Биофизика и медицинская физика

Научная статья
УДК 577.24
DOI: https://doi.org/10.18721/JPM.19212

РАЗЛИЧИЯ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ РЕКОМБИНАЗ RAD51 И UvsX С ДНК, ВЫЯВЛЕННЫЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА УРОВНЕ ОДИНОЧНЫХ МОЛЕКУЛ

И. Д. Гончаров, А. И. Садова, И. М. Нужин, П. А. Теницкая, И. В. Курдюмова, А. А. Горьковская, М. А. Ходорковский ✉, А. А. Алексеев

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

✉ khodorkovskii@gmail.com

Аннотация. Нуклеопротеиновые филаменты, формируемые белками-рекомбиназами на ДНК, являются ключевыми структурами процесса гомологичной рекомбинации, обеспечивающей поддержание стабильности генома. Формирование филамента на ДНК приводит к значительному изменению механических свойств комплекса, в частности к удлинению ДНК, при этом кинетика сборки филамента зависит от механического натяжения. В работе с помощью метода оптического захвата получены данные о динамике сборки филаментов RAD51 человека и UvsX бактериофага T6 на двухцепочечной ДНК при различных силах механического натяжения. В диапазоне 3 – 12 пН RAD51 эффективно связывается с ДНК, формируя филаменты с высокой степенью покрытия. В отличие от RAD51, эффективное формирование филаментов UvsX происходит только при высоком натяжении (12 пН), тогда как при значениях 3 – 6 пН связывание UvsX с ДНК существенно ограничено. Различная склонность двух рекомбиназ к взаимодействию с ДНК отражает адаптацию к клеточным условиям и механизмам регуляции гомологичной рекомбинации.

Ключевые слова: гомологичная рекомбинация, RAD51, UvsX, RecA, онкотерапия, рекомбиназная полимеразная амплификация, метод оптического захвата, нуклеопротеиновый филамент

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-74-00107: «Конформационные состояния рекомбиназы RAD51»).

Для цитирования: Гончаров И. Д., Садова А. И., Нужин И. М., Теницкая П. А., Курдюмова И. В., Горьковская А. А., Ходорковский М. А., Алексеев А. А. Различия во взаимодействии рекомбиназ RAD51 и UvsX с ДНК, выявленные в экспериментах на уровне одиночных молекул // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2026. Т. 19. № 2. С. 147–159. DOI: https://doi.org/10.18721/JPM.19212

Статья открытого доступа, распространяемая по лицензии CC BY-NC 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

© Гончаров И. Д., Садова А. И., Нужин И. М., Теницкая П. А., Курдюмова И. В., Горьковская А. А., Ходорковский М. А., Алексеев А. А., 2026. Издатель: Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого.

Original article
DOI: https://doi.org/10.18721/JPM.19212

DIFFERENCES IN THE INTERACTION OF RAD51 AND UvsX RECOMBINASES WITH DNA REVEALED BY SINGLE-MOLECULE EXPERIMENTS

I. D. Goncharov, A. I. Sadova, I. M. Nuzhin, P. A. Tenitskaya, I. V. Kurdyumova, A. A. Gorkovskaia, M. A. Khodorkovskiy ✉, A. A. Alekseev

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

✉ khodorkovskii@gmail.com

Abstract. Nucleoprotein filaments formed by recombinase proteins on DNA are key structures of the homologous recombination process, which ensures the maintenance of the genome stability. Filament formation on DNA leads to a significant change in the mechanical properties of the complex, in particular to DNA lengthening, while the kinetics of filament assembly depends on mechanical tension. Using optical tweezers, this study has obtained the data on the assembly dynamics of human RAD51 recombinase and bacteriophage T6 UvsX recombinase filaments on double-stranded DNA under varying mechanical tension. In the range between 3 and 12 pN, RAD51 efficiently bound to DNA, forming filaments with a high coverage. In contrast to RAD51, an efficient UvsX filament formation occurred only under high tension (12 pN), whereas UvsX binding to DNA was severely restricted at 3–6 pN. The different tendency of the two recombinases to interact with DNA reflected their adaptation to cellular environments and regulatory mechanisms governing homologous recombination.

Keywords: homologous recombination, RAD51, UvsX, RecA, cancer treatment, recombinase polymerase amplification, optical tweezers, nucleoprotein filament

Funding: The reported study was funded by Russian Science Foundation (Grant No. 24-74-00107, "Conformational states of RAD51 recombinase").

For citation: Goncharov I. D., Sadova A. I., Nuzhin I. M., Tenitskaya P. A., Kurdyumova I. V., Gorkovskaia A. A., Khodorkovskiy M. A., Alekseev A. A., Differences in the interaction of RAD51 and UvsX recombinases with DNA revealed by single-molecule experiments, St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics. 19 (2) (2026) 147–159. DOI: https://doi.org/10.18721/JPM.19212

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Введение

Гомологичная рекомбинация – ключевой механизм поддержания стабильности генома. Она позволяет клеткам восстанавливать двухцепочечные разрывы ДНК, возобновлять остановленные репликативные вилки и обмениваться генетическим материалом в ходе мейоза [1, 2]. Центральную роль в процессе гомологичной рекомбинации играют рекомбиназы – высококонсервативные ДНК-связывающие белки, которые покрывают одноцепочечную ДНК (ssDNA), образуя нуклеопротеиновый филамент. Этот филамент осуществляет поиск гомологичной последовательности на другой молекуле ДНК и способствует инвазии цепи [3, 4].

