новых мономеров [28]. Исходя из другой модели, RecX взаимодействует с мономерами RecA спонтанно вдоль всего филамента, провоцируя диссоциацию RecA прямо в местах их взаимодействия [44]. И, наконец, третья модель, предложенная нами, предполагает взаимодействие RecX с ДНК за пределами филамента [45]. Ранее мы показали, что белки RecX и SSB – это функциональные антагонисты: в присутствии белка SSB значительно снижается ингибирующее воздействие RecX на RecA. Эффект достигается при любой последовательности добавления белков в реакционную смесь и носит обратимый характер [46]. Так как межбелковые взаимодействия между RecX и SSB не обнаружены, а белок SSB не взаимодействует с RecA, можно сделать вывод, что в процесс регуляции вовлечены участки ДНК, находящиеся либо внутри филамента, либо непосредственно за его пределами. Действительно, взаимодействие RecX с ДНК показано в нескольких работах, но величина константы их связывания низка и свидетельствует о том, что сродство RecX к ДНК слишком невелико, чтобы принимать его во внимание [29, 43]. Предполагают, что взаимодействие RecX с ДНК аллостерически усиливается самим филаментом RecA, но, возможно, в клетке имеются другие дополнительные факторы, осуществляю-

щие эту функцию. Таким образом, молекулярный механизм, лежащий в основе данного наблюдения, еще неизвестен. Остается также непонятным предназначение белка RecX.

## РЕКОМБИНОГЕННОСТЬ И ГИПЕРРЕКОМБИНАЦИЯ

Рекомбинационную активность мутантных и природных белков RecA *in vivo* исследуют различными методами. Несмотря на то, что ген *recA* имеет определяющее влияние на выживаемость бактерии в ходе УФ-облучения, исследование системы гомологической рекомбинации серьезно осложняется совместной с ней работой генов эксцизионной репарации. Однако участие генов гомологической рекомбинации в осуществлении бактериальной конъюгации позволило найти подход для выявления рекомбинационно-активных генов, мутаций и для определения степени их участия в рекомбинационном процессе. Увеличение числа актов инициации рекомбинационных обменов ДНК получило название гиперрекомбинация. Методы, основанные на применении бактериальной конъюгации, появились в семидесятых годах прошлого столетия, были усовершенствованы и не потеряли свою актуальность по сегодняшний день [47]. В ходе бактериальной конъюгации у *E. coli* донор передает реципиенту большой фрагмент хромосомы или даже полную хромосому, которая быстро интегрируется в хромосому реципиента. Переброска всей ДНК из донорной клетки в реципиент осуществляется в течение 100 минут, в связи с чем длина хромосомы бактериальной ДНК измеряется в минутах. Во время конъюгации одна нить ДНК донора своим 5'-концом входит в реципиентную клетку, где достраивается до двунитевой 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 однонитевым. До тех пор, пока донорная ДНК полностью не достроена до двунитевого состояния, она имеет смешанный характер, т.е. состоит из оц- и дцДНК с однонитевыми пробелами. Концы образовавшейся донорной дцДНК обрабатываются пресинаптическим комплексом RecBCD, и образующиеся при этом однонитевые 3'-концы внедряются в хромосому реципиента с образованием D-петель, которые, в свою очередь, становятся местами иницирования нового раунда репликации. Это приводит к тому, что фрагмент донорной ДНК оказывается интегрированным во вновь реплицированную хромосому. Таким образом, первый ме-

тод предполагает определение относительного числа бактериальных рекомбинантов, с помощью чего можно оценить эффективность интеграции донорной ДНК в хромосому реципиента. В большинстве случаев этот метод дает возможность лишь различить (*rec*–)- и (*rec*+)-фенотипы.

