

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

На правах рукописи

Побегалов Георгий Евгеньевич



ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК С БЕЛКАМИ И
ИНТЕРКАЛИРУЮЩИМИ КРАСИТЕЛЯМИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ НА
ОДНОМОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА

03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
к.ф.-м.н. Ходорковский Михаил Алексеевич

Санкт-Петербург – 2015

Оглавление

Введение.....	4
Глава I. Одномолекулярные методы исследования ДНК. Создание экспериментальной установки.....	9
1.1 ДНК.....	9
1.2 Одномолекулярные методы исследования ДНК.....	14
1.2.1. Tethered-particle motion (TPM).....	15
1.2.2. Метод магнитного захвата.....	17
1.2.3. Метод акустической силовой спектроскопии (Acoustic force spectroscopy, AFS).....	18
1.2.4. Атомно-силовая микроскопия (АСМ).....	19
1.2.5. Флуоресцентная микроскопия.....	21
1.2.6. Метод оптического захвата.....	23
1.2.6.1. Физический принцип.....	24
1.2.6.2. Измерение сил.....	28
1.2.6.3. Экспериментальные схемы использования метода оптического захвата для одномолекулярных исследований ДНК.....	28
1.3 Материалы и методы.....	32
1.3.1 Модернизация установки “Лазерный пинцет”.....	33
1.3.2 Реализация комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии.....	40
1.3.3. Определение положения объекта в оптической ловушке.....	42
1.3.4 Четырехканальная проточная камера для проведения одномолекулярных экспериментов.....	46
1.3.5 Приготовление модифицированных ДНК субстратов.....	50
Глава II. Особенности взаимодействия ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed...	53
2.1. Интеркалирующие красители ДНК.....	53
2.1.1. ДНК интеркаляторы.....	54
2.1.2. YOYO-1.....	56
2.1.3. GelRed.....	57

2.2 Исследование взаимодействия YOYO-1 с ДНК	58
2.2.1. Подготовка проточной камеры	59
2.2.2. Приготовление и подача растворов.....	59
2.2.3. Протокол проведения эксперимента по манипуляции одиночными молекулами ДНК, окрашенными YOYO-1.....	61
2.2.4. Динамика изменения длины ДНК при взаимодействии с YOYO-1	66
2.3. Исследование взаимодействия GelRed с ДНК.....	69
2.4. Заключение по результатам исследований взаимодействия красителей YOYO-1 и GelRed с ДНК	72
Глава III. Особенности взаимодействия ДНК с белком TIR49a.....	74
3.1 Обзор литературы по белку TIR49a.....	74
3.2. Взаимодействия ДНК с TIR49a.....	78
3.2.1. Протокол экспрессии, выделения и очистки белка TIR49a	78
3.2.2. Исследование взаимодействия ДНК с TIR49a	81
Глава IV. Особенности взаимодействия белка RecA с ДНК	86
4.1. Обзор литературы по белку RecA	86
4.1.1. Гомологическая рекомбинация.....	87
4.1.2. RecA	89
4.1.3. Одномолекулярные исследования гомологической рекомбинации.....	92
4.2. Влияние белка RecX (<i>E. coli</i>) на динамику взаимодействия ДНК с RecA (<i>E. coli</i>)	93
4.2.1. Калибровка жесткости оптической ловушки	95
4.2.2. Исследование влияния белка RecX (<i>E. coli</i>) на динамику взаимодействия ДНК с RecA (<i>E. coli</i>)	99
4.3. Взаимодействие ДНК с RecA (<i>D.radiodurans</i>)	104
4.3.1. Исследование взаимодействия ДНК с RecA (<i>D.radiodurans</i>).....	106
Заключение.....	113
Список публикаций по теме диссертации	114
Список литературы.....	117

Введение

Актуальность проблемы.

Взаимодействие ДНК с белками и другими молекулами является одним из важнейших аспектов жизнедеятельности всех организмов. Внутри клетки ДНК постоянно участвует в целом ансамбле процессов, в ходе которых зачастую происходит изменение ее механических свойств. Значительная часть знаний о структурных и механических аспектах метаболизма ДНК была сформирована благодаря исследованиям, проводимым при помощи биохимических и биофизических методов, анализирующих совокупность большого числа молекул. Такой подход имеет несколько ограничений, в первую очередь связанных со стохастичностью и неоднородностью действия белков. Усреднение по ансамблю из тысяч и миллионов частиц также осложняет изучение динамики протекающих процессов.

Развитие одномолекулярных методов исследования позволило обойти вышеуказанные ограничения, так как такие методы позволяют изучать свойства индивидуальных молекул, а также получать данные о динамике их изменения в реальном времени, исключая усреднение. В связи с этим, одномолекулярные методы исследований, активно развивающиеся на протяжении последних 10-20 лет, стали важным инструментом в изучении структурных и механических аспектов ДНК-белковых взаимодействий и взаимодействий ДНК с веществами небелковой природы, а также при исследовании динамики протекания данных процессов.

Одним из наиболее перспективных методов исследования ДНК и ДНК-белковых взаимодействий на уровне одиночных молекул является метод оптического захвата, который позволяет осуществлять манипуляцию микроскопическими объектами в водном растворе, а также измерять силы, приложенные к манипулируемым объектам в широком диапазоне (от сотен фемтоньютон до десятков и сотен пиконьютонов). В данный диапазон попадают силы, развиваемые молекулярными моторами, представляющими собой отдельные биологические

молекулы (например, ДНК-полимераза), а также силы, приложение которых приводит к изменению структурных свойств отдельных молекул нуклеиновых кислот (например, разрушение вторичной структуры ДНК).

В ходе данной работы была создана экспериментальная установка, позволяющая проводить эксперименты с использованием двух независимых оптических ловушек в микрофлюидной камере в комбинации с методом флуоресцентной микроскопии. Были разработаны экспериментальные протоколы манипуляции одиночными молекулами ДНК, их флуоресцентной визуализации, а также исследования механических свойств манипулируемых молекул. Разработанные протоколы и созданная экспериментальная установка были использованы для изучения особенностей взаимодействия одиночных молекул ДНК с белками и интеркалирующими красителями.

В ходе работы впервые было охарактеризовано влияние на механические свойства ДНК нового перспективного красителя ДНК GelRed, который был разработан для замены высокотоксичного бромистого этидия, широко использующегося для флуоресцентного окрашивания ДНК. Полученные данные свидетельствуют об интеркалирующих свойствах данного красителя.

При помощи разработанного одномолекулярного подхода впервые был визуализирован процесс взаимодействия человеческого белка TP49a с ДНК. Белок TP49a участвует в целом спектре клеточных процессов и является необходимым для жизнедеятельности эукариот. В частности, TP49a входит в состав белковых комплексов, осуществляющих АТФ-зависимое ремоделирование хроматина. Нарушение биологической активности TP49a приводит к появлению различного типа злокачественных новообразований. Однако механизмы действия TP49a в значительной степени остаются неизвестными. В связи с этим получение новых данных о взаимодействии TP49a с ДНК представляются актуальным, с точки зрения понимания механизмов действия данного белка. Полученные данные также свидетельствуют о том, что разработанный одномолекулярный подход может быть использован для дальнейшего исследования взаимодействия TP49a с ДНК, например, при использовании мутантных форм белка, а также при

исследовании влияния различных кофакторов на данный процесс.

В ходе работы были проведены одномолекулярные исследования взаимодействия белка RecA с ДНК, а также регулирования ДНК-связывающей активности RecA белком RecX. RecA является центральным ферментом гомологической рекомбинации – процесса, в ходе которого осуществляется точное восстановление двунитевых разрывов ДНК. Появление таких разрывов представляет серьезную угрозу жизнедеятельности организмов. За последние 10 лет различные аспекты взаимодействия RecA (*E.coli*) с ДНК были хорошо изучены, в том числе и с помощью одномолекулярных методов. Однако регулирование ДНК-связывающей активности RecA белком RecX до сих пор не было охарактеризовано на одномолекулярном уровне. В связи с этим исследование влияния RecX на стабильность ДНК-белковых филаментов RecA, проводимое в данной работе на одномолекулярном уровне, является актуальным и позволяет дополнить представления о механизмах регуляции активности RecA посредством RecX.

В ходе работы также были впервые охарактеризованы механические свойства филаментов днДНК-RecA (*D.radiodurans*), а также проведено прямое сравнение со свойствами филаментов днДНК-RecA (*E.coli*). *D.radiodurans* - представляет собой бактерию, способную выживать при экстремальных дозах ионизирующего излучения, которое вызывает множественные повреждения ДНК. *D.radiodurans* обладает особо эффективной системой репарации ДНК, в частности за счет действия белка RecA. В отличие от RecA (*E.coli*), белок RecA (*D.radiodurans*) является в значительной степени менее охарактеризованным. В связи с этим, изучение RecA (*D.radiodurans*) и его взаимодействия с ДНК является важным для понимания природы экстраординарной устойчивости *D.radiodurans* к облучению.

Цель работы: выявление особенностей взаимодействия ДНК с белками TIP49a (человека), RecA (*E.coli*), RecA (*D.radiodurans*) и красителями YOYO-1, GelRed на одномолекулярном уровне методом оптического захвата.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи:**

1. Разработка и создание экспериментальной установки, включающей:

- оптическую схему для формирования двух независимых оптических ловушек на базе уникальной установки УНУ «Лазерный пинцет»;

- конструкцию четырехканальной микрофлюидной камеры, обеспечивающей проведение одномолекулярных исследований.

2. Разработка протоколов проведения исследования взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами с использованием созданной экспериментальной установки.

3. Исследование влияния красителей YOYO-1 и GelRed на механические свойства ДНК.

4. Изучение процесса взаимодействия белка TIR49a с ДНК с использованием комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии.

5. Исследование влияния белка RecX (*E.coli*) на процесс взаимодействия RecA (*E.coli*) с ДНК.

6. Изучение динамики формирования и характеристика механических свойств ДНК-белковых филаментов RecA (*D.radiodurans*).

Научная новизна и практическая ценность работы.

Результаты, изложенные в данной работе, получены впервые и носят фундаментальный характер. Выявлено влияние красителя GelRed на механические свойства ДНК, на основании которого сделано заключение об интеркалирующих свойствах данного красителя. Впервые визуализирован процесс взаимодействия белка TIR49a с одиночными молекулами ДНК и показано отсутствие его специфичности к последовательности ДНК. Впервые измерена динамика разборки филамента днДНК-RecA (*E.coli*) в присутствии RecX (*E.coli*) на одномолекулярном уровне, которая свидетельствует о кооперативности данного процесса. Также, впервые охарактеризованы механические свойства филаментов днДНК-RecA (*D.radiodurans*), которые подтверждают модель, в рамках которой RecA (*D.radiodurans*) взаимодействует с днДНК путем формирования более частых и менее протяженных филаментов по сравнению с RecA (*E.coli*).

В ходе работы была создана экспериментальная установка и разработаны

протоколы, которые позволяют проводить экспериментальные исследования на одномолекулярном уровне с использованием метода оптического захвата, а также в его комбинации с методом флуоресцентной микроскопии. Разработанный подход позволяет получать новые уникальные данные о процессах взаимодействия ДНК с различными ДНК-связывающими агентами.

Положения, выносимые на защиту.