Эукариотическая рекомбиназа RAD51, бактериальная рекомбиназа RecA и фаговая рекомбиназа UvsX относятся к одному суперсемейству, представленному во всех доменах жизни [5, 6]. Фаговая рекомбиназа UvsX функционально более близка к бактериальному белку RecA и участвует в процессах гомологичной рекомбинации, рекомбинационно-зависимой репликации и репарации ДНК в инфицированных клетках-хозяевах [7, 8]. Все члены суперсемейства содержат консервативный RecA-подобный АТФазный домен с

© Goncharov I. D., Sadova A. I., Nuzhin I. M., Tenitskaya P. A., Kurdyumova I. V., Gorkovskaia A. A., Khodorkovskiy M. A., Alekseev A. A., 2026. Published by Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University.

мотивами Walker A и Walker B, которые участвуют в связывании и гидролизе аденозинтрифосфата (АТФ), регулируя сборку, стабильность и диссоциацию нуклеопротеинового филамента [5, 9 – 12].

RecA – наиболее детально изученный представитель семейства. Структура его спирального филамента, межмономерные контакты и структура мономера известны с почти атомным разрешением благодаря результатам исследований, полученных методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии [3, 9]. Функции RecA в SOS-ответе, гомологичной рекомбинации, рестарте репликативных вилок, горизонтальном переносе генов и формировании биопленок хорошо охарактеризованы [13 – 18]. ДНК-зависимая АТФазная активность RecA измерена: ее значения k_{cat} составляют 30 мин$^{-1}$ для филамента RecA на ssDNA и 20 мин$^{-1}$ на двухцепочечной ДНК (dsDNA) [19].

RAD51 человека в настоящее время интенсивно изучается, поскольку повышенная экспрессия этой рекомбиназы в опухолях обеспечивает устойчивость к химиотерапевтическим препаратам, повреждающим ДНК, что делает данный белок перспективной мишенью для таргетной терапии [20 – 22]. АТФазная активность RAD51 человека была охарактеризована в работе [23], где показано, что значения каталитической константы k_{cat} составляют 0,21 мин$^{-1}$ в присутствии ssDNA и 0,07 – 0,11 мин$^{-1}$ в присутствии dsDNA.

Рекомбиназа UvsX Т-четных фагов изучена существенно меньше, чем бактериальные или эукариотические гомологи, хотя в последние годы интерес к ее свойствам значительно возрос в связи с ее использованием в технологии рекомбиназной полимеразной амплификации (РПА) [24, 25]. В ходе РПА UvsX формирует нуклеопротеиновые филаменты на одноцепочечных праймерах и осуществляет их внедрение в двухцепочечную ДНК-матрицу, позволяя ДНК-полимеразе начать синтез новой цепи без необходимости термической денатурации дуплекса. Самая высокая активность рекомбиназы UvsX среди гомологов делает этот фермент предпочтительным для применения в РПА. Так, согласно литературным данным, каталитическая константа k_{cat} гидролиза для UvsX достигает значения 240 – 500 мин$^{-1}$, что на порядок выше аналогичного показателя для бактериального белка RecA [26, 27].

Нуклеопротеиновый филамент, формируемый рекомбиназами, представляет собой ключевую структурную единицу гомологичной рекомбинации, обеспечивающую поиск гомологии и инвазию цепи в донорскую ДНК [28]. Связывание рекомбиназ с ДНК приводит к значительному удлинению молекулы (примерно в 1,5 раза), по сравнению с B-формой ДНК, и изменению ее механических свойств, включая жесткость и эластичность [9, 29 – 31].

Метод оптического захвата позволяет в реальном времени отслеживать эти структурные превращения на уровне одиночных молекул ДНК, так как измеряются трансформации их длины под контролируемым внешним натяжением.

В настоящей работе представлены данные о кинетике сборки нуклеопротеиновых филаментов RAD51 человека и UvsX фага T6 на dsDNA при различных величинах прикладываемой силы натяжения. Результаты получены с помощью метода оптического захвата.

Материалы и методы

ДНК-конструкция. Для проведения экспериментов на уровне одиночных молекул ДНК использовали линейную dsDNA длиной 11 100 пар оснований (base pairs (BPs)). Молекулы обладали идентичной природной последовательностью и несли биотиновые модификации на обоих концах для специфического прикрепления к микросферам, функционализированным стрептавидином. Подробная методика получения и очистки таких ДНК-конструкций описана в работах [12, 32].

Получение очищенных форм белков. Рекомбинантные белки RAD51 человека и UvsX бактериофага T6 получали путем экспрессии в штаммах *Escherichia coli* BLR(DE3)pLysS для RAD51 и Rosetta(DE3) для UvsX. Для этого использовали плазмиды, кодирующие соответствующие белки, слитые с полигистидиновым хвостом. Клетки выращивали в среде Lysogeny broth (LB) до оптической плотности 0,6, индуцировали экспрессию добавлением изопропил-D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Очистку целевого белка из полученной биомассы клеток проводили методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (NTA – нитрилотриуксусная кислота).

Лизат клеток наносили на колонку в буфере с 50 мМ имидазола, после чего белок элюировали ступенчатым градиентом имидазола. Полученные препараты обладали чистотой не менее 95 %, что подтверждалось при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли. Очищенные белки хранили при –80 °С в буфере с добавлением 10% глицерина. Подробная методика очистки белков описана в работах [33, 34].

Установка «Лазерный пинцет». Эксперименты выполняли на оригинальной уникальной научной установке «Лазерный пинцет», собранной на основе неинвертированного микроскопа Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss). Установка позволяет осуществлять оптический захват одновременно двумя независимыми ловушками, благодаря разделению излучения лазера (Nd:YAG, λ = 1064 нм, Spectra Physics, модель BL-106C) поляризационным делителем на две компоненты, поляризованные во взаимно перпендикулярных направлениях. Пучки фокусировали с помощью иммерсионного объектива с высокой числовой апертурой (NA = 1,25). Чтобы перемещать подвижную ловушку в плоскости образца, луч направляли через зеркало, закрепленное на пьезоэлектрическом позиционирующем столике.