Второй метод – измерение частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) на единицу длины ДНК, что отражает гибридную структуру рекомбинанта, состоящую из фрагментов как донорной, так и реципиентной ДНК. Величина ЧРО определяется количественно и характеризует степень сцепленности между селективируемым и неселективируемым маркерами. Разработка подхода принадлежит Ллойд (Lloyd) [48]. Им же показана первостепенная роль генов *recA* и *lexA* в конъюгационной рекомбинации. В этой работе задействованы мутанты по обоим из генов [48]. Ген *lexA3* кодирует негидролизующую форму репрессорного белка (LexA3), которая блокирует экспрессию всех белков SOS-ответа, поддерживая лишь базовую концентрацию белка RecA в клетке. Мутантный белок RecAE38K, экспрессируемый геном *recA441 (tif-1, recA730)*, обладает повышенной способностью расщеплять репрессорный белок LexA дикого типа, что приводит к значительной дерепрессии всех белков SOS-ответа, включая его самого. Комбинируя имеющиеся варианты генов, Ллойд установил основные закономерности, первая из которых заключается в том, что ЧРО возрастает до определенного уровня при увеличении количества RecA. Другая закономерность состоит в том, что ЧРО зависит не только от количества RecA, но также от особенностей мутантного белка RecA и от присутствия белков SOS-ответа. В дальнейшем, усилиями нескольких исследовательских коллективов была показана принципиальная роль большинства генов *recF*- и *recBCD*-пути в конъюгационной рекомбинации [48–53]. Однако технические недостатки подхода – методики культивирования, обсева и анализа полученных данных – исключают объективное количественное сравнение генетических факторов. В лаборатории молекулярной генетики ПИЯФ РАН метод анализа ЧРО в значительной степени усовершенствован [47]. Для обсева данных впервые применена формула Холдейна. Кроме того, подбор генетических маркеров усовершенствовали таким образом, чтобы обеспечить равновероятность рекомбинационных событий на каждом из анализируемых участков ДНК F'-плазмиды. Проанализировано более сотни мутантов *recA* и других рекомбиногенных факторов. Наиболее значимые из них приведены в таблице.

Как видно из таблицы, исследованная ранее Ллойдом мутация E38K оказалась не единственной. Особенности филаментации всех указанных в таблице белков RecA исследованы *in vitro*. Их

Относительные величины частоты рекомбинационных обменов (ЧРО) и конститутивной SOS-индукции для различных белков RecA *in vivo*

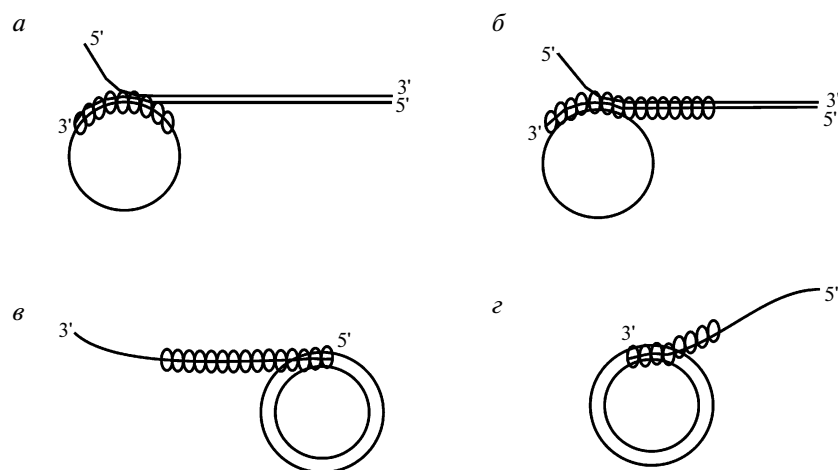
Белок RecA	ΔЧРО*	ΔSOS**
Wt	1.0	1.0
X21	2.9	1.7
Pa	8.3	1.8
E38K	7.8	8.8
X53	8.9	1.3
D112R	52.6	2.3
Δ17Ec	4.3	–
ΔrecF	0.5	–
<i>recO</i> ::Tn5	0.6	–
<i>recR</i> ::Tn10-9	0.6	–
ΔrecX	1.1	–
ΔdinI	1.7	–
<i>recX</i> ind	0.76	–
<i>dinI</i> ind	0.13	–

\* ΔЧРО – относительная величина ЧРО. ЧРО wt равняется примерно пяти обменам на геном *E. coli*. ΔЧРО получали путем деления абсолютной величины ЧРО на ЧРО wt (равной 5).

