

© Д. Б. Червякова,
В. А. Ланцов

Петербургский институт ядерной
физики им. Б. П. Константинова
РАН, г. Гатчина

✿ Белок RecAX53 оказался наиболее рекомбинационно активным среди химерных белков RecA, состоящих из фрагментов белков RecA из *Esherichia coli* (RecAEc) и *Pseudomonas aeruginosa* (RecAPa). Мы обнаружили, что белок RecAX53 быстрее белков RecAEc и RecAPa гидролизует АТФ и диссоциирует с одонитевой ДНК (онДНК), а также быстрее контрольных белков вытесняет белок SSB с онДНК и ассоциирует с двунитевой ДНК (днДНК). Полученные результаты свидетельствуют о том, что гиперрекомбиногенность белка RecAX53 определяется его высокой динамичностью — быстрой ассоциацией и диссоциацией с онДНК. Активное связывание белка RecAX53 с днДНК объясняет SOS-независимый механизм гиперрекомбинации, свойственный этому белку.

✿ **Ключевые слова:** белок RecA; гиперрекомбиногенность; гидролиз АТФ, катализируемый белком RecA; SOS-независимый механизм рекомбинации.

ГИПЕРРЕКОМБИНОГЕННОСТЬ ХИМЕРНОГО БЕЛКА RECAX53 (*ESHERICHIA COLI/PSEUDOMONAS AERUGINOSA*) ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ЕГО ПОВЫШЕННОЙ ДИНАМИЧНОСТЬЮ

ВВЕДЕНИЕ

Гомологическая рекомбинация, представляющая собой один из фундаментальных биологических механизмов, необходима для репарации повреждений ДНК, репликации генома и правильной сегрегации хромосом в мейозе (Ланцов, 2007). Гомологическая рекомбинация является основным механизмом, за счет которого поддерживается генетическая изменчивость популяций. Центральным белком гомологической рекомбинации у бактерий (и наиболее полно изученным) является белок RecA.

Образуя активный филамент на ДНК, белок RecA выполняет несколько функций в бактериальной клетке (Ланцов, 2007; Galletto et al., 2007; Roca et al., 1997). Он осуществляет основной процесс гомологической рекомбинации — трансферазную реакцию, участвует в репарации ДНК, в SOS-мутационезе, а также обладает копротеазной активностью, катализируя автокаталитическое расщепление белка LexA и индуцируя тем самым SOS-ответ (Сох, 2003). Реакцию гомологической рекомбинации, проводимую белком RecA, принято подразделять на три этапа: 1) формирование пресинаптического комплекса — активного филемента RecA на онДНК в присутствии АТФ и ионов магния; 2) образование синаптического комплекса белком RecA при нахождении участка гомологии в двунитевой ДНК (днДНК) и инициации трансферазной реакции (реакции переноса нити); 3) постсинаптическая фаза «миграции ветви ДНК», приводящая к образованию продуктов реакции — гетеродуплексной днДНК и вытесненной онДНК (Roca et al., 1997).

Реакция переноса нити и автопротеолиз репрессора LexA — два взаимоисключающих события, поскольку сайты связывания активного RecA филемента с днДНК (необходимого для инициации трансферазной реакции) и с белком LexA перекрываются (Rehrauer et al., 1996).

Одним из основных свойств белка RecA, которое широко используется для постановки экспериментов, направленных на выявление особенностей различных белков RecA, является его способность гидролизовать АТФ в присутствии он- и днДНК (Roca et al., 1997). Измерение скорости гидролиза АТФ белками RecA в различных условиях позволяет воссоздать достаточно полную картину функциональной и биохимической активности данных белков. С помощью этого метода можно установить, например, такие свойства RecA, как: параметр k_{cat} , характеризующий максимальную скорость гидролиза АТФ, приходящуюся на единицу фермента; стехиометрию связывания белков RecA с ДНК — число нуклеотидов ДНК, связываемых мономером RecA; стабильность филемента RecA; аффинность белков RecA к АТФ и ДНК; скорость сборки и разборки филемента RecA на ДНК; характер вытеснения белка SSB с онДНК.

События RecA-зависимых рекомбинационных обменов, происходящих во время конъюгации у бактерий, случаются относительно редко: частота рекомбинационных обменов на единицу длины ДНК (ЧРО) (Бреслер с соавт., 1978), измеренная для RecAEc, составляет 5 обменов на геном (Lanzov et al., 2003). Белок RecAEc принято использовать в качестве контроля при изучении свойств различных RecA белков. Два механизма могут приводить к повышению параметра ЧРО: SOS-зависимый и SOS-независимый (Lanzov, 2002). В первом случае ЧРО преимущественно увеличивается за счет накоп-

Поступила в редакцию 02.10.2008
Принята к публикации 11.12.2008

ления белка RecA в клетке при RecA-опосредованной депрессии SOS-оперона, а во втором случае к высоким значениям ЧРО приводит повышенная активность самого белка RecA, вызванная его структурными особенностями. Известные мутантные формы RecAЕс — белки RecA441 и RecA730 — повышают ЧРО по SOS-зависимому пути (Lavery et al., 1990; Lavery et al., 1992), а белок RecAPa и многие химерные белки RecAX, состоящие из комбинаций фрагментов белков RecAЕс и RecAPa, вызывают увеличение ЧРО по SOS-независимому механизму (Namsaraev et al., 1998; Ogawa et al., 1992; Bakhlanova et al., 2001). Среди последних — химерный белок RecAX21, для которого было показано, что аминокислотная замена L29M (по сравнению с RecAЕс) приводит к повышению ЧРО в 3 раза по сравнению с белком RecAЕс (Chervyakova et al., 2001). Самым рекомбинационно активным среди исследованных химерных белков оказался белок RecAX53: по значениям ЧРО белки RecAX53, RecAPa и RecAЕс соотносятся следующим образом: 9 : 6 : 1 (Bakhlanova et al., 2001; Bianco et al., 1998).