1. Созданная экспериментальная установка и разработанные протоколы позволяют проводить экспериментальные исследования процессов взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами на одномолекулярном уровне.
2. Данные о взаимодействии GelRed с ДНК свидетельствуют об интеркалирующих свойствах красителя.
3. Белок TP49a способен образовывать ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК.
4. Белок RecX (*E.coli*) стимулирует кооперативную разборку филамента днДНК-RecA (*E.coli*).
5. Данные одномолекулярных исследований подтверждают модель взаимодействия RecA (*D.radiodurans*) с днДНК путем формирования более частых и менее протяженных филаментов по сравнению с RecA (*E.coli*).

Апробация работы и публикации.

Публикации и апробация работы. Материалы работы докладывались на ряде международных и всероссийских конференций. По результатам исследований опубликованы 2 статьи в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и включает: введение, четыре главы, заключение и список цитируемой литературы (201 источников). Работа содержит 46 иллюстраций.

Глава I. Одномолекулярные методы исследования ДНК. Создание экспериментальной установки.

1.1 ДНК.

Дезоксирибонуклеиновая кислота, или ДНК, несет в себе генетический код, который определяет развитие и функционирование всех живых организмов – бактерий, растений, животных, и передается от поколения к поколению во время деления клеток и при размножении организмов. В 1953 году Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик, используя данные, полученные Розалинд Франклин, определили структуру ДНК. Это открытие существенно повлияло на развитие молекулярной биологии и биологии в целом.

Уотсон и Крик установили, что ДНК существует в форме двойной спирали: две нити ДНК закручены друг относительно друга в правозакрученную спираль. Каждая нить (или цепь) ДНК представляет собой полимер, мономерами которого являются нуклеотиды. Каждый нуклеотид содержит три функциональные группы – сахар, фосфатную группу и азотистое основание (Рис.1.1).

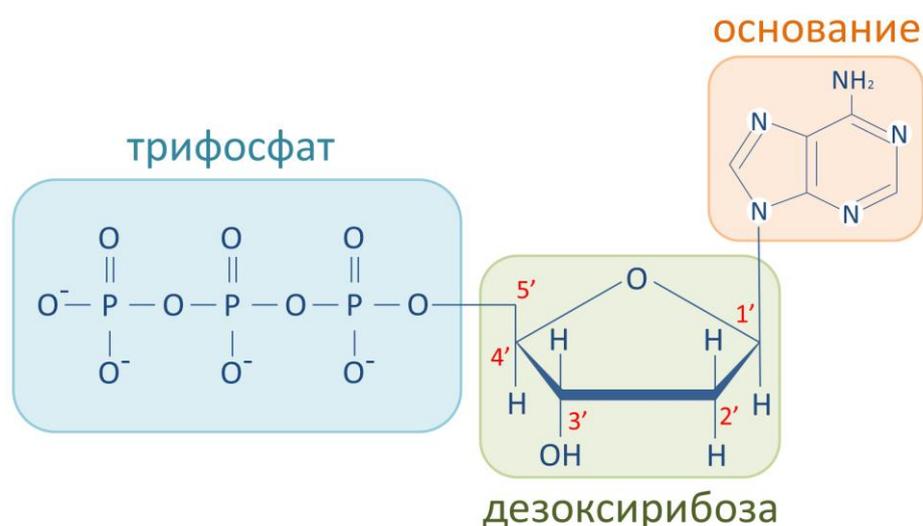


Рис.1.1. Структура дезоксирибонуклеотида.

Сахар, содержащийся в ДНК, представляет собой пятичленное кольцо дезоксирибозы – вариант рибозы с отсутствующей гидроксильной (-ОН) группой

в позиции 2'. Фосфатная группа нуклеотида связана с атомом углерода в позиции 5'. Свободные, не встроенные в ДНК нуклеотиды обычно существуют в форме трифосфата, то есть содержат цепочку из трех фосфатов. Однако при встраивании в цепь ДНК происходит отщепление двух фосфатов, и в составе ДНК нуклеотиды содержат лишь один фосфат. В клетке, как и в водном растворе, фосфатные группы имеют отрицательный заряд.

В цепи ДНК нуклеотиды соединены за счет фосфодиэфирной связи, которая представляет собой ковалентную связь, сформированную между 5' фосфатной группой одного нуклеотида и 3' гидроксильной группой другого (рис.1.2). Таким образом, каждая нить ДНК имеет так называемый сахаро-фосфатный остов – чередующуюся последовательность фосфат-сахар. Такая последовательность соединения нуклеотидов определяет направленность нити ДНК, так как ее концы различаются: 5' конец содержит свободный фосфат, а на 3' конце находится свободная гидроксильная (-ОН) группа.

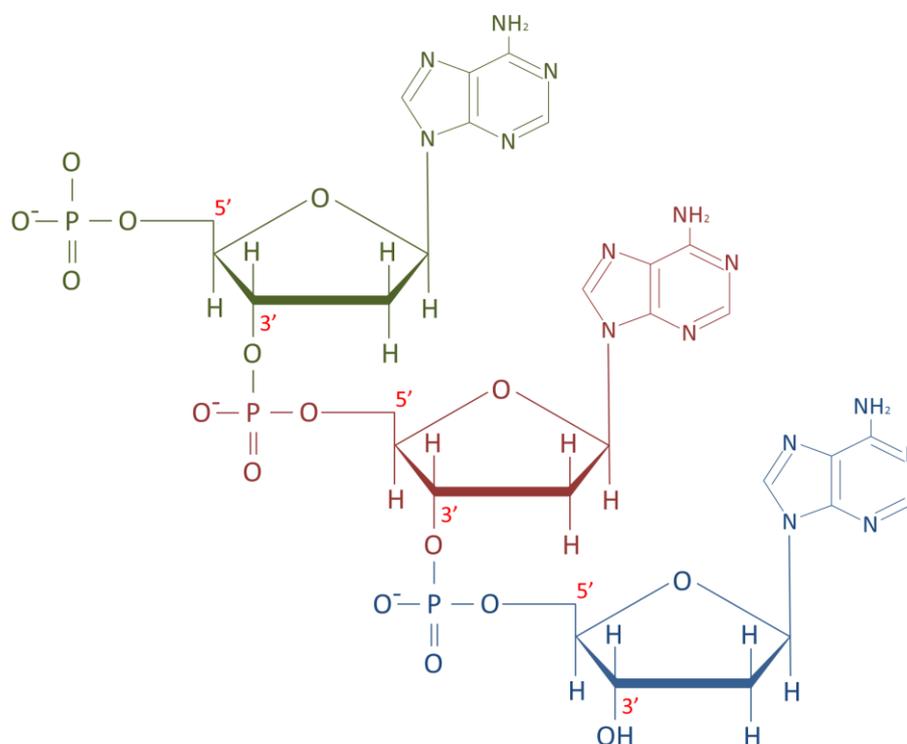


Рис.1.2. Связь нуклеотидов в цепи ДНК.

Все нуклеотиды имеют в своем составе идентичные сахарные и фосфатные

группы, однако различаются по типу азотистого основания, которое связано с атомом углерода в позиции 1'. Существуют четыре нуклеотида, которые могут быть встроены в ДНК, и соответственно четыре различных азотистых основания – Аденин (А), Гуанин (G), Цитозин (С), Тимин (Т). Азотистые основания различают по структуре (рис.1.3): Аденин и Гуанин имеют два ароматических кольца, и их относят к пуринам, Цитозин и Тимин, содержащие одно ароматическое кольцо, относят к пиримидинам.

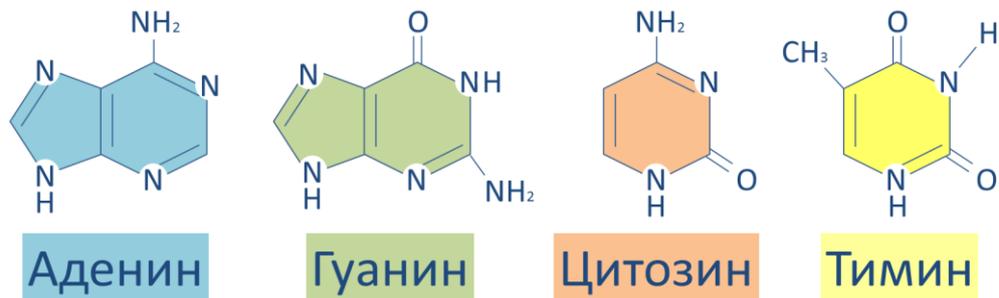


Рис. 1.3. Азотистые основания входящие в состав ДНК.

Азотистые основания гидрофобны и плохо растворимы в воде, однако, способны взаимодействовать друг с другом за счет образования водородных связей, причем такие взаимодействия являются специфическими: G образует пару с С, а Т с А. При этом взаимодействие G-С является более сильным, так как в этом случае образуются три водородные связи, тогда как при взаимодействии А-Т образуются только лишь две водородные связи. Специфические взаимодействия между комплементарными основаниями позволяют двум нитям ДНК сформировать двойную спираль.

Стабильность двойной спирали ДНК определяется точным балансом различных взаимодействий (рис.1.4Б). Основания расположены перпендикулярно сахаро-фосфатному остову и направлены к центру двойной спирали, образуя водородные связи с комплементарными основаниями второй нити ДНК, удерживая две нити вместе. Гидрофобное взаимодействие соседних пар оснований (так называемое стэкинг взаимодействие) также стабилизирует двойную спираль. В свою очередь, отрицательно заряженные фосфатные группы

соседних цепей за счет электростатического отталкивания стремятся занять наиболее удаленное друг от друга положение и находятся на внешней стороне двойной спирали. Такое расположение гидрофобных пар оснований в центре молекулы и гидрофильных фосфатных групп снаружи способствует растворимости ДНК в физиологических условиях клетки, так как водная среда клетки является полярной.

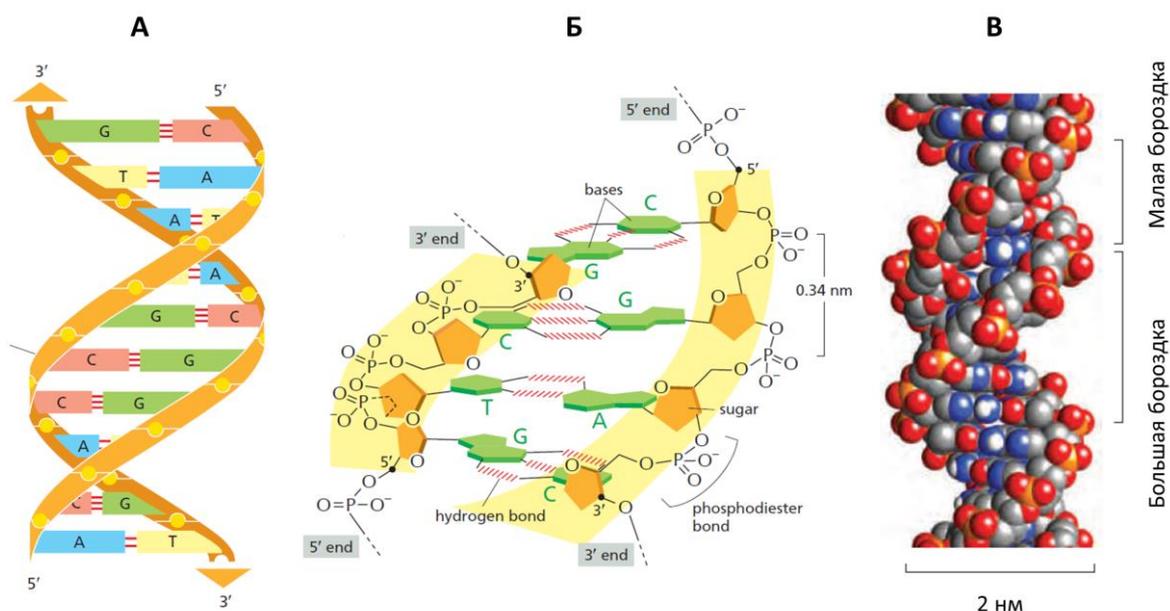


Рис. 1.4. Структура молекулы ДНК .