Экспериментальная установка была дополнена многоканальной микрофлюидной системой u-Flux (LUMICKS B.V.) для ламинарной подачи и смены буферных растворов вокруг образца. Микрофлюидную камеру крепили на моторизованном столике микроскопа с трехосевым позиционированием. Регистрацию изображений вели на камеру iXon Ultra 897 (Andor Technology) с электронно-умножающей CCD-матрицей. Обработка видеоданных для определения дистанции между микросферами и соответствующей силы растяжения ДНК выполнялась в реальном времени специализированным программным обеспечением, созданным нами в среде LabVIEW. Жесткость оптических ловушек калибровали по силе вязкого сопротивления, которую испытывала захваченная микросфера при движении с заданной скоростью в жидкой среде известной вязкости.

Проведение экспериментов на уровне одиночных молекул ДНК

Для выполнения манипуляций с ДНК, между каналами с ламинарными потоками осуществляли перенос микросфер и молекулы ДНК, закрепленной между ними. В первом канале микрофлюидной системы захватывали стрептавидин-функционализированные полистироловые микросферы диаметром 2,1 мкм в две независимые оптические ловушки. Затем эти микросферы переносили во второй канал, содержащий раствор ДНК с концентрацией 30 пМ. В этих условиях осуществляли прикрепление одной молекулы ДНК к микросферам за счет формирования биотин-стрептавидиновых связей на ее концах, что приводило к фиксации ДНК между двумя микросферами. После такой фиксации эту систему подвергали предварительному растяжению до силы 10 – 20 пН в канале, содержащем только буферный раствор, с целью проверки целостности молекулы и исключения множественных прикреплений. Далее ДНК, закрепленную между микросферами, переносили в четвертый канал микрофлюидной системы, содержащий рекомбиназу RAD51 или UvsX в концентрации 300 нМ.

Используемый буферный раствор имел следующий состав:

40 мМ Tris-HCl (pH 7,5); 0,02% BSA; 1 мМ DTT; 5 мМ $MgCl_2$; 2 мМ АТФ.

При этих условиях регистрировали процесс сборки нуклеопротеинового филамента на молекуле ДНК. Измерения проводили в режиме фиксированной силы в диапазоне 3 – 12 пН при температуре 22°С. Сборку нуклеопротеинового филамента отслеживали в реальном времени по увеличению длины молекулы ДНК при формировании комплекса.

Используемый в работе метод оптического захвата позволяет манипулировать одиночными биомолекулами и отслеживать изменения их механических свойств ввиду возможности контроля силы натяжения (в диапазоне от долей пиконьютона до сотен пиконьютонов) и регистрации удлинения молекулы с нанометровым разрешением.

Результаты и обсуждение

Для изучения кинетики связывания рекомбиназ RAD51 и UvsX с ДНК использовали dsDNA длиной 11 100 BPs. При помощи совмещения метода оптического пинцета с микрофлюидной системой осуществляли захват одиночной молекулы ДНК (рис. 1, *а*).

Молекула ДНК при фиксированной силе натяжения обладает практически постоянной длиной, определяемой энтропийным и энтальпийным вкладами в упругий отклик. Экспериментально полученная зависимость силы натяжения от удлинения для используемой ДНК-конструкции представлена на рис. 1, *b*.

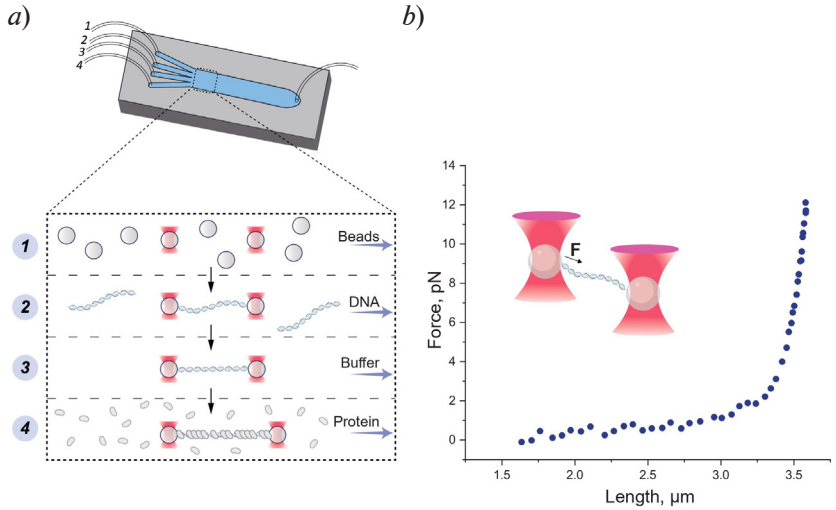


Рис. 1. Графическое представление экспериментов на уровне одиночных молекул ДНК: *a* – схематичное изображение микрофлюидной камеры с четырьмя ламинарными потоками *1* – *4*; *b* – пример получаемой зависимости натяжения *F* (пН) от длины молекулы ДНК, используемой в работе

Перенос удерживаемой молекулы ДНК в канал, содержащий рекомбиназу RAD51, приводил к сборке нуклеопротеинового филамента. В ходе инкубации к образцу прикладывали постоянную силу натяжения и регистрировали изменение длины. На рис. 2 показаны репрезентативные кривые сборки филамента RAD51, полученные при силах натяжения F = 3 пН, 6 пН и 12 пН. Динамика формирования филамента RAD51 была малочувствительной к вариации величины прикладываемого натяжения. Во всех случаях длина комплекса выходила на насыщение за время 60 – 80 с.

Итоговые значения длины филамента составили:

4,82 ± 0,09 мкм (N = 4) при F = 3 пН;

5,02 ± 0,04 мкм (N = 6) при F = 6 пН;

4,99 ± 0,11 мкм (N = 4) при F = 12 пН.