RecAX53 представляет собой белок RecAЕс, у которого участок центрального домена от 170 до 250 аминокислоты заменен соответствующим фрагментом белка RecAPa (Ogawa et al., 1992). По сравнению с белком RecAЕс, химерный белок RecAX53 содержит 12 аминокислотных замен: M170L, M175L, L178I, A179T, L182I, Q184N, S185A, T187C, L189V, I228T, E236D, N237E. Сравнительный генетический анализ RecAX53 и контрольных белков RecAЕс и RecAPa показал, что RecAX53 функционирует по иному механизму, чем белки RecAЕс и RecAPa (Baitin et al., 2008). RecAX53 быстрее контрольных белков осуществляет трансферазную реакцию на уровне трехнитевого обмена, приводя к появлению гетеродуплексов, характерных для рекомбинации конверсионного типа. Однако, в отличие от белков RecAЕс и RecAPa, белок RecAX53 не способен проводить перенос нити на четырехнитевом уровне с образованием конечных продуктов реакции кроссинговерного типа, а формирует только интермедиаты. Отмеченная динамическая активность RecAX53 предположительно влияет на повышенную частоту инициации реакций переноса нити этим белком (Baitin et al., 2008).

В настоящей работе мы приводим доказательства повышенной динамичности белка RecAX53, выявленные с помощью сравнительного анализа биохимической активности белков RecAЕс и RecAPa. Кроме этого, мы обнаружили, что RecAX53 образует более гибкий филамент на онДНК по сравнению с контрольными белками, что является отражением структурных особенностей этого белка. Агрессивное связывание RecAX53 с днДНК является доказательством в пользу SOS-независимого механизма гиперрекомбинации, свойственного белку RecAX53 (Bakhlanova et al., 2001).

МЕТОДИКА

Белки, реактивы и ДНК. Белки RecAЕс, RecAPa и RecAX53 были выделены по известной методике (Shap et al., 1996). Концентрации белков определяли по методу Брэдфорда (Read et al., 1981). Концентрацию приобретенного в фирме «Sigma» (USA) белка SSB определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 30,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Кольцевую M13mp18 онДНК и M13mp18 днДНК приобрели в компании «New England Biolabs», Великобритания. Линейную днДНК получили путем рестрикции суперскрученной M13mp18 днДНК эндонуклеазой EcoRI с последующей депротеинизацией. Молярные концентрации ДНК, выраженные в нуклеотидах, определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции для онДНК $\epsilon_{260} = 6,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а для днДНК $\epsilon_{260} = 8,780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Линейную онДНК — poly(dT)₃₆₀₀ — приобрели в «Sigma», USA. Дезоксирибозилтимидиновые олигонуклеотиды (oligo(dT)) длиной 20, 25, 30 и 40 нуклеотидов были любезно предоставлены Быстровым Н. С., Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия. Нуклеотидные молярные концентрации poly(dT)₃₆₀₀ и oligo(dT) определяли спектрофотометрически с помощью коэффициента экстинкции $\epsilon_{260} = 8,540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. АТФ, трис, MgCl₂, NADH, фосфоенолпируват, дитиотрейтол (ДТТ), L-лактатдегидрогеназу, пируваткиназу также приобрели в «Sigma», USA. Другие реактивы, использованные в этой работе, имели квалификацию «ЧДА» и были приобретены в известных компаниях.

Гидролиз АТФ. Измерение гидролиза АТФ проводили с помощью спектрофотометрического метода, связывающего появление АДФ с окислением NADH (Kowalczykowski et al., 1987). Коэффициент экстинкции NADH $\epsilon_{380} = 1,21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Реакции проводили при 37 °C в буфере ТМД, содержащем 25 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂ и 0,1 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ и АТФ-регенерирующую систему, состоящую из 2 мМ фосфоенолпирувата, 30 единиц/мл пируват киназы, 0,56 мМ NADH (или 2,7 мМ в реакциях с днДНК), 30 единиц/мл L-лактатдегидрогеназы. ДНК-независимый гидролиз АТФ в высокосолевых условиях проводили с 1 мкМ RecA в буфере ТАМД, содержащем 25 мМ Трис-ацетата (рН 7,5), 17,5 мМ ацетата магния, 1 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ, 1,8 М ацетата натрия и АТФ-регенерирующую систему, как указано выше.

Для измерения величины S_{05} к реакционным смесям, содержащим буфер ТМД (за исключением АТФ), 10 мкМ poly(dT)₃₆₀₀ и 0,5 мкМ RecAX53, добавляли АТФ в диапазоне концентраций от 0 до 1000 мкМ и регистрировали максимальные скорости гидролиза. Затем строили график зависимости АТФазной активности данного белка RecA от концентрации АТФ и определяли S_{05} — ту концентрацию АТФ, которая соответствует

половине максимальной скорости гидролиза АТФ данным белком RecA.