За счет того, что в каждой паре комплементарных оснований присутствуют и пурин, и пиримидин, образуя три ароматических кольца, размер пар оснований ДНК остается неизменным, и диаметр спирали ДНК составляет около 2 нанометров. Наиболее распространенной в природе формой двойной спирали ДНК является В-форма (Рис.1.4В). На один виток спирали ДНК В-формы приходится 10,5 пар оснований. Длина такого витка составляет 35,7 ангстрем, и соответственно расстояние между соседними парами оснований составляет всего 0,34 нанометра. Важной особенностью структуры двойной спирали ДНК является наличие чередующихся бороздок - большой и малой. В зависимости от того, где расположены основания - в малой бороздке или большой бороздке, варьируется их доступность к взаимодействию с другими молекулами, например с белками

или красителями.

Существенной особенностью структуры ДНК также является противоположная направленность двух нитей, то есть 5' конец одной нити соответствует 3' концу другой (Рис.1.4А). Таким образом, последовательность, в которой расположены основания на одной нити ДНК, строго определяет последовательность оснований второй нити. Такая структура ДНК позволяет осуществлять передачу наследственной информации от материнской клетки к дочерней: при делении клетки в процессе репликации происходит расплетание ДНК, и каждая из нитей достраивается до двунитевой формы путем последовательного присоединения соответствующих комплементарных нуклеотидов.

В процессе репликации, как и во многих других клеточных процессах, ДНК взаимодействует с различными белками и другими молекулами. Такие взаимодействия зачастую приводят к изменению свойств ДНК. Одномолекулярные биофизические методы, получившие значительное развитие в последнее десятилетие, превосходно подходят для наблюдения за единичными молекулами ДНК, а также характеристики свойств ДНК и их изменений при взаимодействии с различными агентами. В следующей части литературного обзора будут рассмотрены одномолекулярные методы исследования ДНК.

1.2 Одномолекулярные методы исследования ДНК.

Внутри клетки ДНК постоянно участвует в целом ансамбле процессов, в ходе которых она подвергается взаимодействию с различными белками. Белки взаимодействуют с ДНК для реализации целого спектра задач. Некоторые задачи, например, такие как поиск поврежденного основания, промоторной последовательности или сайта рестрикции (места специфического разрезания молекулы ДНК) требуют взаимодействия с определенной последовательностью пар оснований ДНК, т.е. являются специфическими по последовательности ДНК. Другие, например, такие как защита одностранных участков ДНК или репликация, не требуют наличия определенной последовательности нуклеотидов. В процессе жизнедеятельности клетки эти задачи должны выполняться эффективно, за определенный промежуток времени и без ошибок. Зачастую для этого требуется действие сразу нескольких белков или белковых комплексов.

При взаимодействии с белками могут происходить локальные структурные изменения молекулы ДНК и изменения ее механических свойств. Вещества небелковой природы, способные реагировать с ДНК, например, ДНК-интеркаляторы, также зачастую изменяют свойства ДНК и тем самым могут оказывать влияние на те или иные клеточные процессы. В связи с этим данные о структуре и механических свойствах ДНК, а также изменении таких свойств при взаимодействии с различными агентами представляют особый интерес при изучении сложных процессов клеточного метаболизма ДНК.

Значительная часть знаний о структурных и механических аспектах метаболизма ДНК была сформирована благодаря исследованиям, проводимым при помощи биохимических и биофизических методов, анализирующих совокупность большого числа молекул. Такой подход имеет несколько ограничений, в первую очередь связанных со стохастичностью и неоднородностью действия белков. Усреднение по ансамблю из тысяч и миллионов частиц также осложняет изучение динамики протекающих процессов, т.к. это зачастую требует синхронизации действия белков, что представляется особо сложным при изучении

многостадийных и многокомпонентных реакций.

В то же время, развитие одномолекулярных методов исследований позволило обойти вышеуказанные ограничения. Появилась возможность получать данные о динамике действия индивидуальных молекул в реальном времени, исключая усреднение. В связи с этим, одномолекулярные методы исследований, активно развивающиеся на протяжении последних 20 лет, стали важным инструментом в изучении структурных и механических аспектов, а также динамики ДНК-белковых взаимодействий и взаимодействий ДНК с веществами небелковой природы. В данной главе будет приведен краткий обзор современных одномолекулярных методов исследования ДНК, которые можно разделить на два типа: одни позволяют наблюдать одиночные молекулы и происходящие с ними процессы, другие позволяют осуществлять активную манипуляцию биологическими молекулами, прикладывать к ним силы и измерять их отклик на механическое воздействие.

1.2.1. Tethered-particle motion (TPM).

При использовании данного метода один конец молекулы ДНК специфически прикрепляется к поверхности стекла, а второй - к микросфере диаметром от сотен нанометров до нескольких микрометров (Рис.1.5). Изображения микросфер регистрируются при помощи ПЗС или КМОП камеры и подвергаются компьютерной обработке для вычисления положения каждой микросферы. За счет того, что микросферы “привязаны” к поверхности стекла, их броуновское движение оказывается ограниченным. Размер окрестности, в рамках которой может колебаться микросфера, зависит от длины ДНК, а также от ее эластичности. Таким образом, анализируя движение микросферы, можно извлечь информацию о механических свойствах молекулы ДНК, прикрепленной к ней. Одним из преимуществ метода TPM является возможность одновременного наблюдения за десятками и даже сотнями одиночных молекул. Другим важным преимуществом данного метода является его относительная простота. Для

реализации метода ТРМ достаточно наличия простейшего варианта микрофлюидной камеры и светового микроскопа с возможностью регистрации изображений.

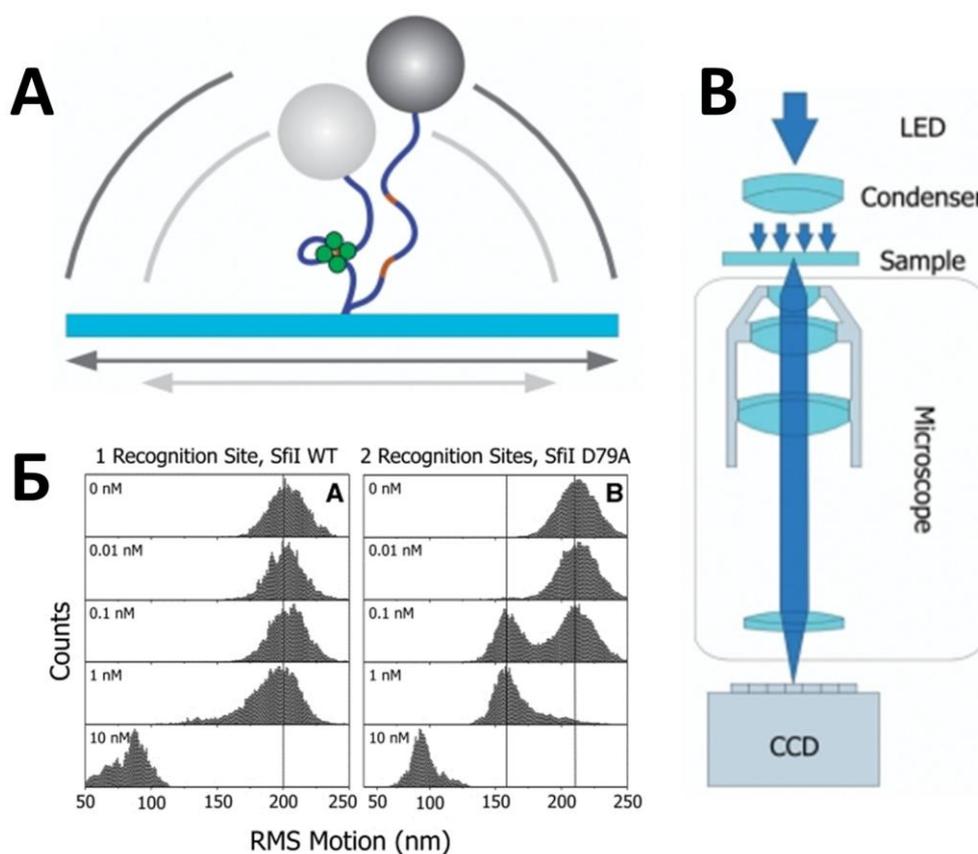


Рис.1.5. Метод ТРМ. А) Молекула ДНК закреплена одним концом на поверхности стекла и другим к концом на микросфере. Область, в рамках которой может колебаться микросфера, зависит от длины ДНК. Б) Изменение радиуса окрестности колебаний микросферы при выпетливание ДНК под действием рестриктазы SfiI. В) Оптическая схема экспериментальной установки, реализующей метод ТРМ [99].

Одним из недостатков данного метода является близкий контакт ДНК и микросфер с поверхностью стекла, что может привести к неспецифическому взаимодействию ДНК и/или микросфер со стеклом и существенно осложнить интерпретацию результатов измерений. К другим недостаткам метода ТРМ стоит отнести отсутствие возможности прикладывать силу к микросферам и соответственно активно манипулировать молекулами ДНК, а также большая длительность измерений, так как для определения окрестности движения

микросферы необходимо набрать достаточно большое количество точек. Несмотря на перечисленные недостатки, метод ТРМ был успешно использован, например, при изучении зависимости эластических свойств ДНК от температуры [40] или при исследовании выпетливания ДНК под действием различных белков [100, 140, 183].

1.2.2. Метод магнитного захвата.

Схема эксперимента при использовании метода магнитного захвата аналогична методу ТРМ (Рис.1.6). Однако данный метод обладает существенно большими возможностями за счет использования в качестве микросфер, к которым прикрепляется ДНК, парамагнитных частиц. Приложение внешнего магнитного поля приводит к возникновению силы действующей на микросферы, за счет чего появляется возможность манипулировать одиночными молекулами ДНК.

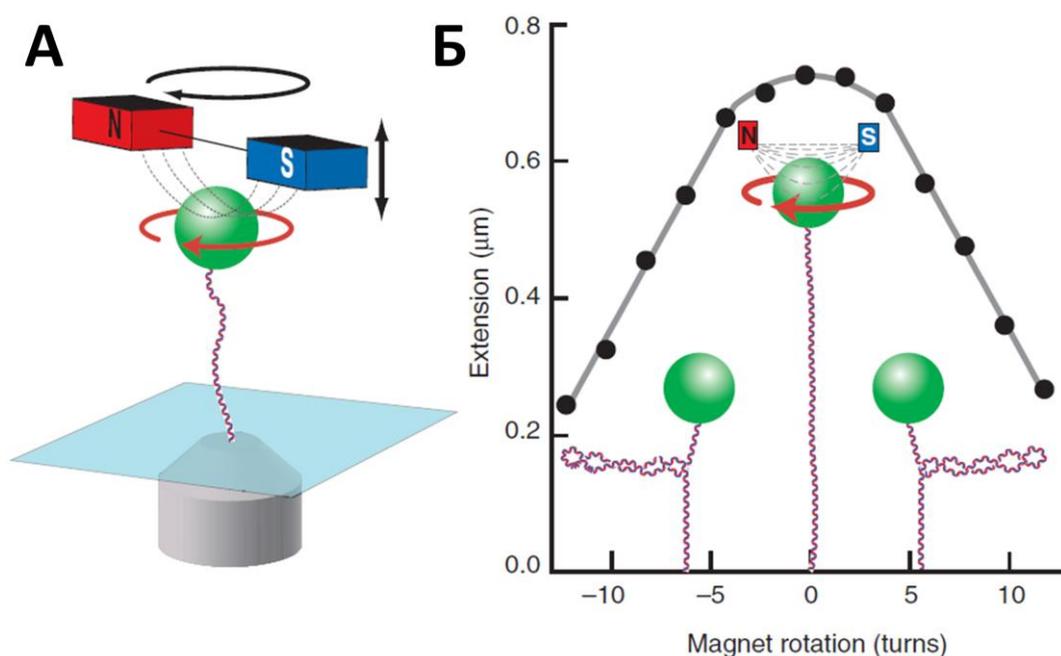


Рис.1.6. Метод магнитного захвата. А) Молекула ДНК прикреплена к магнитной микросфере, манипуляция которой осуществляется при приложении внешнего магнитного поля. Б) Изменение длины ДНК за счет скручивания при

вращении магнитной микросферы [125].