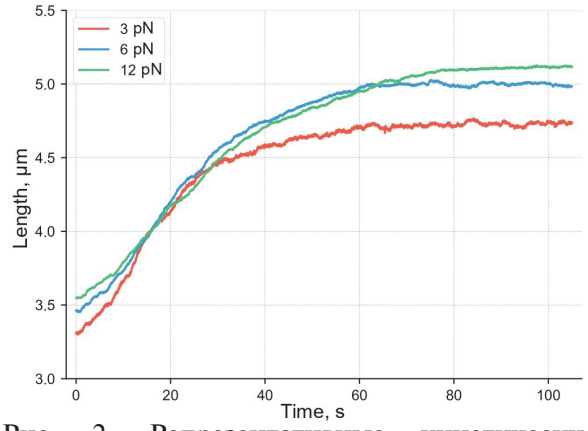


Рис. 2. Репрезентативные кинетические кривые сборки филаментов RAD51 на двухцепочечной ДНК (dsDNA) при трех различных силах натяжения

Полезно сопоставить полученные результаты итогового удлинения ДНК при формировании филамента RAD51–ДНК с данными, известными из структурных исследований. Согласно структурным данным, ДНК в первичном сайте нуклеопротеинового филамента удлинена примерно в 1,5 раза относительно контурной длины B-формы ДНК [5, 35]. Контурная длина используемых молекул ДНК (11 тыс. BPs) составляет около 3,7 мкм. Ввиду энтропийных факторов, длина ДНК, регистрируемая как межконцевое расстояние, оказалась короче контурной длины и составила примерно 3,5 мкм при силе F = 6 пН. Полуторакратное увеличение указанного значения дает оценку 5,25 мкм для длины филаментов,

формируемых на используемых двунитевых ДНК, что согласуется с итоговым удлинением ДНК на 1,5 мкм, регистрируемым в экспериментах. Этот результат свидетельствует о достаточно высокой степени покрытия ДНК рекомбиназой RAD51 в сформированных нуклеопротеиновых филаментах.

Аналогичным образом была исследована кинетика сборки филаментов UvsX. В отличие от RAD51, полноценное формирование нуклеопротеинового филамента наблюдалось только при приложении силы $F = 12$ пН (рис. 3, *a*). При силе $F = 3$ пН удлинения ДНК в ходе инкубации в канале с UvsX не наблюдалось, тогда как при $F = 6$ пН фиксировали лишь ограниченное увеличение длины, не достигающее стационарного значения (за время наблюдения), соответствующего полуторократному удлинению ДНК (рис. 3, *b*).

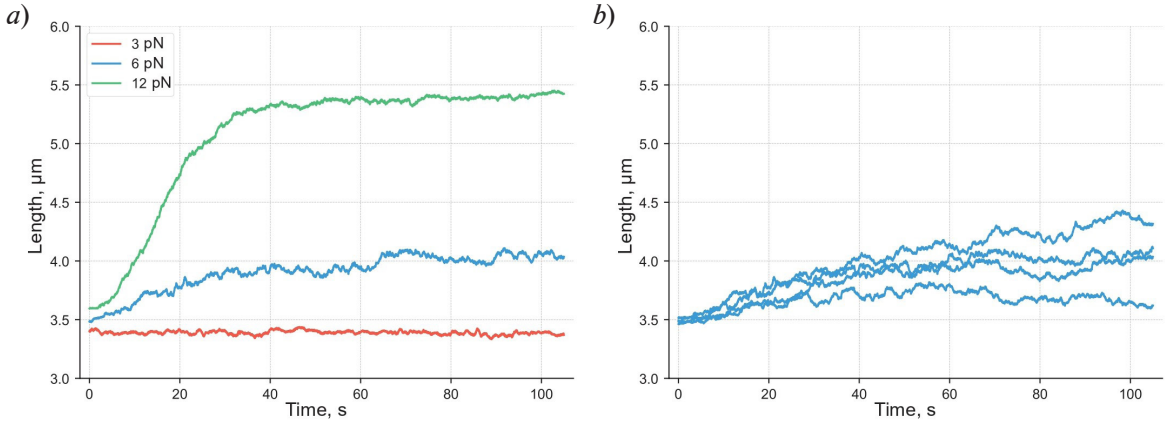


Рис. 3. Результаты наблюдения сборки филаментов UvsX на dsDNA:
a – репрезентативные кривые сборки при трех значениях *F*, пН: 3, 6 и 12;
b – кривые сборки филаментов UvsX при F = 6 пН

При силе $F = 12$ пН длина комплекса выходила на насыщение в течение 30 – 40 с, при этом итоговая длина составляла 5,4 ± 0,1 мкм ($N = 5$). Это значение несколько выше таковых, наблюдаемых при той же силе для RAD51, однако также согласуется с примерно полуторократным удлинением ДНК. Точная длина филамента, регистрируемая в экспериментах с использованием метода оптического захвата, определяется, помимо силы натяжения, целым рядом факторов, включая степень покрытия ДНК белком, шаг спирали филамента, число мономеров на оборот спирали, персистентная длина, а также локальное присутствие участков неактивной конформации, связанное с гидролизом АТФ. Тем не менее, структурные исследования показывают, что для филаментов, формируемых рекомбиназами, характерно удлинение ДНК приблизительно в 1,5 раза, по сравнению с длиной B-формы ДНК [9, 30, 31]. Наблюдение комплексов с большей длиной, например, при $F = 12$ пН, может указывать на формирование рекомбиназой UvsX филаментов с большей степенью покрытия ДНК, чем рекомбиназой RAD51, при этих условиях.

Несмотря на сложившееся мнение о меньшей активности рекомбиназы RAD51, по сравнению с RecA и UvsX, полученные результаты указывают на ее способность эффективно связываться с двухцепочечной ДНК (dsDNA).

Из литературных данных известно, что для рекомбиназы RecA из грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* такое связывание затруднено и, как правило, наблюдается лишь при приложении достаточно высокой внешней силы натяжения, превышающей 20 пН [32].