Коэффициент Хилла n_H , представляющий собой тангенс угла наклона прямой на графике Хилла — зависимости $\log(V/(V_{\max} - V))$ от $\log[ATP]$, рассчитывали по данным, полученным для определения $S_{0.5}$ (Mikawa et al., 1998).

Для определения значения STMP реакции проводили в буфере ТМД с 10 мкМ poly(dT)₃₆₀₀ и 1 мкМ RecA. Каждый раз, когда скорость гидролиза АТФ становилась постоянной, очередные 50 мМ NaCl титровали в реакцию.

Для определения параметра τ реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 3 мкМ poly(dT)₃₆₀₀ и 0,75 мкМ RecA. Когда скорость гидролиза АТФ комплексов RecA::poly(dT)₃₆₀₀::ATP достигала своего максимума, 0,6 мкМ белка SSB добавляли к реакции и регистрировали падение скорости гидролиза АТФ. Время полураспада комплексов RecA::poly(dT)₃₆₀₀::ATP рассчитывали из аппроксимации методом наименьших квадратов полученных данных к экспоненциальному распаду.

Точность результатов. Все приведенные результаты являются усредненными, по меньшей мере из трех независимых экспериментов. Среднеквадратичное отклонение от среднего арифметического рассчитывали с учетом коэффициентов Стьюдента для заданной надежности $P = 0,9$. Относительная погрешность результатов не превышала 9 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. RecAX53 быстрее контрольных белков гидролизует АТФ

Одной из основных характеристик белков RecA является их способность образовывать активные филаменты на онДНК в присутствии АТФ. Поскольку рекомбинационно активный RecAPa быстрее образует пресинаптические комплексы на онДНК, чем белок RecAEc (Namsaraev et al., 1998), и ЧРО RecAX53 превышает ЧРО RecAPa 1,5 раза, мы ожидали, что RecAX53 будет еще активнее связываться с онДНК, чем RecAPa.

Для достижения максимальной для данного фермента скорости гидролиза АТФ реакцию ДНК-зависимого гидролиза АТФ проводили в условиях избытка линейной онДНК (10 мкМ) по сравнению с RecA белками. Концентрацию ферментов выбрали такой, чтобы значение k_{cat} (максимальная скорость гидролиза АТФ, приходящаяся на единицу фермента) не зависело от концентрации белка, а именно 1 мкМ (Mikawa et al., 1998). Значение параметра k_{cat} , полученное для RecAX53, превышает соответствующие значения RecAEc и RecAPa почти в 1,5 раза (табл. 1). Реакцию гидролиза АТФ филаментом RecA продублировали в высоких солевых условиях, когда RecA мультимеризуется и образует такой же активный филамент без ДНК в присутствии АТФ, как и на онДНК (Pugh et al., 1988) (табл. 1).

Таблица 1

Структурные и кинетические параметры белков RecA

Параметры	RecAX53	RecAEc	RecAPa
k_{cat} *(мин ⁻¹) с poly(dT)	45,2 ± 2,2	29,2 ± 0,2	31,5 ± 2,9
k_{cat} *(мин ⁻¹) в ацетате натрия	43,0 ± 2,1	30,0 ± 1,2	31,1 ± 2,0
стехиометрия* (в нуклеотидах)	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3
$S_{0.5}$ *(мкМ)	79,0 ± 5,8	76,0 ± 9,5	71,5 ± 6,9
n_H	3,8 ± 0,6	13,0 ± 1,2	12,9 ± 1,4
STMP*(мМ NaCl)	300 ± 30	375 ± 30	600 ± 40
τ (мин)	3 ± 0,4	4,5 ± 0,5	> 30

* данные опубликованы в (Baitin et al., 2008).

2. RecAX53 характеризуется пониженным сродством к онДНК, меньшей стабильностью пресинаптических комплексов и сниженной кооперативностью

Свидетельствует ли высокое значение k_{cat} о каких-либо ярких функциональных отличиях RecAX53 от белков-«предшественников» или просто характеризует его повышенную гидролитическую активность? Мы проверили стехиометрию связывания RecAX53 с онДНК, т. е. в зависимости от того, связана одна или две молекулы онДНК филаментом RecA, значение k_{cat} может различаться вдвое (Zlotnic et al., 1993).

Стехиометрию связывания RecA с онДНК определяли из зависимостей максимальных скоростей гидролиза АТФ (мкМ мин⁻¹) от концентрации белков при неизменной концентрации poly(dT)₃₆₀₀ (3 мкМ) (Baitin et al., 2003). Оказалось, что стехиометрия связывания RecAX53 с онДНК (табл. 1) практически не отличается от соответствующих значений RecAEc и RecAPa (Baitin et al., 2003).

Мы проверили, есть ли связь между необычно высокой скоростью гидролиза АТФ белком RecAX53 и его сродством к АТФ. Известно, что в присутствии АТФ RecA связывает ДНК в так называемой расширенной конформации, характеризующейся высокоаффинным к ДНК состоянием и большим размером витка спирали филамента. Наличие молекулы АДФ, связанной RecA, характеризуется низкоаффинным к ДНК состоянием белка, так называемой компактной конформацией, в которой невозможны поиск гомологии или протеолиз белка LexA. Гидролиз АТФ связан с переходом в субъединице RecA от расширенной к компактной конформации (Roca et al., 1997).