Приложение внешнего магнитного поля реализуется за счет размещения постоянных магнитов или электромагнитов вблизи образца, наблюдение за которым осуществляется при помощи инвертированного светового микроскопа. Изменение силы действующей на микросферы достигается за счет механического перемещения магнитов относительно образца или за счет изменения тока, проходящего через электромагнит. Отличительной особенностью данного метода является возможность осуществлять поворот микросферы путем вращения внешнего магнитного поля, что позволило успешно применить метод магнитного захвата для изучения сверхспирализации ДНК [18, 168], а также различных ДНК-связывающих белков, в частности топоизомераз [58, 169].

1.2.3. Метод акустической силовой спектроскопии (Acoustic force spectroscopy, AFS).

Метод AFS является наиболее новым среди одномолекулярных методов исследования ДНК. Впервые данный метод был представлен в конце 2014 года [160]. Как и в случае метода магнитного захвата молекулы ДНК закрепляются между поверхностью стекла и микросферами. Однако, в данном случае сила действующая на микросферы, имеет акустическую природу. Эксперимент проводится с использованием специального микрофлюидного чипа со встроенным пьезо-элементом, который возбуждает стоячую плоскую акустическую волну внутри чипа. Взаимодействие акустической волны и микросферы приводит к возникновению силы, действующей на микросферу. Величина данной силы зависит от размера микросферы, частоты акустической волны и ее амплитуды, которая в свою очередь зависит от напряжения, подающегося на пьезо-элемент. В зависимости от частоты так же можно изменять направление действия силы. Преимуществом метода AFS по сравнению с методом магнитного захвата является скорость, с которой возможно осуществлять изменение силы. В случае метода магнитного захвата изменение силы осуществляется путем перемещения магнитов

относительно экспериментальной камеры, тогда как величину силы при использовании метода AFS определяет напряжение на пьезо-элементе, скорость изменения которого существенно превышает скорость механического перемещения магнитов.

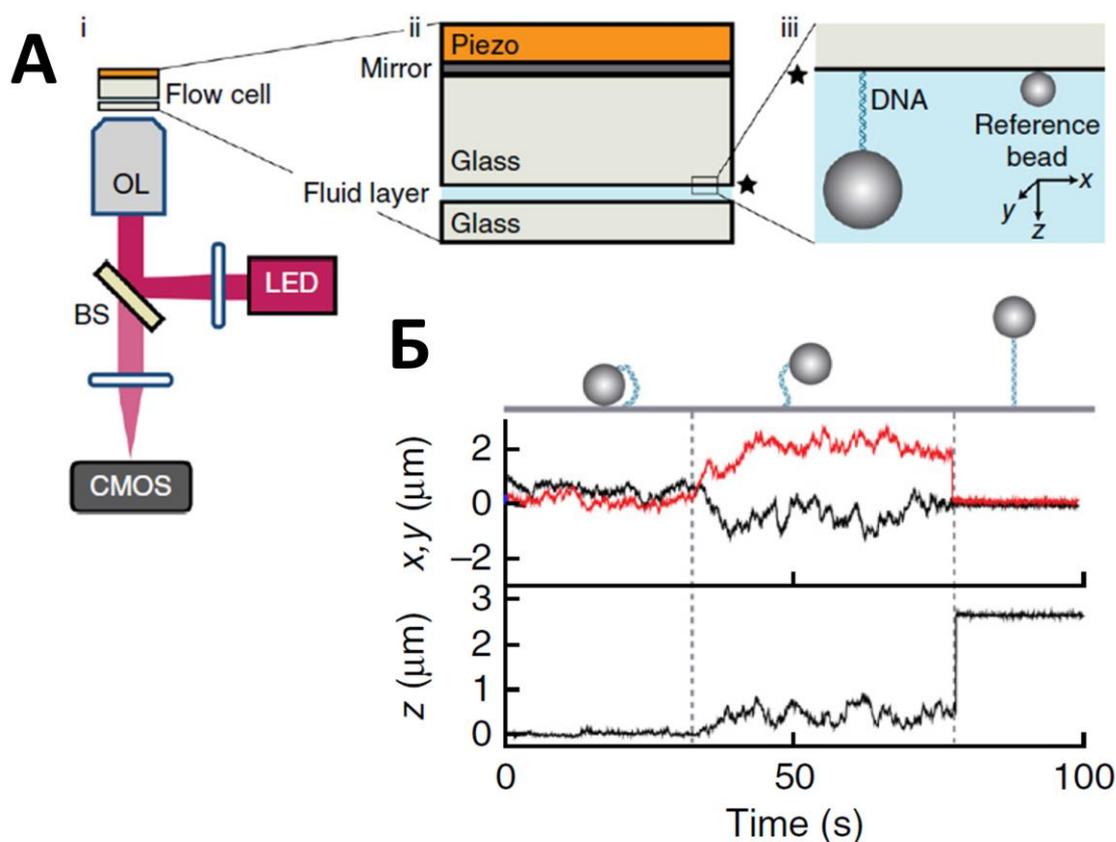


Рис.1.6. Метод AFS. А) Схема экспериментальной установки и микрофлюидного чипа с пьезо-элементом. Б) X,Y,Z – положения микросферы: при генерации акустической волны с частотой 9 МГц, толкающей микросферу к поверхности стекла (начальный участок графика); в отсутствии акустической волны (средний участок); при генерации акустической волны с частотой 6,7 МГц, толкающей микросферу от поверхности стекла (конечный участок) [160].

1.2.4. Атомно-силовая микроскопия (АСМ).

Метод АСМ является одним из наиболее популярных одномолекулярных методов. В его основе лежит использование очень тонкого зонда, что позволяет с

высоким разрешением получить топографическое изображение поверхности образца, на котором, например, могут быть зафиксированы молекулы ДНК или ДНК-белковые комплексы (Рис.1.7.А). Достижение субнанометрового разрешения по оси Z при использовании данного метода позволяет визуализировать структуры, наблюдение за которыми невозможно при использовании светового микроскопа, например, отдельные белковые комплексы [172], различные формы ДНК [110], а также различные структуры, образуемые из молекул ДНК [98, 189] и ДНК-белковые комплексы [62, 151]. Развитие метода привело к появлению возможности изучать не только статические объекты, но так же на одномолекулярном уровне наблюдать динамику биологических процессов, например таких, как развертывание нуклеосомной ДНК [118] или транслокация белков вдоль ДНК в поисках специфического сайта связывания [57] (Рис.1.7.Б).

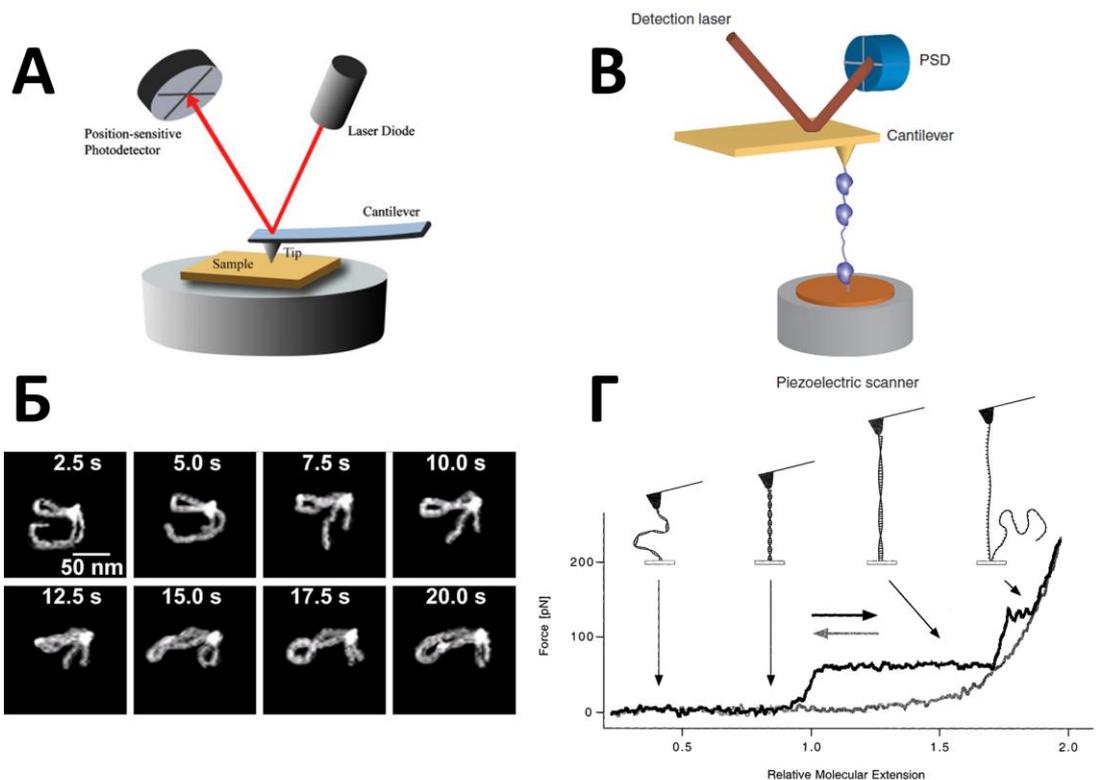


Рис.1.7. Атомно-силовая микроскопия. А) Принцип работы атомно-силового микроскопа: взаимодействие зонда с локальным топографическим изменением при сканировании образца приводит к отклонению кантилевера, величина которого регистрируется при помощи позиционно-чувствительного

фотоприемника [109]. Б) Топографические изображения динамики транслокации EcoRII вдоль ДНК, полученные методом АСМ [57]. В) Схема применения АСМ для силовой спектроскопии биологических молекул [125]. Г) Измерение зависимости длины одиночной молекулы ДНК от силы натяжения при помощи метода АСМ [97].

Помимо визуализации объектов с высоким разрешением метод АСМ также используется для силовой спектроскопии биологических объектов (Рис.1.8.В). Так, например, аналогично прикреплению к микросфере, которое использовалось в описанных ранее одномолекулярных подходах, молекула ДНК может быть специфически закреплена на поверхности зонда (Рис.1.8.Г). Такое использование кантилевера атомно-силового микроскопа позволяет подвергать молекулы натяжению в большом диапазоне сил для изучения их механических свойств. Однако, за счет высокой жесткости кантилевера метод АСМ недостаточно точен при измерении малых сил - в области единиц пиконьютонов и меньше, в то время как данный диапазон соответствует энергии действия отдельных белков.