В клетке же активность рекомбиназы RAD51 находится под контролем ряда медиаторных белков, прежде всего на этапе сборки нуклеопротеинового филамента на ssDNA [5]. В условиях *in vitro*, при катализе обмена нитями, RAD51 демонстрирует повышенную эффективность внедрения 5'-концевого фрагмента ssDNA, по сравнению с 3'-концевым, что контрастирует с поведением RecA, для которой предпочтительным является 3'-концевой участок [36]. Вместе с тем показано, что при использовании дуплексной ДНК с одноцепочечным выступом, для рекомбиназы RAD51 восстанавливается эффективность внедрения 3'-концевого фрагмента.

В большинстве моделей гомологичной рекомбинации, в качестве ключевого начального этапа рассматривается формирование нуклеопротеинового филамента на ssDNA в присутствии дополнительных белков, как конкурирующих за связывание с оцДНК, так и стимулирующих загрузку рекомбиназы на ssDNA. Вместе с тем природный субстрат, образующийся в результате процессинга ДНК и доступный для взаимодействия с рекомбиназой, представляет собой гибридную ДНК, включающую участок dsDNA, переходящий в 3'-концевой одноцепочечный фрагмент. В связи с этим можно предположить, что формирование стабильного филамента RAD51 на dsDNA способно, вследствие кооперативных взаимодействий, дополнительно повышать конформационную устойчивость филамента RAD51 на ssDNA и тем самым способствовать процессу гомологичной рекомбинации. Наличие взаимосвязи между конформационными состояниями различных участков филамента, сформированного на гибридной ДНК, ранее было продемонстрировано для рекомбиназы RecA [37].

Рекомбиназа UvsX считается наиболее активной и поэтому часто востребованной в системах рекомбиназной полимеразной амплификации. Каталитическая константа гидролиза АТФ для UvsX на три порядка превышает соответствующий показатель для RAD51. В ходе инфицирования клетки Т-четными бактериофагами, рекомбиназа UvsX обеспечивает рекомбинационно-зависимую репликацию множественных копий генома вируса на поздних стадиях инфекции, что позволяет осуществлять синтез сотен копий фаговой ДНК в сжатые временные сроки [38]. Неконтролируемое связывание UvsX с dsDNA могло бы препятствовать процессам репликации в условиях интенсивного синтеза фаговой ДНК, а также приводить к неоправданному расходу АТФ. В случае RAD51 подобное взаимодействие рекомбиназы с dsDNA видится более вероятным и не сопровождается значительным перерасходом АТФ вследствие существенно более низкой АТФазной активности данной рекомбиназы. При этом в эукариотических клетках активность RAD51 дополнительно находится под контролем значительно более широкого набора регуляторных белков.

Заключение

В работе получены данные о кинетике связывания рекомбиназ RAD51 и UvsX при различных силах внешнего натяжения в диапазоне 3 – 12 пН. Наблюдаемое отсутствие связывания UvsX с двухцепочечной ДНК (dsDNA) без приложения достаточного натяжения, по-видимому, отражает эволюционную адаптацию фаговой репликационной системы. Наблюдаемая различная склонность рекомбиназ RAD51 и UvsX к связыванию с dsDNA указывает на возможные альтернативные пути организации рекомбинационных комплексов *in vivo*.

Метод оптического захвата открыл возможность количественно охарактеризовать влияние механического напряжения на процессы формирования и стабильности рекомбиназных комплексов.

Проведение же исследований на уровне одиночных молекул ДНК позволяет прямое тестирование влияния типа ДНК-субстрата и физических условий на сборку и стабильность нуклеопротеиновых филаментов и служит основой для более детального описания молекулярных механизмов гомологичной рекомбинации.

Благодарность

Авторы статьи выражают глубокую благодарность Юрию Владимировичу Килю, старшему научному сотруднику лаборатории молекулярной и клеточной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ за предоставление штамма BLR(DE3)pLysS и экспрессионного вектора для выделения RAD51, а также за плодотворное обсуждение материалов статьи, которое способствовало улучшению ее качества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Stewart M. D., Merino Vega D., Arend R. C., Baden J. F., Barbash O., Beaubier N., Collins G., French T., Ghahramani N., Hinson P.** Homologous recombination deficiency: concepts, definitions, and assays // The Oncologist. 2022. Vol. 27. No. 3. Pp. 167–174.

2. **Ito M., Shinohara A.** Chromosome architecture and homologous recombination in meiosis // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2023. Vol. 10. 6 January. P. 1097446.

3. **Yang H., Pavletich N. P.** Insights into homology search from cryo-EM structures of RecA-DNA recombination intermediates // Current Opinion in Genetics & Development. 2021. Vol. 71. December. Pp. 188–194.

4. **McIlwraith M. J., Van Dyck E., Masson J.-Y., Stasiak A. Z., Stasiak A., West S. C.** Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51, Rad52 and RPA proteins // Journal of Molecular Biology. 2000. Vol. 304. No. 2. Pp. 151–164.

5. **Bonilla B., Hengel S. R., Grundy M. K., Bernstein K. A.** RAD51 gene family structure and function // Annual Review of Genetics. 2020. Vol. 54. November. Pp. 25–46.

6. **Pan Y., Xie N., Zhang X., Yang S., Lv S.** Computational insights into the dynamic structural features and binding characteristics of recombinase UvsX compared with RecA // Molecules. 2023. Vol. 28. No. 8. P. 3363.

7. **Yang S., VanLoock M. S., Yu X., Egelman E. H.** Comparison of bacteriophage T4 UvsX and human Rad51 filaments suggests that RecA-like polymers may have evolved independently // Journal of Molecular Biology. 2001. Vol. 312. No. 5. Pp. 999–1009.

8. **Bleuit J. S., Xu H., Ma Y., Wang T., Liu J., Morrical S. W.** Mediator proteins orchestrate enzyme–ssDNA assembly during T4 recombination-dependent DNA replication and repair // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. Vol. 98. No. 15. Pp. 8298–8305.