Поскольку RecA относится к аллостерическим ферментам, его активность не может быть описана классическими уравнениями Михаэлиса–Мэнтен для ферментативных систем. Сродство к АТФ RecA на онДНК

принято описывать величиной $S_{0.5}$, соответствующей той концентрации АТФ, при которой скорость гидролиза АТФ равна половине ее максимальной скорости (Lee et al., 1990). Еще одним параметром, демонстрирующим активность таких ферментов, является коэффициент Хилла n_H , который характеризует меру кооперативности сайта связывания к субстрату и показывает число смежных субъединиц белка, в которых происходят структурные изменения, индуцированные связыванием молекулы субстрата одной субъединицей белка (Mikawa et al., 1998).

Из таблицы 1 видно, что значение $S_{0.5}$, полученное для RecAX53, не отличается от соответствующих величин у белков RecAЕс и RecAPa (Baitin et al., 2003), а коэффициент Хилла, характеризующий RecAX53, почти в 3,5 раза ниже соответствующих значений, полученных для RecAЕс и RecAPa. Сниженная кооперативность RecAX53 означает, что для создания активного филамента этому белку необходимо связать больше мономеров на ДНК, чем RecAЕс и RecAPa, указывая тем самым на сниженную стабильность филаментов RecAX53 на онДНК.

Аффинность белка к онДНК наиболее точно характеризует параметр STMP (Salt Titration Mid Point) — та концентрация NaCl, которая необходима для диссоциации половины пресинаптических комплексов, образованных RecA, чему соответствует падение первоначальной скорости гидролиза АТФ в два раза (Menetski et al., 1988). Как видно из таблицы 1, комплекс RecAX53::АТФ::poly(dT) немного менее устойчив к действию ионов хлора, чем комплекс с RecAЕс: значение STMP, соответствующее RecAX53 в два раза ниже, чем STMP у RecAPa, и несколько ниже соответствующей величины, полученной для RecAЕс. Это означает, что RecAX53 обладает сходным с RecAЕс родством к онДНК. Как было показано ранее (Namsaraev et al., 1998; Cheryakova et al., 2001), RecAPa имеет повышенную аффинность к онДНК.

Еще один эксперимент, позволяющий оценить прочность мономер-мономерных контактов и аффинность RecA к онДНК, а также оценить кооперативность, — это способность белков RecA формировать активные филаменты на коротких олигонуклеотидах (Bianco et al., 1998). Было показано, что мономер RecAЕс становится полностью активной АТФазой только в том случае, когда он является частью кластера мономеров, связанных последовательно вдоль остова ДНК и превышающего по длине определенный размер — 10 мономеров (Bianco et al., 1998). Максимальные скорости гидролиза АТФ для RecAЕс, RecAPa и RecAX53 измеряли, используя в качестве основы для образования филамента дезоксирибозилтимидиновые олигонуклеотиды (oligo(dT)) длиной 20, 25, 30 и 40 нуклеотидов. На рисунке 1 показана диаграмма максимальных скоростей гидролиза АТФ исследуемых белков для данных oligo(dT), отнесенных к соответствующим максимальным скоростям гидролиза этих же белков на poly(dT) длиной 3600 нуклеотидов. Как видно, на

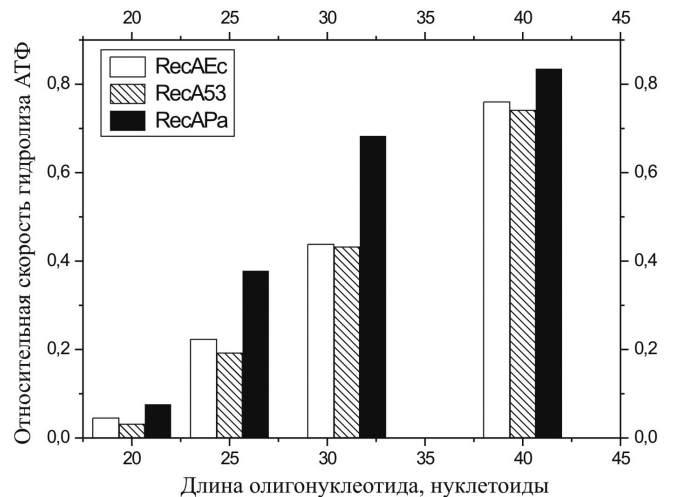


Рис. 1. Связывание белков RecAЕс, RecAPa и RecAX53 с короткими олигонуклеотидами.

Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 1 мкМ анализируемого RecA и 100 мкМ олиго(dT)_n, где n = 20, 25, 30, 40. Каждый столбец диаграммы показывает отношение средней максимальной скорости гидролиза АТФ данного белка RecA в комплексе с нуклеотидами указанной длины к максимальной скорости гидролиза АТФ с поли(dT)₃₆₀₀.

всех использованных субстратах RecAX53 значительно уступает RecAPa и ведет себя подобно RecAЕс. Таким образом, RecAX53 в меньшей степени, чем RecAPa, способен создавать активные филаменты на коротких онДНК. Этот результат подтверждает пониженную кооперативность RecAX53 и его ослабленное взаимодействие с онДНК.