\*\* ΔSOS – конститутивный уровень SOS-индукции измеряли по уровню β-галактозидазы в штамме *E. coli* GY7109 *sfIA::lacZ* после трансформации плазмидами, содержащими исследуемые гены *recA*. Для белка RecA wt уровень β-галактозидазы – 16 ед. [49].

активность в гомологической рекомбинации *in vivo* воссоздана на модельной системе *in vitro*, которая получила название “реакция обмена гомологическими нитями ДНК” (рис. 3). Промежуточный продукт каждого из вариантов реакции обмена нитей, изображенных на рисунке, называется “объединенные молекулы”. Их появление регистрируют либо по подвижности в агарозном геле, либо с помощью флуоресцентной техники. Такое комплексное исследование свойств гиперактивных вариантов RecA позволило, в итоге, понять, какие функции филамента имеют первостепенное значение для гиперрекомбинации.

Исследование молекулярных процессов, лежащих в основе рекомбиногенной активности клетки, ставит ряд первоочередных вопросов. 1) Каков возможный диапазон рекомбиногенной активности? 2) Какие факторы дают основной вклад в изменение рекомбиногенной активности, и чем они ограничены? 3) Каков уровень рекомбиногенности, который аномален для клетки, каковы деструктивные последствия и пути естественного подавления этого аномального уровня? Ответить на все эти вопросы помогают исследования по анализу ЧРО, регулируемой различными рекомбинационными белками в ходе конъюгационной рекомбинации. Этот анализ по-



**Рис. 3.** *a* – Классический, или прямой, обмен нитей; *б* – обратный обмен нитей; *в* – Д-петля с участием 5'-конца; *г* – Д-петля с участием 3'-конца.

казал, что степень гиперрекомбинации находится в сильной зависимости как от рекомбинационной активности самого белка RecA, так и от энзиматических систем клетки, участвующих в регуляции активности филамента RecA. Рекомбинационная активность белка строго саморегулируется оптимальным составом его аминокислотных остатков. Аминокислотные замены, приводя к изменениям в динамике филаментации, сказываются на уровне ЧРО [54]. Например, отрицательно заряженная аминокислотная последовательность С-концевого “хвоста” участвует в регуляции филаментации RecA на оцДНК. Мутантные белки с небольшими делециями аминокислот на С-конце обладают повышенной способностью вытеснять как хромосомный, так и F-плазмидный белки SSB с оцДНК. Синтез белка RecAΔC17 в бактериальной клетке приводит к увеличению ЧРО в четыре раза. Значительно больше увеличивается ЧРО при синтезе в клетках *E. coli* белка RecA из *Pseudomonas aeruginosa* [23]. В отличие от белка RecA<sub>Ec</sub>, этот белок (RecA<sub>Pa</sub>) образует настолько стабильный филамент на оцДНК, что способен с одинаковой эффективностью инициировать рекомбинационный процесс как с 3'-конца, так и с 5'-конца филамента (рис. 3*в*, *г*). Белок RecA<sub>Ec</sub> проявляет аналогичную активность только в присутствии белкового комплекса RecOR, который стабилизирует разборку филамента с 5'-конца оцДНК. В этом случае белок SSB, который стремится занять освободившиеся после мономеров RecA 5'-концевые сайты ДНК, утрачивает такую возможность. Таким образом, филамент RecA<sub>Pa</sub> исходно обладает теми динамическими характеристиками, которые появляются у филамента RecA<sub>Ec</sub> только в присутствии белков RecO и RecR (рис. 2*б*). Более того, дополнительная экспрессия белка RecA<sub>Pa</sub> в клетках *E. coli*, несущих мутации в генах *recO*,

*recR* или *recF*, может компенсировать RecFOR-зависимое снижение рекомбиногенности.