1.2.5. Флуоресцентная микроскопия.

Флуоресцентная микроскопия является одним из важнейших методов исследования биологических объектов. Данный метод применяется для решения широкого спектра задач, включая в первую очередь специфическую визуализацию различных структур в клетках (в том числе в живых клетках) и тканях. Преодоление дифракционного предела пространственного разрешения флуоресцентной микроскопии [13, 68, 148] в конце 20 – начале 21 века позволило существенно расширить сферы применения флуоресцентной микроскопии. Например, появилась возможность *in vivo* наблюдать динамику взаимодействия отдельных белков с ДНК внутри бактериальной клетки [166, 167]. Метод флуоресцентной микроскопии также применяется для *in vitro* визуализации ДНК-белковых взаимодействий на одномолекулярном уровне. Зачастую молекулы ДНК фиксируются на поверхности образца, и визуализация осуществляется при

помощи метода флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRFM) с использованием специфических красителей ДНК, а также флуоресцентно меченых белков. Из недавних разработок в области применения данного подхода в изучении ДНК-белковых взаимодействий следует отметить так называемый метод «ДНК-штор» (DNA curtains, Рис.1.9) [28], в рамках которого при помощи электронно-лучевой литографии в образце формируется регулярный массив одинаково ориентированных идентичных молекул ДНК, что существенно улучшает качество и количество получаемых данных. Несмотря на новизну, данный подход уже был успешно применен для исследования различных ДНК-белковых взаимодействий, например, таких как поиск специфических последовательностей ДНК различными ферментами или обмен гомологическими нитями ДНК в результате действия рекомбиназ [103, 164, 192].

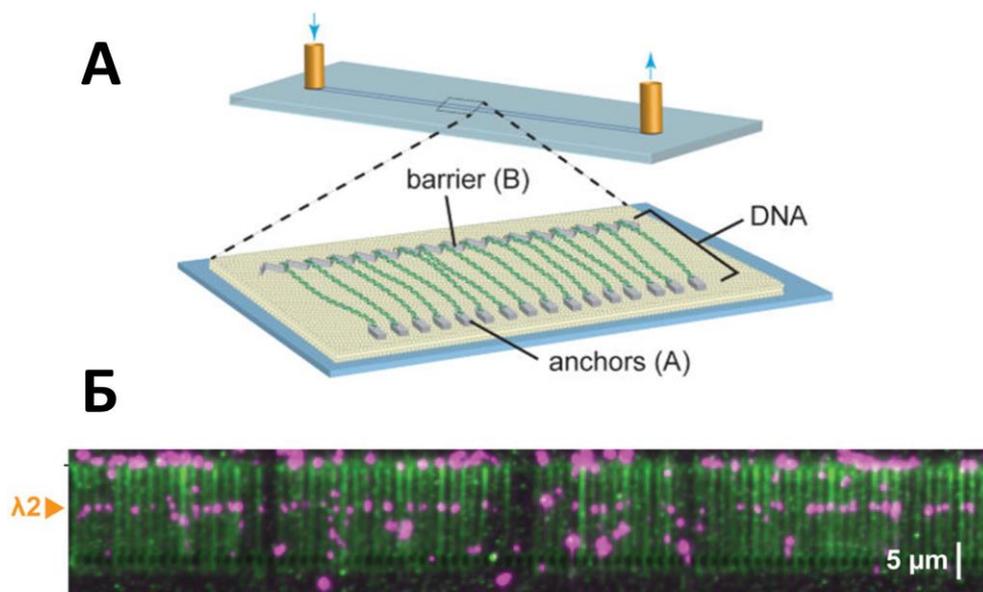


Рис.1.8. Метод ДНК-штор (DNA curtains). А) Схематическое изображение образца: молекулы ДНК закреплены на специальных площадках, сформированных при помощи электронно-лучевой литографии на поверхности стекла, покрытой липидным бислоем. Б) Флуоресцентное изображение молекул ДНК, окрашенных красителем YOYO-1, и связанных с ними белков Cas9, флуоресцентно меченных при помощи квантовых точек. В данном случае белки Cas9 системы CRISPR запрограммированы для связывания определенной

последовательности на ДНК, обозначенной $\lambda 2$ [164].

1.2.6. Метод оптического захвата.

В основе метода оптического захвата лежит эффект удержания микроскопических диэлектрических объектов при помощи сфокусированного лазерного пучка, впервые открытый Артуром Эшкиным. Эшкин изучал взаимодействие света с материей, воздействуя лазерным излучением на микроскопические пластиковые частицы в водном растворе. В 1970 году он опубликовал работу, в которой показал, что такие частицы втягиваются в область максимальной интенсивности, то есть центр лазерного пучка [4]. В той же работе Эшкин также продемонстрировал, что отражение лазерного излучения от частиц приводит к их выталкиванию в направлении распространения света. При помощи двух противоположно направленных лазерных пучков ему удалось компенсировать давление света на частицу, тем самым создав первую стабильную оптическую ловушку.

В 1986 году Артур Эшкин вместе со Стивеном Чу продемонстрировал современный вариант реализации оптического захвата частицы при помощи одного лазерного пучка [7]. Для формирования стабильной оптической ловушки в этом случае лазерный пучок был сфокусирован, что позволяло в области фокуса удерживать микроскопические объекты размером от десятков нанометров до десятков микрометров. Подобрал оптимальную мощность и длину волны для минимизации повреждений, индуцируемых лазерным излучением, в 1987 году Эшкин впервые применил оптический захват для манипуляции биологическими объектами [6, 8]. Стивен Чу, в последствии, применил метод оптического захвата для охлаждения атомов [26, 91], за что в 1997 году был удостоен Нобелевской премии по физике.

1.2.6.1. Физический принцип

Как и при использовании методов AFS и TPM, а также метода магнитного захвата, исследование биологических молекул при помощи метода оптического захвата осуществляется посредством их специфического прикрепления к микроскопическим объектам, которые выступают в роли «ручек» при помощи которых осуществляется манипуляция. Оптический захват микроскопического объекта происходит за счет передачи момента импульса от фотонов к объекту. При этом показатель преломления захватываемого объекта должен превышать показатель преломления среды, в которой он находится. Обычно для оптического захвата используются пластиковые или кварцевые микросферы, находящиеся в водном растворе. При попадании микросферы в область фокуса лазерного пучка, она оказывается в потенциальной яме (оптической ловушке). Небольшие отклонения микросферы от положения минимума потенциальной энергии (центра оптической ловушки) приводят к возникновению силы, стремящейся вернуть ее в исходное положение (рис.1.9.).

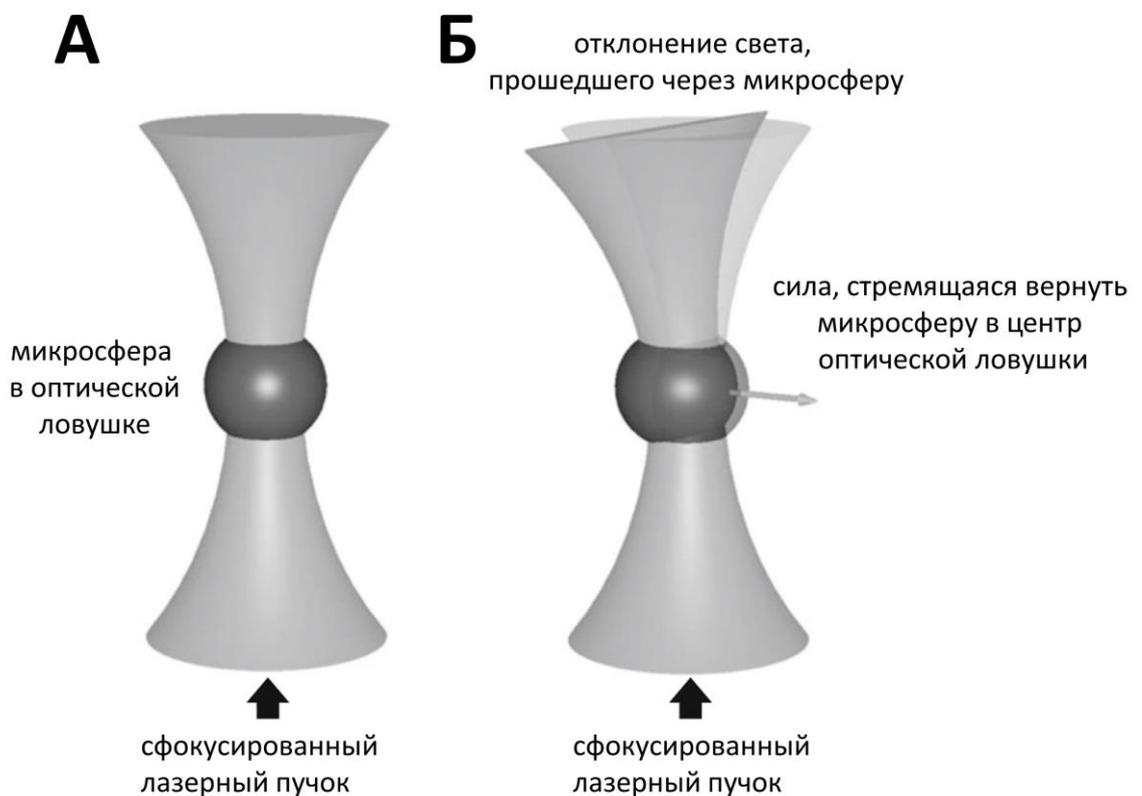


Рис. 1.9. Схематическое представление оптического захвата микросферы.

А) Микросфера втягивается в область фокуса лазерного пучка, попадая в потенциальную яму. Б) При небольшом смещении микросферы происходит отклонение света, прошедшего через нее, что приводит к возникновению силы, стремящейся вернуть микросферу в центр оптической ловушки [181].

В фокусе лазерного пучка микросфера испытывает две силы: рассеивающую силу, производимую фотонами, толкающими микросферу в направлении распространения света, и градиентную силу, возникающую вследствие наличия градиента интенсивности лазерного излучения, стремящуюся втянуть микросферу в область максимальной интенсивности. Для создания оптических ловушек преимущественно используется лазерный пучок, имеющий Гауссово распределение интенсивности, вследствие чего микросфера втягивается в центр пучка.

Корректное физическое объяснение оптического захвата зависит от соотношения размера захватываемого объекта и длины волны лазерного излучения. При диаметре микросферы, большем длины волны лазера, оптический захват принято рассматривать в приближении геометрической оптики. При работе с биологическими молекулами, например ДНК, преимущественно используют микросферы диаметром от одного до нескольких микрометров, тогда как в качестве источников света используются лазеры с длиной волны в ближнем инфракрасном диапазоне (800-1100 нм). В связи с этим, взаимодействие микросферы с лазерным лучом удобнее рассматривать в приближении геометрической оптики (рис.1.10).