3. RecAX53 быстрее контрольных белков диссоциирует с 5'-конца онДНК

RecAX53 быстрее контрольных белков ассоциирует с онДНК. Но для того чтобы инициировать большее число трансферзных реакций по сравнению с контрольными белками, гиперрекомбиногенному белку необходимо быстро покидать ДНК. Поэтому нас заинтересовало, насколько быстро он диссоциирует с онДНК.

Наиболее ярко, на наш взгляд, это свойство характеризует эксперимент, в котором белок RecA вытесняется белком SSB с poly(dT) (Lavery et al., 1990). Этот опыт основан на том факте, что белок SSB характеризуется большим родством к poly(dT), чем RecA (Kowalczykowski et al., 1987). В присутствии АТФ RecA создает активный филамент на онДНК. Добавление к уже сформированному комплексу RecA::АТФ::poly(dT) SSB приводит к вытеснению мономеров RecA со своего субстрата, т.е. к разборке филамента RecA, что можно видеть, например, по падению скорости гидролиза АТФ. Как видно из таблицы 1 (параметр τ_{50} , характеризующий время полураспада комплексов RecA::poly(dT)₃₆₀₀::АТФ), комплексы RecAX53::АТФ::poly(dT) при добавлении к ним

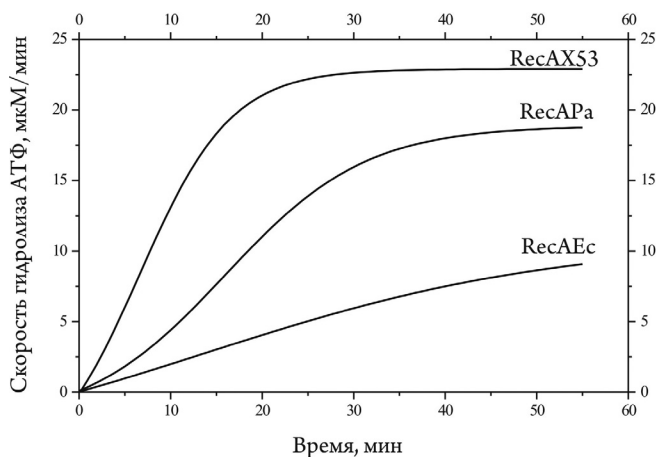


Рис. 2. Кинетика вытеснения белка SSB с онДНК белками RecAEc, RecAPa и RecAX53

Реакции проводили в буфере ТМД при 37 °С, содержащем 3 мкМ онМ13ДНК, 0,6 мкМ SSB и 2 мкМ соответствующего белка RecA. Кольцевую онДНК преинкубировали с SSB в течение 2 минут и затем инициировали реакцию гидролиза АТФ добавлением анализируемого белка RecA

белка SSB распадаются даже быстрее, чем комплексы с RecAEc, в то время как пресинаптические комплексы, образованные RecAPa, вообще не диссоциируют под влиянием SSB (Cheruyakova et al., 2001).

4. RecAX53 быстрее контрольных белков вытесняет белок SSB с онДНК

Образующиеся в бактериальной клетке одностранные участки ДНК, как правило, быстро оккупируются белком SSB. Поэтому для формирования пресинаптического комплекса белку RecA необходимо сначала вытеснить SSB с онДНК.

Мы сравнили скорость вытеснения SSB с кольцевой онДНК исследуемыми белками (рис. 2). Как видно из этого рисунка, RecAX53 быстрее контрольных белков достигает максимальной скорости гидролиза АТФ — уже примерно через 25 минут от начала регистрации, тогда как RecAPa — через 45 минут, а RecAEc — после 55 минут. Таким образом, RecAX53 вытесняет SSB даже быстрее, чем RecAPa. Более активная ассоциация RecAX53 с онДНК по сравнению с RecAEc и RecAPa (Baitin et al., 2008) позволяет объяснить лучшее вытеснение SSB белком RecAX53 высокой скоростью ассоциации последнего с онДНК.

5. RecAX53 быстрее контрольных белков ассоциирует с днДНК

Поскольку RecAX53 быстрее контрольных белков ассоциирует с онДНК, мы предположили, что RecAX53 быстрее связывается и с днДНК. Для проверки этой гипотезы мы изучили характер связывания RecAX53 с линейной днДНК. Как видно из графика зависимости

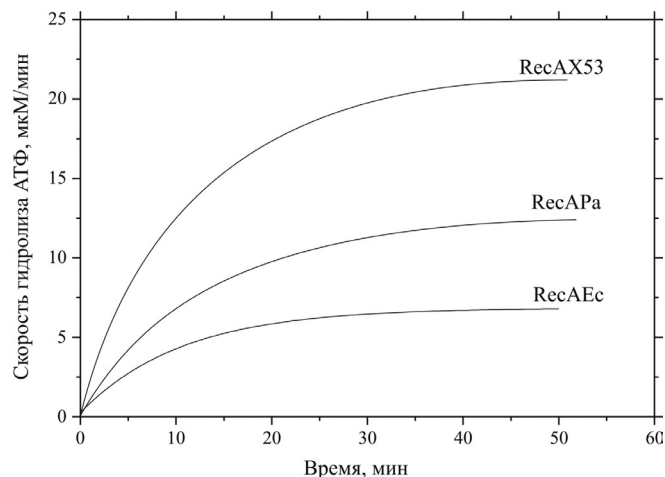


Рис. 3. Кинетика связывания белков RecA с линейной днДНК

Реакции проводили в буфере ТМД, содержащем 3 мкМ соответствующего белка RecA и 8,4 мкМ днМ13ДНК/EcoRI. На графике представлены зависимости скорости гидролиза АТФ белками RecA от времени