9. **Chen Z., Yang H., Pavletich N. P.** Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures // Nature. 2008. Vol. 453. No. 7194. Pp. 489–494.

10. **Gajewski S., Webb M. R., Galkin V., Egelman E. H., Kreuzer K. N., White S. W.** Crystal structure of the phage T4 recombinase UvsX and its functional interaction with the T4 SF2 helicase UvsW // Journal of Molecular Biology. 2011. Vol. 405. No. 1. Pp. 65–76.

11. **Alekseev A., Morozova N., Vedyaykin A., Yakimov A., Khodorkovskii M., Pobegalov G.** Single-molecule characterization of compressed RecA nucleoprotein filaments // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2022. Vol. 614. 30 April. Pp. 29–33.

12. **Alekseev A., Serdakov M., Pobegalov G., Yakimov A., Bakhlanova I., Baitin D., Khodorkovskii M.** Single-molecule analysis reveals two distinct states of the compressed RecA filament on single-stranded DNA // FEBS Letters. 2020. Vol. 594. No. 21. Pp. 3464–3476.

13. **Del Val E., Nasser W., Abaibou H., Reverchon S.** RecA and DNA recombination: a review of molecular mechanisms // Biochemical Society Transactions. 2019. Vol. 47. No. 5. Pp. 1511–1531.

14. **Bianco P. R., Lu Y.** Single-molecule insight into stalled replication fork rescue in *Escherichia coli* // Nucleic Acids Research. 2021. Vol. 49. No. 8. Pp. 4220–4238.

15. **Kaushik V., Tiwari M., Tiwari V.** Interaction of RecA mediated SOS response with bacterial persistence, biofilm formation, and host response // International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 217. 30 September. Pp. 931–943.

16. **Mortier-Barrière I., De Saizieu A., Claverys J. P., Martin B.** Competence-specific induction of RecA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae* // Molecular Microbiology. 1998. Vol. 27. No. 1. Pp. 159–170.

17. **Le S., Serrano E., Kawamura R., Carrasco B., Yan J., Alonso J. C.** Bacillus subtilis RecA with DprA–SsbA antagonizes RecX function during natural transformation // Nucleic Acids Research. 2017. Vol. 45. No. 15. Pp. 8873–8885.

18. **Cory M. B., Li A., Hurley C. M., Carman P. J., Pumroy R. A., Hostetler Z. M., Perez R. M., Venkatesh Y., Li X., Gupta K.** The LexA–RecA* structure reveals a cryptic lock-and-key mechanism for SOS activation // Nature Structural & Molecular Biology. 2024. Vol. 31. No. 10. Pp. 1522–1531.

19. **Cox J. M., Tsodikov O. V., Cox M. M.** Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament // PLoS Biology. 2005. Vol. 3. No. 2. P. e52.

20. **Tennstedt P., Fresow R., Simon R., Marx A., Terracciano L., Petersen C., Sauter G., Dikomey E., Borgmann K.** RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma // International Journal of Cancer. 2013. Vol. 132. No. 9. Pp. 2118–2126.

21. **Orhan E., Velazquez C., Tabet I., Sardet C., Theillet C.** Regulation of RAD51 at the transcriptional and functional levels: What prospects for cancer therapy? // Cancers. 2021. Vol. 13. No. 12. P. 2930.

22. **Budke B., Lv W., Kozikowski A. P., Connell P. P.** Recent developments using small molecules to target RAD51: how to best modulate RAD51 for anticancer therapy? // ChemMedChem. 2016. Vol. 11. No. 22. Pp. 2468–2473.

23. **Tombline G., Fishel R.** Biochemical characterization of the human Rad51 protein: I. ATP hydrolysis // Journal of Biological Chemistry. 2002. Vol. 277. No. 17. Pp. 14417–14425.

24. **Wang L., Li Y., Wang P., Zhang Y., Liu Q.** Enhanced recombinase polymerase amplification via UvsX engineering and reaction optimization for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* // Letters in Applied Microbiology. 2025. Vol. 78. No. 6. P. ovaf081.

25. **Ji T., Fang X., Gao Y., Yu K., Gao X.** Research progress on the application of RPA-CRISPR/Cas12a in the rapid visual detection of pathogenic microorganisms // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2025. Vol. 15. 30 July. P. 1640938.

26. **Formosa T., Alberts B.** Purification and characterization of the T4 bacteriophage uvsX protein // Journal of Biological Chemistry. 1986. Vol. 261. No. 13. Pp. 6107–6118.

27. **Farb J. N., Morrical S. W.** Role of allosteric switch residue histidine 195 in maintaining active-site asymmetry in presynaptic filaments of bacteriophage T4 UvsX recombinase // Journal of Molecular Biology. 2009. Vol. 385. No. 2. Pp. 393–404.

28. **Subramanyam S., Kinz-Thompson C. D., Gonzalez Jr R. L., Spies M.** Observation and analysis of RAD51 nucleation dynamics at single-monomer resolution // Methods in enzymology. 2018. Vol. 600. 5 July. Pp. 201–232.

29. **Hegner M., Smith S. B., Bustamante C.** Polymerization and mechanical properties of single RecA–DNA filaments // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999. Vol. 96. No. 18. Pp. 10109–10114.

30. **Yu X., Egelman E. H.** DNA conformation induced by the bacteriophage T4 UvsX protein appears identical to the conformation induced by the *Escherichia coli* RecA protein // Journal of Molecular Biology. 1993. Vol. 232. No. 1. Pp. 1–4.

31. **Xu J., Zhao L., Xu Y., Zhao W., Sung P., Wang H.-W.** Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange // Nature Structural & Molecular Biology. 2017. Vol. 24. No. 1. Pp. 40–46.