В данном приближении природа сил, определяющих создание оптической ловушки, может быть объяснена за счет преломления лучей при их прохождении через микросферу, показатель преломления которой превышает показатель преломления среды [5]. Преломление света приводит к изменению моментов импульса фотонов, что по закону сохранения импульса, дает одинаковое по величине и противоположное по направлению изменение момента импульса микросферы. В случае, когда микросфера находится в центре лазерного пучка, лучи лазера преломляются на микросфере симметрично и результирующая сила

их воздействия равна нулю, то есть микросфера находится в состоянии равновесия. Смещение микросферы из фокуса Гауссова пучка приводит к отклонению общего направления лазерного пучка. При латеральном смещении микросферы (рис.1.10.А) лучи p_1 и p_2 , симметрично падающие на микросферу, имеют разную интенсивность. Изменения моментов импульса данных лучей (dp_1 и dp_2 , соответственно) различаются по величине, в результате чего возникает сила, действующая на микросферу в направлении большей интенсивности света. Отличная от нуля x -составляющая суммарного момента импульса (dp_x) приводит к возникновению силы, стремящейся сократить смещение микросферы и втягивающая ее в центр лазерного пучка. Сила, действующая на микросферу, при смещении из фокуса лазера, линейно пропорциональна интенсивности лазерного луча – чем больше фотонов диффрагируют на микросфере, тем большая сила ей передается.

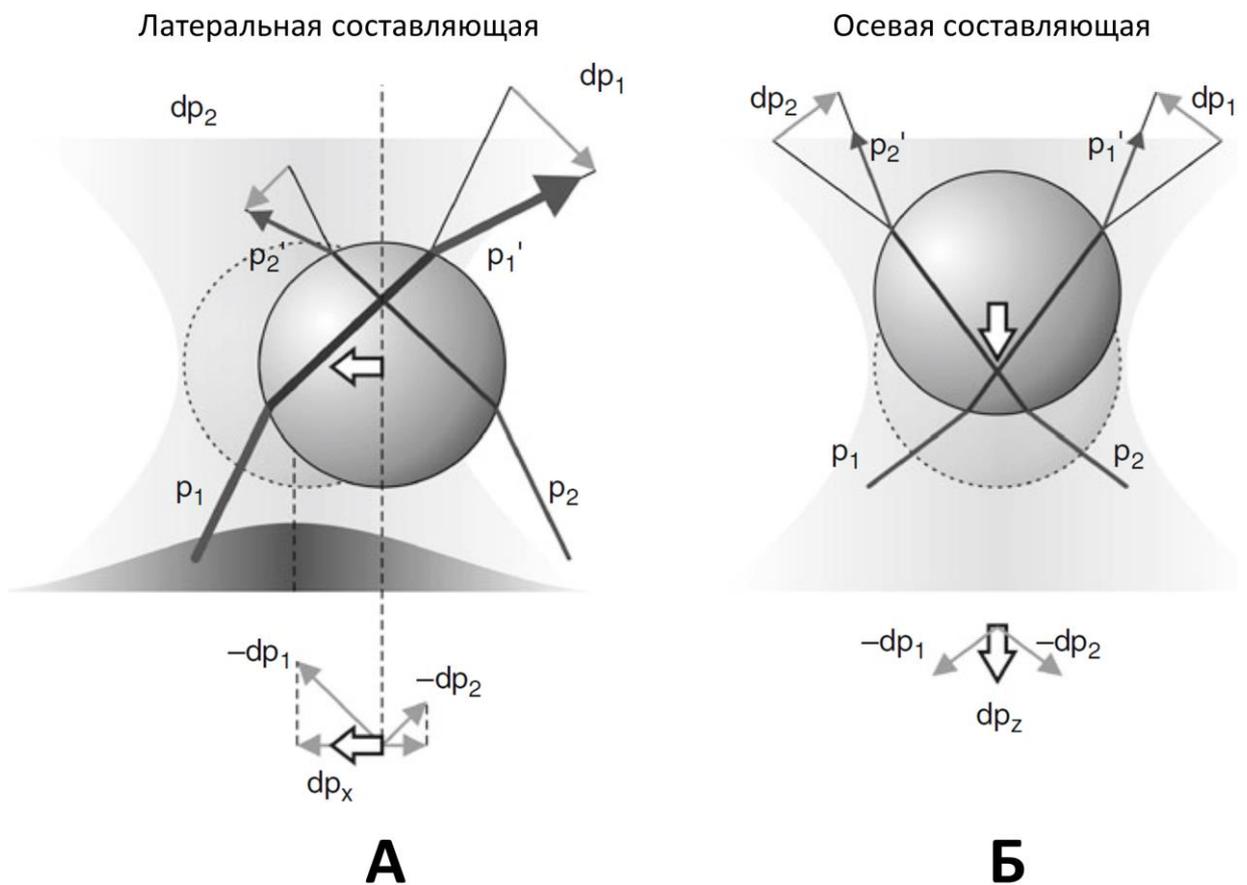


Рис. 1.10. Составляющие градиентной силы, действующей на микросферу

в фокусе лазерного пучка с Гауссовым распределением интенсивности. А) Латеральная составляющая при смещении микросферы вправо от центра оптической ловушки. Б) Осевая составляющая при смещении микросферы в направлении распространения света [181].

Смещение микросферы в направлении распространения света приводит к изменению сходимости лучей, прошедших через микросферу (рис.1.10.Б). Изменение направления лучей p_1 и p_2 вызывает изменение суммарного момента импульса микросферы (dp_z), что также приводит к возникновению силы, стремящейся вернуть микросферу в фокус лазерного пучка. Не весь свет преломляется на частице, часть его отражается назад. Сила, связанная с этим явлением, рассеивающая сила, толкает объекты из фокуса лазера в направлении распространения света. Для того, чтобы был возможен захват микросферы в оптической ловушке, необходимо, чтобы градиентная сила превосходила силу рассеяния. Для этого существенная часть света должна падать на микросферу под большим углом. В связи с этим для фокусировки лазерного луча при создании оптической ловушки преимущественно используют объектив микроскопа с большой численной апертурой.

При использовании несфокусированного или слабо-сфокусированного лазерного луча рассеивающая сила будет превалировать над градиентной. В этом случае возможно создание только лишь двумерной оптической ловушки, то есть удерживание объекта в оптической ловушке может осуществляться только в плоскости, перпендикулярной направлению распространения света. Такой тип оптического захвата нашел свое применение при создании недорогих экспериментальных установок для сортировки клеток, в которых в качестве источника света и фокусирующей оптики могут быть использованы компоненты CD и DVD приводов [92].

1.2.6.2. Измерение сил

Использование оптической ловушки позволяет не только манипулировать микроскопическими диэлектрическими объектами, но также измерять силы приложенные к ним. Применение метода оптического захвата позволяет проводить измерения в большом диапазоне сил - от десятков фемтоньютон [146] до сотен пиконьютонов [93]. Приложение сторонней силы к микросфере приводит к ее смещению из центра оптической ловушки. При небольших смещениях (около 10% диаметра микросферы) сила внешнего воздействия прямо пропорциональна смещению микросферы:

$$F=k \cdot \Delta x,$$

где F – сила, Δx – смещение микросферы из центра оптической ловушки, k – жесткость оптической ловушки.

Таким образом, если жесткость оптической ловушки известна, силу, приложенную к микросфере, можно определить по ее смещению.

1.2.6.3. Экспериментальные схемы использования метода оптического захвата для одномолекулярных исследований ДНК

Одна оптическая ловушка

Наиболее старой и распространенной схемой одномолекулярных исследований ДНК является схема с использованием одной оптической ловушки (Ри.1.11). В таких экспериментах закрепление молекулы ДНК осуществляется схожим образом, что и при использовании методов TPM, AFS, а также метода магнитного захвата. Один конец ДНК связывается с микросферой, манипуляция которой осуществляется при помощи лазерного пучка, а другой - со стационарным объектом, таким как поверхность стекла (Ри.1.11.А, Б) или другая микросфера, удерживаемая при помощи микропипетки (Ри.1.11.В). Это наиболее простая с точки зрения технической реализации экспериментальная схема. В данном случае манипуляция объектом исследования, например, растягивание ДНК, осуществляется при перемещении экспериментальной камеры относительно

неподвижного лазерного пучка. Вариант экспериментальной схемы с использованием микропипетки является более предпочтительным, так как в этом случае эксперимент проходит вдали от поверхности стекла экспериментальной камеры, что исключает ее неспецифическое взаимодействие с исследуемыми объектами. Такая схема также позволяет производить растягивание ДНК в плоскости, перпендикулярной направлению распространения лазерного пучка, что упрощает измерение смещения микросферы из центра оптической ловушки, а также позволяет визуализировать объект исследования при использовании комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии. Наличие микропипетки также позволяет вращать удерживаемую с ее помощью микросферу [19]. Однако, внедрение микропипетки в экспериментальную камеру существенно усложняет процесс пробоподготовки и проведение экспериментов.

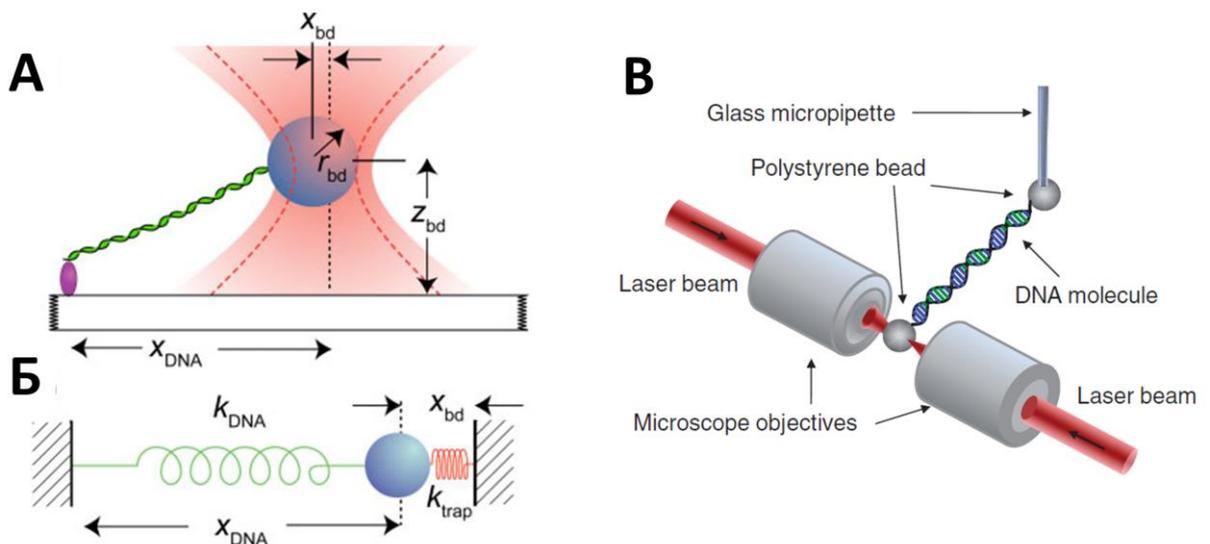


Рис. 1.11. Экспериментальные схемы исследования ДНК с использованием одной оптической ловушки. А) Закрепление концов ДНК на микросфере, удерживаемой в оптической ловушке, и поверхности стекла. Б) Механическая аналогия растягивания ДНК: микросферу, прикрепленную к концу ДНК и удерживаемую в оптической ловушке, можно представить как шар, прикрепленный к двум пружинам жесткостью k_{DNA} и k_{trap} соответственно. При растягивании ДНК, зная жесткость оптической ловушки k_{trap} и смещение микросферы x_{bd} , можно определить силу растяжения ДНК и изучать ее

механические свойства. В) Экспериментальная схема с использованием микропипетки [133].