скорости гидролиза АТФ белками RecA при создании активных филаментов на днДНК от времени (рис. 3), RecAX53 быстрее связывается с днДНК, чем RecAPa и RecAEc. Этот результат свидетельствует о том, что филамент RecAX53 способен так же быстро собираться на днДНК, как и на онДНК. Полученные результаты для RecAEc и RecAPa находятся в соответствии с опубликованными данными (Cheruyakova et al., 2001).

ОБСУЖДЕНИЕ

Химерный RecAX53 представляет собой белок RecAEc, белок содержащий в центральном домене 12 аминокислот из RecAPa (Ogawa et al., 1992; Baitin et al., 2008). Согласно имеющимся данным, среди этих 12 аминокислотных позиций нет ни одной, задействованной в RecA-АТФ взаимодействиях, включающих связывание АТФ, γ -фосфата АТФ, гидролиз АТФ, связывание иона Mg и аллостерический конформационный переход (Kowalczykowski, 1986; Voloshin et al., 2000). RecAX53 также не содержит аминокислотных замен, участвующих в RecA-LexA взаимодействиях (Nastri et al., 1997) и в RecA-RecA взаимодействиях (Story et al., 1992). Участок RecAX53, соответствующий петле L2 (аминокислоты с 194-й по 210-ю), которая предположительно участвует в связывании с онДНК (Hortnagel et al., 1999), также не содержит аминокислотных замен. Однако область RecA со 178-й по 183-ю аминокислоты, связывающаяся с онДНК при воздействии ультрафиолетового излучения (Morimatsu et al., 1995), содержит 3 аминокислотные замены в белке RecAX53: L178I, A179T, L182I, которые могут влиять на взаимодействие RecAX53 с онДНК.

Для того чтобы понять структурно-функциональные особенности RecAX53, лежащие в основе его необычно высокой ЧРО, мы провели сравнительный анализ биохимической активности RecAX53 и контрольных белков RecAEс и RecAPa.

Первым обнаруженным ярким отличием RecAX53 от контрольных белков оказалась увеличенная почти в 1,5 раза скорость гидролиза АТФ. Мы убедились, что структурные параметры, которые потенциально могут влиять на скорость гидролиза АТФ, такие как размер сайта связывания RecA с онДНК и его сродство к АТФ, оказались у RecAX53 практически таким же, как и у RecAEс и RecAPa. Однако кооперативность по АТФ n_H , характерная для RecAX53 (табл. 1), оказалась почти в 3 раза сниженной по сравнению с контрольными белками. Это означает, что связывание молекулы АТФ одним мономером RecAX53 вызывает конформационные изменения только в 3–4 соседних субъединицах, находящихся в составе нуклеопротеинового филамента, а не в 11–12, как в случае с RecAEс и RecAPa (Mikawa et al., 1998). Иными словами, пониженная кооперативность по АТФ, свойственная RecAX53, косвенно свидетельствует об ослабленных межмономерных взаимодействиях внутри активного филамента этого белка.

Поскольку RecAX53 активнее контрольных белков связывается с онДНК, а RecAPa обладает еще и повышенной аффинностью к онДНК (Namsaraev et al., 1998), мы проверили, не обладает ли RecAX53 таким же свойством. Как показал эксперимент по устойчивости RecA филаментов к воздействию ионов NaCl (STMP, табл. 1), по стабильности филаментов на онДНК исследуемые белки можно расположить так: RecAX53 \leq RecAEс < RecAPa. Этот эксперимент свидетельствует также о несколько пониженном сродстве филамента RecAX53 к онДНК и менее прочных межмономерных контактах по сравнению с RecAEс.

Пониженная кооперативность RecAX53, его ослабленное взаимодействие с онДНК и менее прочные межмономерные контакты, в особенности по сравнению с RecAPa, наиболее ярко проявляются в эксперименте по способности RecA белков создавать активные филаменты на коротких одигонуклеотидах. По относительным скоростям гидролиза АТФ на всех исследованных олигонуклеотидах рассматриваемые белки можно расположить следующим образом: RecAX53 \leq RecAEс < RecAPa. Тот факт, что для RecAX53 требуется большее число мономеров на онДНК для образования активного филамента, чем RecAPa, скорее всего, связан с ослабленными мономер-мономерными контактами, что, в свою очередь, может обуславливать повышенную гибкость RecAX53 и объяснять его повышенную кинетическую активность.

Поскольку RecAX53 быстрее ассоциирует с онДНК и создает менее прочные филаменты, способность к диссоциации RecAX53 с онДНК мы оценили в эксперименте по

конкурентному вытеснению RecA с poly(dT) белком SSB. RecAX53 вытеснялся с этого субстрата даже быстрее, чем RecAEс, в то время как филамент RecAPa вообще не подвергся разборке (таблица 1, параметр $\tau_{1/2}$). Как известно, для диссоциации мономеров RecA необходим гидролиз АТФ (Shan et al., 1997), поэтому способность филамента RecAX53 к быстрой разборке коррелирует с присущей этому белку высокой скоростью гидролиза АТФ.