32. **Alekseev A., Pobegalov G., Morozova N., Vedyaykin A., Cherevatenko G., Yakimov A., Baitin D., Khodorkovskii M.** A new insight into RecA filament regulation by RecX from the analysis of conformation-specific interactions // eLife. 2022. Vol. 11. 22 June. P. e78409.

33. **Prasad T. K., Yeykal C. C., Greene E. C.** Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA // Journal of Molecular Biology. 2006. Vol. 363. No. 3. Pp. 713–728.

34. **Kojima K., Juma K. M., Akagi S., Hayashi K., Takita T., O'Sullivan C. K., Fujiwara S., Nakura Y., Yanagihara I., Yasukawa K.** Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification // Journal of Bioscience and Bioengineering. 2021. Vol. 131. No. 2. Pp. 219–224.

35. **Short J. M., Liu Y., Chen S., Soni N., Madhusudhan M. S., Shivji M. K., Venkitaraman A. R.** High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy // Nucleic Acids Research. 2016. Vol. 44. No. 19. Pp. 9017–9030.

36. **Mazin A. V., Zaitseva E., Sung P., Kowalczykowski S. C.** Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing // The EMBO Journal. 2000. Vol. 19. No. 5. Pp. 1148–1156.

37. **Kim S. H., Ragunathan K., Park J., Joo C., Kim D., Ha T.** Cooperative conformational transitions keep RecA filament active during ATPase cycle // Journal of the American Chemical Society. 2014. Vol. 136. No. 42. Pp. 14796–14800.

38. **Brister J. R., Nossal N. G.** Multiple origins of replication contribute to a discontinuous pattern of DNA synthesis across the T4 genome during infection // Journal of Molecular Biology. 2007. Vol. 368. No. 2. Pp. 336–348.

REFERENCES

1. **Stewart M. D., Merino Vega D., Arend R. C., et al.,** Homologous recombination deficiency: concepts, definitions, and assays, Oncologist. 27 (3) (2022) 167–174.

2. **Ito M., Shinohara A.,** Chromosome architecture and homologous recombination in meiosis, Front. Cell Dev. Biol. 10 (Jan 6) (2023) 1097446.

3. **Yang H., Pavletich N. P.,** Insights into homology search from cryo-EM structures of RecA-DNA recombination intermediates, Curr. Opin. Genet. Dev. 71 (Dec) (2021) 188–194.

4. **McIlwraith M. J., Van Dyck E., Masson J.-Y., et al.,** Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins, J. Mol. Biol. 304 (2) (2000) 151–164.

5. **Bonilla B., Hengel S. R., Grundy M. K., Bernstein K. A.,** RAD51 gene family structure and function, Annu. Rev. Genet. 54 (Nov) (2020) 25–46.

6. **Pan Y., Xie N., Zhang X., et al.,** Computational insights into the dynamic structural features and binding characteristics of recombinase UvsX compared with RecA, Molecules. 28 (8) (2023) 3363.

7. **Yang S., VanLoock M. S., Yu X., Egelman E. H.,** Comparison of bacteriophage T4 UvsX and human Rad51 filaments suggests that RecA-like polymers may have evolved independently, J. Mol. Biol. 312 (5) (2001) 999–1009.

8. **Bleuit J. S., Xu H., Ma Y., et al.,** Mediator proteins orchestrate enzyme–ssDNA assembly during T4 recombination-dependent DNA replication and repair, Proc. Natl. Acad. Sci. 98 (15) (2001) 8298–8305.

9. **Chen Z., Yang H., Pavletich N. P.,** Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures, Nature. 453 (7194) (2008) 489–494.

10. **Gajewski S., Webb M. R., Galkin V., et al.,** Crystal structure of the phage T4 recombinase UvsX and its functional interaction with the T4 SF2 helicase UvsW, J. Mol. Biol. 405 (1) (2011) 65–76.

11. **Alekseev A., Morozova N., Vedyaykin A., et al.,** Single-molecule characterization of compressed RecA nucleoprotein filaments, Biochem. Biophys. Res. Commun. 614 (Apr 30) (2022) 29–33.

12. **Alekseev A., Serdakov M., Pobegalov G., et al.,** Single-molecule analysis reveals two distinct states of the compressed RecA filament on single-stranded DNA, FEBS Lett. 594 (21) (2020) 3464–3476.

13. **Del Val E., Nasser W., Abaibou H., Reverchon S.,** RecA and DNA recombination: A review of molecular mechanisms, Biochem. Soc. Trans. 47 (5) (2019) 1511–1531.

14. **Bianco P. R., Lu Y.,** Single-molecule insight into stalled replication fork rescue in *Escherichia coli*, Nucleic Acids Res. 49 (8) (2021) 4220–4238.

15. **Kaushik V., Tiwari M., Tiwari V.,** Interaction of RecA mediated SOS response with bacterial persistence, biofilm formation, and host response, Int. J. Biol. Macromol. 217 (Sep 30) (2022) 931–943.

16. **Mortier-Barrière I., De Saizieu A., Claverys J. P., Martin B.,** Competence-specific induction of RecA is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*, Mol. Microbiol. 27 (1) (1998) 159–170.

17. **Le S., Serrano E., Kawamura R., et al.,** Bacillus subtilis RecA with DprA–SsbA antagonizes RecX function during natural transformation, Nucleic Acids Res. 45 (15) (2017) 8873–8885.

18. **Cory M. B., Li A., Hurley C. M., et al.,** The LexA–RecA* structure reveals a cryptic lock-and-key mechanism for SOS activation, Nat. Struct. Mol. Biol. 31 (10) (2024) 1522–1531.

19. **Cox J. M., Tsodikov O. V., Cox M. M.,** Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament, PLoS Biol. 3 (2) (2005) e52.

20. **Tennstedt P., Fresow R., Simon R., et al.,** RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma, Int. J. Cancer. 132 (9) (2013) 2118–2126.