В целом, за счет изменения динамики филаментации RecA, рекомбинационный потенциал клетки может увеличиваться вплоть до десяти раз [54]. Интересно, что изменение экспрессии регуляторных белков, таких как DinI, RecX, RecO, RecR или RecF, каждый из которых вносит собственный вклад в динамику филаментации RecA, тоже приводит к увеличению (либо снижению) рекомбиногенности в 3–8 раз (таблица). Белки RecO, RecR и RecF положительно влияют на рекомбиногенность, что хорошо согласуется с их свойствами *in vitro*. Белок RecX также проявляет ингибирующие свойства, хотя и не столь сильные, как ожидалось.

Наиболее интересна функция белка DinI. Несмотря на то, что он эффективно стабилизирует филамент *in vitro*, его роль как блокатора ДНК-трансферазной активности RecA оказалась ключевой. При гиперэкспрессии DinI рекомбиногенность подавляется почти в восемь раз. Максимальное же увеличение (или изменение) рекомбиногенности относительно всех исследованных условий достигает 52 раз. Но этот эффект, который получен при экспрессии мутантного белка RecAD112R, как и в случае с белком DinI, стал результатом не столько изменения характеристик филаментации RecA на оцДНК, сколько такого свойства, как поиск гомологичной нити дцДНК и образование с ней синаптного комплекса. Действительно, скорость образования объединенных молекул в реакции обмена нитей *in vitro* (рис. 3*а*) в присутствии RecAD112R значительно выше, чем в присутствии любого другого известного белка RecA. Однако такой уровень гиперрекомбинации, вызываемой белком RecAD112R, оказывается уже аномальным для клетки. Даже в



отсутствие SOS-ответа гиперрекомбинация вызывает множество деструктивных последствий: замедление роста, повышение мутагенеза, изменение подвижности клеток, снижение УФ-выживаемости (И.В. Бахланова и А.В. Дудкина, личное сообщение). Чрезмерная активность RecA становится избыточной и входит в конфликт с другими важнейшими клеточными функциями.

Известно, что мутантный RecA может стать причиной нарушения хромосомной сегрегации при делении клетки [55]. Популяция бактериальных клеток, экспрессирующих RecAD112R, постепенно избавляется от гиперрекомбинации в ходе негативной селекции, и к 70-му поколению ДЧРО снижается от значения 52 до значений 1–14 в разных клеточных линиях. Таким образом, можно утверждать, что, если к умеренной (восьмикратной) гиперрекомбинации клетка еще устойчива, то неумеренная (50-кратная) вынуждает клетку включать механизмы, направленные против дестабилизации ее генома. В случаях супрессии гиперрекомбинационной активности в клетке наблюдается уменьшение количества мутантного белка RecA D112R. Поскольку ген *recAD112R* вносят в клетку в составе плазмиды, изменения выражаются либо в модификации самой плазмиды за счет делеции промоторной области гена *recAD112R*, либо в инактивации продукта гена *pcnB*, ответственного за копияемость плазмиды в клетке (И.В. Бахланова и А.В. Дудкина, личное сообщение). Вполне можно ожидать, что гиперрекомбиногенность, сопровождаемая конститутивным SOS-ответом, будет еще более деструктивна для бактериального генома, хотя подробных исследований на эту тему не проводилось.

Данные о взаимосвязи рекомбиногенности и способности индуцировать SOS-ответ остаются противоречивы. Ранее предполагали, что любой гиперактивный белок RecA, способный быстро вытеснить белок SSB на участках оцДНК в репликативной вилке, автоматически вызывает конститутивный SOS-ответ [56, 57]. Но как оказалось, такие активные белки, как RecA803 (V37M), RecAD112R, RecAPa, RecADC17, либо совсем не вызывают SOS-ответ, либо уровень SOS-ответа ниже ожидаемого значения (таблица).