Две оптические ловушки

Впервые схема с двумя оптическими ловушками была применена для исследования ДНК-белковых взаимодействий в 2003 году [153]. В такой схеме ДНК или ДНК-белковый комплекс закрепляется между двух микросфер, каждая из которых удерживается в отдельной оптической ловушке (рис.1.12.А). Основным преимуществом такого подхода является то, что исследуемый объект оказывается полностью погруженным в раствор. Отсутствие необходимости прикреплять исследуемый объект к образцу позволяет снизить уровень шумов в экспериментальных данных, связанных с дрейфом и механическими вибрациями образца, а также исключить возможное неспецифическое взаимодействие исследуемых объектов и микросфер с поверхностью [120].

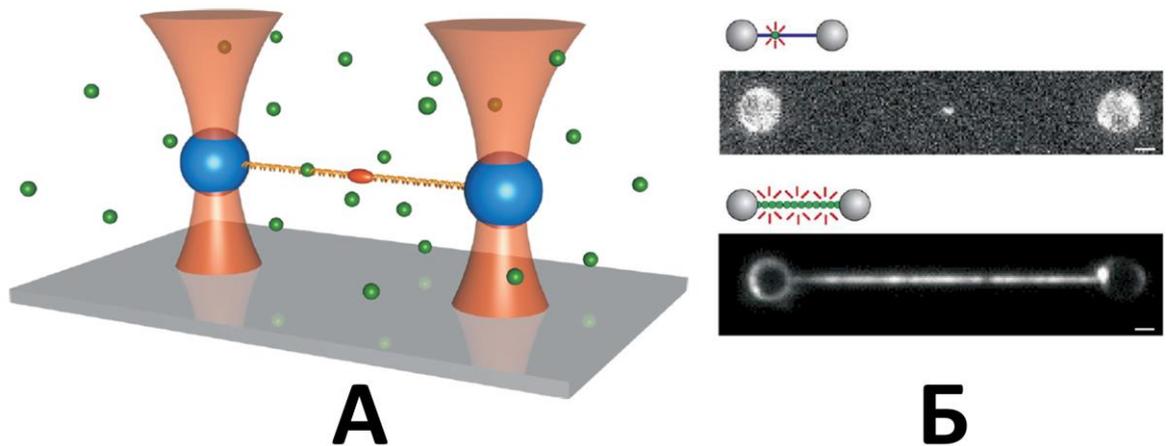


Рис.1.12. Применение двух оптических ловушек для исследования ДНК. А) Схематическое изображение ДНК, удерживаемой в растворе при помощи двух оптических ловушек [175]. Б) Пример применения комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии для визуализации взаимодействия митохондриального транскрипционного фактора А (TFAM) с одиночной молекулой ДНК [48].

Отсутствие необходимости прикрепления к поверхности, позволяет

беспрепятственно перемещать объект внутри экспериментальной камеры, что делает возможным быструю смену условий эксперимента, при использовании различных микрофлюидных устройств. Применение микрофлюидных устройств в комбинации с методом оптического захвата позволяет упростить процедуру формирования объекта исследования, тем самым уменьшая время, которое необходимо затратить на проведение экспериментов. Также, применение многоканальных микрофлюидных устройств позволяет на одномолекулярном уровне изучать последовательные этапы многостадийных биохимических реакций.

В последнее время также появились примеры комбинирования методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии, так как оба метода являются оптическими, и зачастую экспериментальные установки, реализующие метод оптического захвата, строятся на основе коммерческих флуоресцентных микроскопов. Манипулирование молекулой ДНК, независимо от поверхности, позволяет расположить ее в плоскости, удобной для визуализации при помощи метода флуоресцентной микроскопии, что успешно применяется, например, для изучения ДНК-белковых взаимодействий с использованием флуоресцентно меченых белков (Рис.1.12.Б) [48, 50].

Одномолекулярные методы исследования и в частности метод оптического захвата позволили серьезно расширить знания о структурных, механических и динамических особенностях различных клеточных процессов, благодаря уникальным данным, получение которых при помощи традиционных биохимических и биофизических подходов представляется невозможным. Однако такие методы также имеют свои ограничения. Для корректной интерпретации данных, полученных при помощи одномолекулярных подходов, необходимо набрать достаточную статистику, что может потребовать проведения большого количества экспериментов и соответственно больших временных затрат. Другим серьезным ограничением одномолекулярных методов является довольно сложная организация экспериментов и требование к наличию специального оборудования. Зачастую исследователям приходится потратить не один год на создание

специализированных установок и разработке экспериментальных методик, прежде чем приступить непосредственно к проведению экспериментов. Альтернативным вариантом является приобретение коммерческого прибора. В связи с ростом интереса к одномолекулярным исследованиям и накоплением опыта разработки экспериментальных установок, за последние годы появилось несколько коммерчески доступных приборов, реализующих одномолекулярные методы, такие как магнитный захват, оптический захват, микроскопия сверхвысокого разрешения, а также акустическая силовая спектроскопия. Тем не менее, такие готовые решения так же представляют собой довольно сложные приборы, обладающие высокой стоимостью и требующие наличия специальных навыков работы с ними.

1.3 Материалы и методы

Первой задачей в рамках данной диссертационной работы является создание методики исследования механических свойств ДНК и ДНК-белковых комплексов методом оптического захвата, реализация комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии для визуализации одиночных молекул ДНК, а также для наблюдения динамики образования ДНК-белковых комплексов. В данной главе описаны работы, выполненные для достижения поставленных задач: модернизация оптической схемы установки “Лазерный пинцет” для реализации двух оптических ловушек с возможностью флуоресцентной визуализации манипулируемых объектов; детекция положения объектов, находящихся в оптических ловушках; калибровка жесткости оптической ловушки для измерения сил, действующих на манипулируемый объект; разработка микрофлюидной системы для проведения одномолекулярных экспериментов; разработка протоколов модифицирования ДНК для манипуляции при помощи метода оптического захвата.

1.3.1 Модернизация установки “Лазерный пинцет”

В исходной оптической схеме установки “Лазерный пинцет” была реализована возможность создания одной оптической ловушки в области фокуса объектива микроскопа, а также обеспечение детектирования положения захватываемого объекта и приложенной к нему силы. В ходе работы с данной установкой выяснилось, что оптическая схема требует оптимизации. Диаметр лазерного пучка входящий в объектив микроскопа в несколько раз превосходил выходной зрачок объектива, что существенно сказывалось на качестве формируемой оптической ловушки. Эффективный оптический захват объектов (полистироловых микросфер) представлялся возможным только в непосредственной близости к покровному стеклу, что существенно ограничивало область применения оптической ловушки и, соответственно, усложняло проведение экспериментов с использованием данного метода. При этом жесткость оптической ловушки была существенно ограничена. Максимальная сила, действующая на микросферу из полистирола диаметром 3 мкм (типичный объект для оптического захвата в одномолекулярных экспериментах исследования ДНК), составляла всего около 10 pN. В то же время анализ литературы по теме одномолекулярных исследований ДНК показал, что зачастую исследования механических свойств ДНК и ДНК-белковых комплексов требуют приложения к молекулам сил в широком диапазоне (вплоть до 90 pN). Также на основе литературного анализа был сделан вывод, что наиболее перспективной экспериментальной схемой применения метода оптического захвата для исследования ДНК является использование двух оптических ловушек. В связи с этим оптическая схема установки “Лазерный пинцет” была модернизирована с целью повышения жесткости оптической ловушки, а также для реализации двух независимых оптических ловушек.

Установка “Лазерный пинцет” построена на базе неинвертированного флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss AxioImager.Z1, который обеспечивает механическую стабильность ключевых оптических элементов, таких как объектив микроскопа, конденсор, ПЗС-камера. Использование данного микроскопа обеспечивает удобство работы с образцами за счет наличия моторизованного

стола, а также позволяет реализовать комбинацию методов оптического захвата и метода широкопольной флуоресцентной микроскопии. На рис.1.13 представлена часть оптической схемы модернизированной установки “Лазерный пинцет”, отвечающей за реализацию двух оптических ловушек. Для создания оптической ловушки используется твердотельный Nd:YVO₄ лазер (Spectra Physics BL-106C), работающий в непрерывном режиме, с диодной накачкой, длиной волны 1064 нм и максимальной мощностью излучения 5 Вт. Длина волны лазера выбрана из расчета отсутствия поглощения в водных растворах и минимизации возможных повреждений биологических объектов, индуцированных лазерным излучением. Для оптимального использования мощности лазерного излучения при создании оптической ловушки диаметр пучка света, который подается на объектив микроскопа, должен соответствовать диаметру выходного зрачка объектива, через который лазерный пучок заводится в объектив [111]. Диаметр пучка света на выходе лазера составляет около 2 мм, в то время как входной зрачок объектива составляет около 5 мм. В связи с этим для достижения оптимального диаметра, пучок света подается на двукратный расширитель пучка (Melles Griot).