21. **Orhan E., Velazquez C., Tabet I., et al.,** Regulation of RAD51 at the transcriptional and functional levels: what prospects for cancer therapy? Cancers (Basel). 13 (12) (2021) 2930.

22. **Budke B., Lv W., Kozikowski A. P., Connell P. P.,** Recent developments using small molecules to target RAD51: How to best modulate RAD51 for anticancer therapy? ChemMedChem. 11 (22) (2016) 2468–2473.

23. **Tombline G., Fishel R.,** Biochemical characterization of the human Rad51 protein: I. ATP hydrolysis, J. Biol. Chem. 277 (17) (2002) 14417–14425.

24. **Wang L., Li Y., Wang P., et al.,** Enhanced recombinase polymerase amplification via UvsX engineering and reaction optimization for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*, Lett. Appl. Microbiol. 78 (6) (2025) ovaf081.

25. **Ji T., Fang X., Gao Y., et al.,** Research progress on the application of RPA-CRISPR/Cas12a in the rapid visual detection of pathogenic microorganisms, Front. Cell. Infect. Microbiol. 15 (Jul 30) (2025) 1640938.

26. **Formosa T., Alberts B.,** Purification and characterization of the T4 bacteriophage uvsX protein, J. Biol. Chem. 261 (13) (1986) 6107–6118.

27. **Farb J. N., Morrical S. W.,** Role of allosteric switch residue histidine 195 in maintaining active-site asymmetry in presynaptic filaments of bacteriophage T4 UvsX recombinase, J. Mol. Biol. 385 (2) (2009) 393–404.

28. **Subramanyam S., Kinz-Thompson C. D., Gonzalez Jr R. L., Spies M.,** Observation and analysis of RAD51 nucleation dynamics at single-monomer resolution, Methods Enzymol. 600 (Jul 5) (2018) 201–232.

29. **Hegner M., Smith S. B., Bustamante C.,** Polymerization and mechanical properties of single RecA–DNA filaments, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (18) (1999) 10109–10114.

30. **Yu X., Egelman E. H.,** DNA conformation induced by the bacteriophage T4 UvsX protein appears identical to the conformation induced by the *Escherichia coli* RecA protein, J. Mol. Biol. 232 (1) (1993) 1–4.

31. **Xu J., Zhao L., Xu Y., et al.,** Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange, Nat. Struct. Mol. Biol. 24 (1) (2017) 40–46.

32. **Alekseev A., Pobegalov G., Morozova N., et al.,** A new insight into RecA filament regulation by RecX from the analysis of conformation-specific interactions, eLife. 11 (Jun 22) (2022) e78409.

33. **Prasad T. K., Yeykal C. C., Greene E. C.,** Visualizing the assembly of human Rad51 filaments on double-stranded DNA, J. Mol. Biol. 363 (3) (2006) 713–728.

34. **Kojima K., Juma K. M., Akagi S., et al.,** Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification, J. Biosci. Bioeng. 131 (2) (2021) 219–224.

35. **Short J. M., Liu Y., Chen S., et al.,** High-resolution structure of the presynaptic RAD51 filament on single-stranded DNA by electron cryo-microscopy, Nucleic Acids Res. 44 (19) (2016) 9017–9030.

36. **Mazin A. V., Zaitseva E., Sung P., Kowalczykowski S. C.,** Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing, EMBO J. 19 (5) (2000) 1148–1156.

37. **Kim S. H., Ragunathan K., Park J., et al.,** Cooperative conformational transitions keep RecA filament active during ATPase cycle, J. Am. Chem. Soc. 136 (42) (2014) 14796–14800.

38. **Brister J. R., Nossal N. G.,** Multiple origins of replication contribute to a discontinuous pattern of DNA synthesis across the T4 genome during infection, J. Mol. Biol. 368 (2) (2007) 336–348.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ГОНЧАРОВ Иван Дмитриевич – *лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
bing_fox.2001@inbox.ru

САДОВА Александра Игоревна – *лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии нуклеотид-связывающих белков Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
aleksa.sadova@yandex.ru

НУЖИН Илья Мулложонович – *студент Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
ilia.nuzhin@yandex.ru

ТЕНИЦКАЯ Полина Алексеевна – *студентка Института биомедицинских систем и биотехнологий Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
89818372011@mail.ru

КУРДЮМОВА Инна Викторовна – *инженер Центра коллективного пользования «Аналитический центр нано- и биотехнологий» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
tyzik03@gmail.com

ГОРЬКОВСКАЯ Александра Андреевна – *лаборант-исследователь лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
alexgorkovskaya@gmail.com

ХОДОРКОВСКИЙ Михаил Алексеевич – *кандидат физико-математических наук, директор Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
khodorkovskii@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0562-0156

АЛЕКСЕЕВ Александр Андреевич – *кандидат физико-математических наук, инженер-исследователь лаборатории молекулярной биологии нуклеотид-связывающих белков Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.*
195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
alex35093@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4371-265X

THE AUTHORS

GONCHAROV Ivan D.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
bing_fox.2001@inbox.ru

SADOVA Aleksandra I.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
aleksa.sadova@yandex.ru

NUZHIN Ilia M.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
ilia.nuzhin@yandex.ru

TENITSKAYA Polina A.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
89818372011@mail.ru

KURDYUMOVA Inna V.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
tyzik03@gmail.com

GORKOVSKAIA Aleksandra A.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
alexgorkovskaya@gmail.com

KHODORKOVSKIY Mikhail A.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
khodorkovskii@gmail.com
ORCID: 0000-0003-0562-0156

ALEKSEEV Aleksandr A.
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University
29 Politechnicheskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia
alex35093@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4371-265X

Статья поступила в редакцию 10.02.2026. Одобрена после рецензирования 02.03.2026. Принята 02.03.2026.
Received 10.02.2026. Approved after reviewing 02.03.2026. Accepted 02.03.2026.

© Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 2026