Современное понимание механизма конститутивного SOS-ответа основано на работах группы Сандлера (Sandler) [58–60]. Принципиальное утверждение исследователей состоит в том, что разные рекомбинационно-активные мутанты вовлечены во взаимодействие с разными ДНК субстратами. Сандлером и соавт. [58–60] подробно исследованы мутантные белки, поддерживающие стабильно высокий конститутивный SOS-ответ — это RecAE38K и RecAF217Y. Эффективности SOS-ответа измеряли с учетом разного генетического фона. Анализируя влияние на SOS-ответ коэкс-

прессируемых с *recA* генов, авторы [58–60] пришли к выводу, что RecAF217Y способен филаментироваться *in vivo* не только на оцДНК, но и на дцДНК. Эта особенность не характерна для большинства других мутантных белков. Показано, что RecAF217Y-зависимый конститутивный SOS-ответ связан с синтезом белков комплекса RecBCD, который необходим для “загрузки” филамента на молекулу ДНК с протяженным двунитевым участком. Действительно, во время движения репликативной вилки в обратном направлении может возникнуть новая “гетеродуплексная” дцДНК с выступающим одонитевым участком, покрытым филаментом RecA. Процессинг такой структуры ДНК, обладающей явным сходством со структурой Холлидея, может приводить к тому, что филамент RecA окажется встроен в зону дцДНК. Гипотеза подтверждается тем, что конститутивный SOS-ответ в большой степени зависит от экспрессии белков комплекса RuvAB, играющего роль в миграции структуры Холлидея. Хотя саморасщепление белка LexA, репрессора SOS-функций, эффективнее катализируется филаментом RecA, сформированном на оцДНК, филамент на дцДНК все же сохраняет достаточную каталитическую активность (М. Кокс, личное сообщение). Для нас представляется важным, что в описанной модели экспрессия белка RecX ингибирует конститутивный SOS-ответ. В этом случае биохимические свойства белка RecX хорошо согласуются с его возможной ролью *in vivo*. Можно предположить, что основная роль RecX — это ограничение непродуктивных контактов филамента с дцДНК. Вместе с тем, эта логически ясная схема не имеет прямых доказательств, которые могли бы быть получены только *in vitro*.

В завершение главы справедливо отметить, что конъюгационная рекомбинация и измерение уровня SOS-ответа — не единственные подходы в исследовании рекомбиногенности *in vivo*. Другой метод для выявления факторов, вызывающих гомологическую гиперрекомбинацию в *E. coli*, предложен Конрадом (Konrad) [61]. Для отбора рекомбинантов им сконструирован специальный штамм с хромосомными дубликациями генов *lacY* и *lacZ*. Каждый из дублицированных *lac*-регионов несет собственные делеции, не перекрывающиеся друг с другом, которые приводят к (*lac*–)-фенотипу. Рекомбинируя между собой, дубликации дают интактный *lac*-ген, который приводит к (*lac*+)-фенотипу, что можно легко регистрировать по изменению окраски колоний. Этот метод позволяет проанализировать большое число штаммов за небольшой период времени, но по сравнению с методом, основанным на конъюгации, не позволяет количественно сравнить уровень активности исследуемых белков. Более того, метод Конрада [61] требует применения мутагена для активации SOS-ответа и повре-

ждений ДНК, а это, в свою очередь, может скрыть истинный гиперрекомбиногенный фенотип.

### РОЛЬ ГИПЕРАКТИВНЫХ РЕКОМБИНАЗ В РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММА *E. coli* К УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМУ И $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЮ

Пожалуй, одним из самых интригующих аспектов рекомбинационной тематики всегда было стремление создать штамм *E. coli*, содержащий гиперактивную рекомбиназу, которая могла бы придать бактерии повышенную резистентность к УФ- либо  $\gamma$ -облучению. Забегая вперед, можно сказать, что, вопреки ожиданиям, ни один из известных мутантных или природных гиперактивных RecA не приводит к существенному увеличению резистентности штамма *E. coli* дикого типа, хотя имеются примеры компенсации УФ-выживаемости штаммов, мутантных по RecBCD- или RecFOR-путям. На причинах, по которым это происходит, следует остановиться подробнее.