Агрессивность RecAX53 на начальном этапе переноса нити (Baitin et al., 2003) подтверждается также его способностью быстрее контрольных белков вытеснять SSB с онДНК, необходимой для формирования пресинаптического комплекса.

Ускоренная ассоциация RecAX53 с днДНК объясняет SOS-независимый механизм гиперрекомбинации этого белка: активный филамент RecAX53 более вероятно свяжется с днДНК и инициирует процесс рекомбинации, нежели послужит катализатором автопротеолиза белка LexA с последующей индукцией SOS-ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что RecAX53 опережает белки RecAEс и RecAPa в гидролизе АТФ и в скорости диссоциации с онДНК, но филаменты RecAX53 на онДНК оказались менее стабильными по сравнению с контрольными белками. Полученные результаты в совокупности с опубликованными данными о быстрой ассоциации белка RecAX53 с онДНК (Baitin et al., 2008) позволили заключить, что гиперрекомбиногенность химерного белка RecAX53 определяется его повышенной динамичностью — способностью к быстрой ассоциации и диссоциации с онДНК. Мы предполагаем, что это качество RecAX53 определяется его повышенной гибкостью, на которую указывает сниженная стабильность филаментов RecAX53.

Агрессивность белка RecAX53 в связывании с днДНК объясняет SOS-независимый механизм гиперрекомбинации этого белка.

Полученные данные согласуются с предположением о преимуществе белка RecAX53 в инициации рекомбинационных обменов по сравнению с белками RecAEс и RecAPa (Baitin et al., 2008).

Благодарность

Авторы выражают благодарность д. б. н. В. Г. Королёву за критическое прочтение работы и за помощь в подготовке статьи к публикации.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00235.

Литература

1. Ланцов В. А., 2007. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК // Молекулярная биология. Т. 41. № 3. С. 1–12.

2. Бреслер С. Е., Ланцов В. А., 1978. Индуцибельная рекомбинация в *Escherichia coli* K-12: рекомбиногенный эффект мутации *tif1* // ДАН. 1978. Т. 238. С. 715–717.
3. Baitin D. M., Zaitsev E. N., Lanzov V. A. 2003. Hyper-recombinogenic RecA protein from *Pseudomonas aeruginosa* with enhanced activity of its primary DNA binding site // J. Mol. Biol. Vol. 328. P. 1–7.
4. Baitin D. M., Bakhlanova I. V., Chervyakova D. V. et al., 2008. Two RecA protein types that mediate different modes of hyperrecombination // Journal of bacteriology. Vol. 190. N. 8. P. 3036–3045.
5. Bakhlanova I. V., Ogawa T., Lanzov V. A., 2001. Recombinogenic activity of chimeric RecA genes (*Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli*): a search for RecA protein regions responsible for this activity // Genetics. Vol. 159. P. 7–15.
6. Bianco P., Weinstock G., 1998. Characterization of RecA1332 *in vivo* and *in vitro*. A role for alpha-helix E as a liaison between the subunit-subunit interface and the DNA and ATP binding domains of RecA protein // Genes to Cells. Vol. 3. P. 79–97.
7. Chervyakova D., Kagansky A., Petukhov M., Lanzov V., 2001. [L29M] substitution in the interface of subunit-subunit interactions enhances *Escherichia coli* RecA protein properties important for its recombinogenic activity // J. Mol. Biol. Vol. 314. P. 923–935.
8. Cox M. M., 2003. The bacterial RecA protein as a motor protein // Annu. Rev. Microbiol. Vol. 57. P. 551–577.
9. Galletto R., Kowalczykowski S. C., 2007. RecA // Curr. Biol. Vol. 17. Issue 11. P. R395–R397.
10. Hortnagel K., Voloshin O. N., Kinal H. H. et al., 1999. Saturation mutagenesis of the *E. coli* RecA loop L2 homologous DNA pairing region reveals residues essential for recombination and recombinational repair // J. Mol. Biol. Vol. 286. P. 1097–1106.
11. Kowalczykowski S. C., 1986. Interaction of RecA protein with a photoaffinity analogue of ATP, 8-azido-ATP: Determination of nucleotide cofactor binding parameters and of the relationship between ATP binding and ATP hydrolysis // Biochemistry. Vol. 25. P. 5872–5881.
12. Kowalczykowski S. C., Krupp R. A., 1987. Effects of the *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. Vol. 193. P. 97–113.
13. Lanzov V. A., 2002. Hyper-recombination in *Escherichia coli* with and without SOS response // Recent Research Development in DNA repair and Mutagenesis. (M. Ruiz-Rubio, E. Alejandro-Duran, and T. Roldan-Arjona, Eds). India: Kerala, Research Signpost. P. 21–38.
14. Lanzov V. A., Bakhlanova I. V., Clark A. J., 2003. Conjugational hyperrecombination achieved by de-repressing the LexA regulon, altering the properties of RecA protein and inactivating mismatch repair in *Escherichia coli* K-1 // Genetics. Vol. 163. P. 1243–1254.
15. Lavery P. E., Kowalczykowski S. C., 1990. Properties of RecA441 protein-catalyzed DNA strand exchange can be attributed to an enhanced ability to compete with SSB protein // J. Biol. Chem. Vol. 265. P. 4004–4010.
16. 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. Vol. 267. P. 20648–20658.
17. Lee J. W., Cox M. M., 1990. Inhibition of recA protein promoted ATP hydrolysis. 1. ATP gamma S and ADP are antagonistic inhibitors // Biochemistry. Vol. 29. P. 7666–7676.
18. 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. Vol. 27. P. 1205–1212.
19. Mikawa T., Masui R, Kuramitsu S., 1998. RecA protein has extremely high cooperativity for substrate in its ATPase activity // J. Biochem. Vol. 123. P. 450–457.
20. Morimatsu K, Horii T., 1995. DNA-binding surface of RecA protein photochemical cross-linking of the first DNA binding site on RecA filament // Eur. J. Biochem. Vol. 234. P. 695–705.
21. Namsaraev E. A., Baitin D., Bakhlanova I. V. et al., 1998. Biochemical basis of hyper-recombinogenic activity of *Pseudomonas aeruginosa* RecA protein in *Escherichia coli* cells // Mol. Microbiol. Vol. 27. P. 727–738.
22. Natri H. G., Guzzo A, Lange C. S. et al., 1997. Mutational analysis of the RecA protein L1 region identifies this area as a probable part of the co-protease substrate binding site // Mol. Microbiol. Vol. 25. P. 967–978.
23. Ogawa T., Shinohara A., Ogawa H., Tomizawa J., 1992. Functional structures of the RecA protein found by chimera analysis // J. Mol. Biol. Vol. 226. P. 651–660.
24. Pugh B. F., Cox M. M., 1988. High salt activation of RecA protein ATPase in the absence of DNA // J. Biol. Chem. Vol. 263. P. 76–83.
25. Read S. M., Northcote D. H., 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein // Anal. Biochem. Vol. 116. P. 53–64.
26. Rehrauer W. M., Lavery P., Palmer E. et al., 1996. Interaction of *Escherichia coli* RecA protein with LexA repressor. I. LexA repressor cleavage is competitive with binding of a secondary DNA molecule // J. Biol. Chem. Vol. 271. P. 23865–23873.