*Deinococcus radiodurans* является одной из самых устойчивых к действию ионизирующего излучения бактерий. Белок RecA из нее выделен и исследованы его биохимические свойства. Предпринято множество попыток экспрессировать ген RecADг в клетках *E. coli*, но повышения устойчивости к излучению добиться не удалось [62, 63]. Как показали исследования *in vitro*, молекулярный механизм реакции обмена гомологичных нитей ДНК с помощью белка RecADг имеет ряд специфических свойств. В отличие от белка RecAEс, белок RecADг имеет высокое сродство к дцДНК. Более того, в присутствии белка SSB (как варианта SSBес, так и “родного” DdrB) белок RecADг даже лучше связывается с дцДНК, чем с оцДНК [64, 65]. Таким образом, реакция обмена нитей инициируется филаментом, образованным на дцДНК, т.е. реакция идет как бы в обратном направлении относительно классической модели, описанной для RecAEс (рис. 3а). Схема рекомбинационного процесса получила название “обратный перенос нити” (рис. 3б). Из этого факта следует, что механизм, благодаря которому RecADг может осуществлять рекомбинационный процесс, претерпел такие значительные изменения, которые несовместимы с работой любой из рекомбинационных энзиматических систем *E. coli*.

Другой подход в поиске “идеальной” рекомбиназы — отбор в ходе направленной эволюции. Недавно предприняты масштабные усилия по выявлению мутаций в гене *recA*, которые обеспечивали бы экстремально высокую устойчивость штамма к ионизирующей радиации. [66]. Следует отметить, что последовательное увеличение резистентности облучаемых штаммов, полученных в результате селекции, сопровождается комплексной перестройкой одновременно множества генов, механизмов и

других компонентов системы рекомбинационной репарации. Причем эти перестройки и изменения могут проходить по разным эволюционным путям в разных бактериальных популяциях. Но в белке RecA обнаружено всего две наиболее часто встречаемых замены — D276A и A289S. Они расположены на поверхности белковой молекулы вблизи зоны большой бороздки. Последующие исследования показали, что при перемещении мутантных генов обратно в исходный штамм они действительно придают ему некоторую устойчивость к радиации, но ее уровень оказался не сопоставим с теми уровнями, которые наблюдаются в случае “эволюционировавших” штаммов. Более того, опыты на очищенных белках *in vitro* не обнаруживают никаких биохимических отличий ни в реакции обмена нитей ДНК, ни в АТРазной активности по сравнению с белком дикого типа. Вместе с тем данная работа, по всей видимости, еще ждет своего продолжения.

Другой, возможно более плодотворный, аспект, достойный упоминания в данной главе, — это частичная или даже полная компенсация УФ-выживаемости мутантных штаммов гиперактивными мутантными белками RecA, которые упоминались уже в предыдущих главах. На фоне мутаций в генах *recF*, *recO*, *recR* чувствительности штамма *E. coli* к УФ-облучению резко возрастает. Экспрессия мутантных белков RecAE38K или RecA803 приводит к значительной супрессии УФ-чувствительности на *recFOR*-пути [67]. Показано, что мутантный белок RecAE38K также способен к супрессии УФ-чувствительности и на дефектном *recBCD*-пути [68]. В каждом из упомянутых случаев основное сходство гиперактивных рекомбиназ — их повышенное сродство к оцДНК, т.е. возможность действовать в обход механизма классической “загрузки” с помощью энзиматической системы клетки.

Подытоживая этот раздел, отметим, что, хотя в некоторых случаях возможна супрессия дефектов вспомогательной системы, ни RecAE38K, ни какой-либо другой из гиперактивных мутантных белков RecA не придает гиперрезистентности штамму *E. coli* дикого типа к различным видам облучений. Одно из объяснений может заключаться в том, что рекомбинационный потенциал белка RecA дикого типа избыточен для выполнения его прямой функции в ходе рекомбинационной репарации. Тогда основная роль RecA сводится к запуску механизма SOS-ответа и экспрессии всех белков — участников репарации ДНК, в том числе, склонной к ошибкам (“*error-prone*”) полимеразы V. Второе объяснение не противоречит первому, а, возможно, даже дополняет его: существуют механизмы ограничения гиперрекомбиногенной активности в системе рекомбинационной репарации. Возможным кандидатом на роль такого ограничителя является белок RecX. Кроме того, в

литературе появились данные о том, что избыточные концентрации белка DinI ингибируют филаментацию RecA [69].

Авторы благодарны Вербенко В.Н. за помощь в обсуждении материала.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-01229 и 12-02-12053-офи\_м).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Roca A.I., Cox M.M. 1990. The RecA protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**, 415–456.
- 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.
- Ланцов В.А. 2007. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК. *Молекуляр. биология*. **41**, 467–477.
- Cox M.M. 2007a. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 127–138.
- Kowalczykowski S.C. 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 156–165.
- 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.
- Chen Z., Yang H., Pavletich N.P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature*. **453**, 489–454.
- Heuser J., Griffith J. 1989. Visualization of RecA protein and its complexes with DNA by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **210**, 473–484.
- Egelman E.H., Stasiak A. 1988. Structure of helical RecA-DNA complexes. II. Local conformational changes visualized in bundles of RecA-ATP gamma S filaments. *J. Mol. Biol.* **200**, 329–349.
- 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.
- Lindsley J.E., Cox M.M. 1990. Assembly and disassembly of RecA protein filaments occurs at opposite filament ends: relationship to DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* **265**, 9043–9054.
- 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.
- Cox J.M., Tsodikov O.V., Cox M.M. 2005. Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within of RecA filament. *PLoS Biol.* **3**, 231–243.
- 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.
- 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.
- Britt R.L., Haruta N., Lusetti S.L., Chitteni-Pattu S., Inman R.B., Cox M.M. 2010. Disassembly of *Escherichia coli* RecA E38K/ΔC17 nucleoprotein filaments is required to complete DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* **285**, 3211–3226.
- 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.
- 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.
- van Loenhout M.T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. 2009. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA. *Nucl. Acids Res.* **37**, 4089–4099.
- 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 real-time single-molecule approach. *Biochemistry*. **50**, 8270–8280.
- van der Heijden T., Dekker C. 2008. Monte Carlo simulations of protein assembly, disassembly, and linear motion on DNA. *Biophys. J.* **95**, 4560–4569.
- 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.
- Gruenig M.C., Stohl E.A., Chitteni-Pattu S., Seifert S., Cox M.M. 2010. Less is more: *Neisseria gonorrhoeae* RecX protein stimulates recombination by inhibiting RecA. *J. Biol. Chem.* **285**, 37188–37197.
- Clark A.J., Sandler S.J. 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 125–142.
- Arnold D.A., Kowalczykowski S.C. 2000. Facilitated loading of RecA protein is essential to recombination by RecBCD enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 12261–12265.
- Churchill J.J., Kowalczykowski S.C. 2000. Identification of the RecA protein-loading domain of RecBCD enzyme. *J. Mol. Biol.* **297**, 537–542.
- Cromie G.A., Leach D.R. 2000. Control of crossing over. *Mol. Cell.* **6**, 815–826.
- 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.
- 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.
- 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.