27. Roca A. I., Cox M. M., 1997. RecA protein: structure, function, and role in recombination DNA repair // *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* Vol. 56. P. 129–223. 15.
28. Shan Q., Cox M. M., 1996. RecA protein dynamics in the interior of RecA nucleoprotein filaments // *J. Mol. Biol.* Vol. 257. P. 756–774.
29. Shan, Q., Bork, J. M., Webb, B. L. et. al., 1997. RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ssDNA and stabilization by RecO and RecR proteins // *J. Mol. Biol.* Vol. 265. P. 519–540.
30. Story R. M., Weber I. T., Steitz T. A., 1992. The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer // *Nature.* Vol. 355. P. 318–325.
31. Zlotnic A., Mitchell R. S., Steed R. K., Brenner S. L., 1993. Analysis of two distinct single-stranded DNA binding sites on the RecA nucleoprotein filament // *J. Biol. Chem.* Vol. 268. P. 22525–22530.
32. Voloshin O. N., Wang L., Camerini-Otero R. D., 2000. The homologous pairing domain of RecA also mediates the allosteric regulation of DNA binding and ATP hydrolysis: a remarkable concentration of functional residues // *J. Mol. Biol.* Vol. 303. P. 709–720.
- Hyper-recombinogenity of the chimeric protein RecAX53 (*Escherichia coli*/*Pseudomonas aeruginosa*) is caused by its increased dynamics**
- D. B. Chervyakova, V. A. Lanzov*
- ✿ **SUMMARY:** RecAX53 is the most recombinogenic protein among the chimeric RecA proteins composed of *Escherichia coli* RecA (RecAЕс) and *Pseudomonas aeruginosa* RecA (RecAPa) protein fragments. We found out that RecAX53 protein is more rapid in ATP hydrolysis, dissociation from single-stranded DNA (ssDNA), SSB protein displacement from ssDNA and in association with double-stranded DNA (dsDNA), as compared with RecAЕс and RecAPa proteins. These results indicate that the RecAX53 hyper-recombinogenity is caused by high dynamics of this protein — by its rapid association with and dissociation from ssDNA. The ability of RecAX53 to bind actively with dsDNA accounts for the SOS-independent mechanism of hyper-recombination used by this protein.
- ✿ **KEY WORDS:** RecA protein; hyper-recombinogenity; RecA protein-catalyzed ATP hydrolysis; SOS-independent recombination mechanism.

Информация об авторах:

Червякова Дарья Борисовна, м. н. с., отделение молекулярной и радиационной биофизики, Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, 188300, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща, ОМРБ ПИЯФ РАН. E-mail: dashach066@mail.ru.

Ланцов Владислав Александрович, д. б. н., профессор, заведующий, лаборатория молекулярной генетики, отделение молекулярной и радиационной биофизики, Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, 188300, Ленинградская область, г. Гатчина, Орлова роща, ОМРБ ПИЯФ РАН. E-mail: dashach066@mail.ru.