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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 Dev.* **23**, 1234–1245.
39. Lusetti S.L., Voloshin O.N., Inman R.B., Camerini-Otero R.D., Cox M.M. 2004b. The DinI protein stabilizes RecA protein filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 30037–30046.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. Дудкина А.В., Швецов А.В., Бахланова И.В., Байтин Д.М. 2011. Изменение динамики филаментации белка RecA, вызванное аминокислотной заменой D112R либо замещением АТР на dАТР, приводит к устойчивости филамента к действию белка RecX. *Молекуляр. биология.* **45**, 546–553.
46. Baitin D.M., Gruenig M.C., Cox M.M. 2008. SSB antagonizes RecX-RecA interaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 14198–14204.
47. 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.
48. Lloyd R.G. 1978. Hyper-recombination in *Escherichia coli* K-12 mutants constitutive for protein X synthesis. *J. Bacteriol.* **134**, 929–935.
49. Lloyd R.G., Buckman C. 1995. Conjugational recombination in *Escherichia coli*: genetic analysis of recombinant formation in Hfr\_ F\_ crosses. *Genetics.* **139**, 1123–1148.
50. 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.
51. Clark A.J., Sandler S.J. 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 125–142.
52. Amundsen S.K., Smith G.R. 2003. Interchangeable parts of the *Escherichia coli* recombination machinery. *Cell.* **112**, 741–744.
53. Smith G.R. 1991. Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms. *Cell.* **64**, 19–27.
54. 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.
55. Campbell M.J., Davis R.W. 1999. Toxic mutations in the *recA* gene of *E. coli* prevent proper chromosome segregation. *J. Mol. Biol.* **286**, 417–435.
56. Lavery P.E., Kowalczykowski S.C. 1992. Biochemical basis of the constitutive repressor cleavage activity of *recA730* protein. A comparison to *recA441* and *recA803* proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 20648–20658.
57. 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.
58. Long J.E., Renzette N.R., Centore R.C., Sandler S.J. 2008. Differential requirements of two *recA* mutants for constitutive SOS expression in *Escherichia coli* K-12. *PLoS ONE.* **3**, e4100.
59. Long J.E., Renzette N.R., Sandler S.J. 2009. Suppression of constitutive SOS expression by *recA4162* (I298V) and *recA4164* (L126V) requires UvrD and RecX in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **73**, 226–239.
60. Long J.E., Massoni S.C., Sandler S.J. 2010. RecA4142 causes SOS constitutive expression by loading onto re-

- versed replication forks in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **192**, 2575–2582.
61. Konrad E.B. 1977. Method for the isolation of *Escherichia coli* mutants with enhanced recombination between chromosomal duplications. *J. Bacteriol.* **130**, 167–172.
62. Carroll J.D., Minton K.W. 1996. Expression of RecA in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **178**, 130–135.
63. Вербенко В.Н., Кузнецова Л.Н., Крупьян Е.Р., Шалгуев В.И. 2009. Экспрессия гена *recA* *Deinococcus radiodurans* в клетках *Escherichia coli*. *Генетика*. **45**, 1353–1360.
64. Kim J.I., Cox M.M. 2002. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 7917–7921.
65. Norais C.A., Chitteni-Pattu S., Wood E.A., Inman R.B., Cox M.M. 2009. DdrB protein, an alternative *Deinococcus radiodurans* SSB induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 21402–21411.
66. Harris D.R., Pollock S.V., Wood E.A., et al. 2009. Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 5240–5252.
67. Wang T.C., Chang H.Y., Hung J.L. 1993. Cosuppression of *recF*, *recR* and *recO* mutations by mutant *recA* alleles in *Escherichia coli* cells. *Mutat. Res.* **294**, 157–166.
68. Handa N., Kowalczykowski S.C. 2007. A RecA mutant, RecA<sup>730</sup>, suppresses the recombination deficiency of the RecBC<sup>1004D</sup>– $\chi^*$  interaction *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **365**, 1314–1325.
69. Galkin V.E., Britt R.L., Bane L.B., Yu X., Cox M.M., Egelman E.H. 2011. Two modes of binding of DinI to RecA filament provide a new insight into the regulation of SOS response by DinI protein. *J. Mol. Biol.* **408**, 815–824.