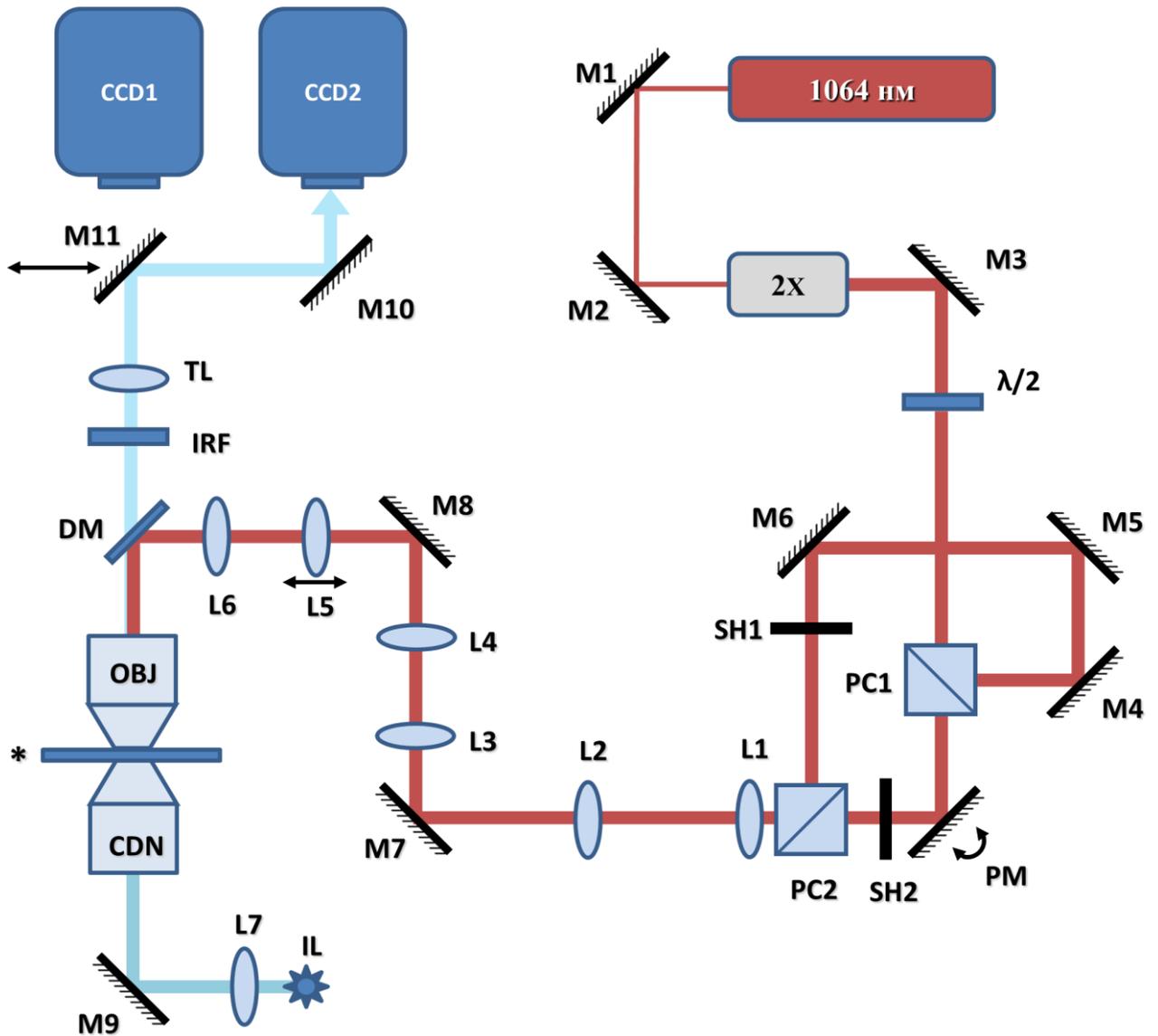


Рис. 1.13. Оптическая схема части установки “Лазерный пинцет”, ответственнй за создание двух оптических ловушек. 1064 нм – твердотельный Nd:YVO4 лазер (Spectra Physics BL-106C); M1-8 – зеркала с механической регулировкой угла поворота; M9-11 – зеркала, входящие в состав микроскопа Carl Zeiss AxioImager.Z1; 2X – двухкратный расширитель пучка Melles Griot CWBX-7.0-2X; $\lambda/2$ – полуволновая пластинка с механической регулировкой угла поворота; PC1,PC2 – поляризационный светоделительные кубы; PM – пьезо-зеркало S-334, Physik Instrumente; SH1, SH2 – управляемые оптические затворы; L1,L2 – линзы с фокусным расстоянием 150 мм; L3 и L6 - линзы с фокусным расстоянием 60 мм; L4 и L5 - линзы с фокусным расстоянием 63 мм; L7 – линза осветительной системы микроскопа; DM – дихроическое зеркало, отражающее

длину волны 1064 нм; OBJ – объектив с масляной иммерсией, NA=1,45 (Carl Zeiss Plan-Apochromat Oil DIC, 100X) или NA=1,25 (LOMO, 100X); * - образец, в котором формируются оптические ловушки, установленный на пьезо-столик и моторизованный стол микроскопа; CDN – конденсор NA=1,3; IL – галогеновая лампа осветительной системы микроскопа; IRF – инфракрасный фильтр, блокирующий попадания отраженных лазерных пучков на ПЗС камеру; CCD1, CCD2 – ПЗС камеры Cascade II 1024 (Photometrics) и iXon Ultra 897 (Andor Technology).

Расширенный пучок света попадает на полуволновую пластинку ($\lambda/2$), при помощи которой можно изменять поляризацию линейно-поляризованного излучения лазера. Далее в оптическом пути установлен поляризационный светоделительный куб (PC1), с помощью которого пучок света разделяется на две составляющие, соответствующие двум ортогональным поляризациям – горизонтально поляризованное излучение проходит сквозь куб, а вертикально поляризованное - отражается под углом 90 градусов. Поворотом полуволновой пластинки осуществляется регулирование распределения мощности лазерного излучения между двумя пучками света ортогональной поляризации.

Вертикально поляризованная составляющая лазерного пучка используется для создания стационарной оптической ловушки, а горизонтально поляризованная составляющая - для создания перемещаемой оптической ловушки. Для этого пучок света, прошедший сквозь светоделительный куб, подается на пьезозеркало (S-334, Physik Instrumente), угол поворота которого может изменяться в диапазоне ± 25 мрад с точностью 5 мкрад. Управление углом поворота пучка света, отраженного от пьезозеркала, осуществляется при помощи ПК с использованием среды LabView. Далее оптические пути, соответствующие перемещаемой оптической ловушке и стационарной ловушке объединяются для заведения лазерных пучков в объектив микроскопа. Для этого после пьезозеркала пучок света, соответствующий перемещаемой оптической ловушке, попадает на второй поляризационный светоделительный куб (PC2) и проходит через него. Пучок

света, соответствующий перемещаемой оптической ловушке, после отражения на первом светоделительном кубе (PC1) проходит через систему из трех зеркал (M4, M5, M6) и также попадает на второй светоделительный куб (PC2). Далее, оба лазерных пучка проходят через систему из двух зеркал (M7, M8), отражаются на дихроическом зеркале (DM1) и попадают в объектив микроскопа. Таким образом, в фокальной плоскости объектива образуются две оптические ловушки. Для независимого включения/выключения оптических ловушек после первого светоделительного куба установлены два управляемых оптических затвора, с помощью которых можно перекрывать необходимый лазерный пучок (SH1 – для управления стационарной ловушкой, SH2 – для перемещаемой ловушки).

Движение перемещаемой оптической ловушки в фокальной плоскости объектива осуществляется путем изменения угла, под которым соответствующий пучок света заводится в объектив. Для этого реализуется оптическое сопряжение плоскости пьезозеркала и задней фокальной плоскости объектива так, что поворот пьезозеркала приводит только к изменению угла падения пучка света на выходной зрачок объектива, но не смещению положения падения данного пучка в задней фокальной плоскости объектива.

Оптическое сопряжение достигается за счет установки двухлинзовых телескопов в конфигурации 4F [46]. Для этого первая линза телескопа L1 с фокусным расстоянием 150 мм устанавливается на фокусном расстоянии (150 мм) от пьезозеркала, а вторая линза L2 с фокусным расстоянием 150 мм устанавливается на двойном фокусном расстоянии (300 мм) от первой линзы и на одном фокусном расстоянии (150 мм) от зеркала M7. При таком расположении, плоскости пьезозеркала и зеркала M7 являются оптически сопряженными [46]. Оптическое сопряжение плоскостей зеркал M7 и M8 реализуется аналогично за счет установки между ними телескопа, состоящего из линз L3 с фокусным расстоянием 60 мм и L4 с фокусным расстоянием 63 мм, в конфигурации 4F. Размещение идентичного телескопа из линз L5 с фокусным расстоянием 63 мм и L6 с фокусным расстоянием 60 мм между зеркалом M8 и задней фокальной плоскостью объектива также позволяет добиться их оптического сопряжения. Таким образом,

задняя фокальная плоскость является оптически сопряженной с плоскостями зеркал М7 и М8, а также плоскостью пьезозеркала. Поворот зеркал М7 и М8 приводит к одновременному перемещению точек фокуса лазерных пучков в фокальной плоскости объектива, и соответственно, изменению X, Y положений оптических ловушек. Поворотом пьезозеркала осуществляется высокоточное X, Y позиционирование перемещаемой оптической ловушки в фокальной плоскости объектива.

Образец, в котором формируются оптические ловушки, устанавливается на пьезо-столик, который в свою очередь устанавливается на моторизованном столе микроскопа. С помощью микроскопного моторизованного стола осуществляется перемещение образца в широком диапазоне (миллиметры) по трем координатам. Для более точного позиционирования образца используется пьезо-столик P-561.3DD (Physik Instrumente) с диапазоном перемещения 45 мкм в плоскости X, Y и 15 мкм по оси Z с точностью позиционирования 0,2 нм.

Одним из недостатков объективов микроскопов является присутствие хроматической аберации, которая отражается в том, что фокальная плоскость объектива для разных длин волн может находиться на разном расстоянии от объектива. В связи с этим визуализация объектов, удерживаемых в оптической ловушке, в диапазоне видимых длин волн, может быть затруднена за счет того, что фокальная плоскость для инфракрасного излучения лазера, используемого для создания оптической ловушки, может не совпадать с фокальной плоскостью для видимого излучения, используемого для визуализации. В этом случае изображение объекта, находящегося в оптической ловушке, будет расфокусированным. Для компенсации данного недостатка линза L5 помещена на механическую подвижку. Перемещение линзы L5 вдоль оси лазерного пучка позволяет регулировать его сходимосť/расходимосť, что приводит к изменению положения плоскости, в которой фокусируется лазерный пучок, и соответственно изменению положения оптической ловушки по оси Z. Таким образом, при помощи зеркал М7, М8 и линзы L5 осуществляется одновременное перемещение двух оптических ловушек в трех плоскостях, а при помощи пьезозеркала

осуществляется независимое управление положением перемещаемой ловушки в плоскости X,Y.

Визуализация объектов, удерживаемых в оптических ловушках, осуществляется при помощи ПЗС камеры. Освещение обеспечивается за счет галогеновой лампы и конденсора с численной апертурой $NA=1,3$. Для формирования изображения на ПЗС камере между объективом и камерой установлена тубусная линза, длиной 160 мм. В микроскопе Carl Zeiss AxioImager.Z1 реализована возможность использования двух ПЗС камер. Для регистрации изображений в данной работе использовались две модели ПЗС камер: Cascade II 1024 (Photometrics) и iXon Ultra 897 (Andor Technology). Для предотвращения попадания в камеру отражений лазерного излучения, в оптическом пути перед камерами установлен ИК-фильтр.

Для обеспечения эффективного трехмерного оптического захвата лазерный пучок должен быть сфокусирован под большим углом по отношению к оптической оси. Для этого используются объективы с высокой численной апертурой с масляной или водной иммерсией. Объективы с масляной иммерсией обладают более высокой численной апертурой, что обеспечивает более высокую жесткость оптической ловушки. Однако, недостатком таких объективов по сравнению с водно-иммерсионными объективами является наличие сферической аберрации при работе с водными растворами, что отражается в снижении жесткости оптической ловушки при увеличении расстояния между покровным стеклом и оптической ловушкой [185]. В данной работе для создания оптических ловушек использовались объективы с масляной иммерсией: 100X Carl Zeiss Plan-Apochromat Oil DIC с численной апертурой 1,46 и LOMO 100X с численной апертурой 1,25.

Для снижения уровня шумов в экспериментальных данных, получаемых при помощи установки “Лазерный пинцет”, все оптические элементы и микроскоп смонтированы на оптическом столе с пневматической системой виброизоляции “Newport Smart Table”. Оптический стол в свою очередь расположен на независимом от здания фундаменте, а вспомогательное оборудование (блоки питания, контроллеры) располагаются отдельно от оптического стола.

1.3.2 Реализация комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии

Для реализации комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии используются флуоресцентные возможности микроскопа Carl Zeiss AxioImager.Z1. Часть оптической схемы установки “Лазерный пинцет”, относящейся к флуоресцентной микроскопии представлена на рис.1.1. Для возбуждения флуоресценции может быть использована ртутная лампа, обладающая широким спектральным диапазоном излучаемого света. В случае, если для возбуждения требуется более мощный источник света также могут быть использованы лазеры с длинами волн: 635 нм, 532 нм, 473 нм и 405 нм. Для заведения возбуждаемого излучения в объектив микроскопа и спектрального разделения сигнала флуоресценции от возбуждения используются сменные кубы, представляющие наборы из двух полосовых фильтров и дихроического зеркала для возбуждения/регистрации флуоресценции в определенном спектральном диапазоне (FC). Регистрация флуоресценции осуществляется при помощи ПЗС-камеры. Переключение между кубами для возбуждения/регистрации флуоресценции осуществляется путем автоматизированного вращения барабана, в который установлены данные кубы. В оптической схеме куб для возбуждения/регистрации флуоресценции располагается выше дихроического зеркала, используемого для заведения инфракрасного лазера в объектив микроскопа, то есть оптический путь лазерного пучка, создающего оптические ловушки, не зависит от схемы возбуждения/регистрации флуоресценции. Таким образом, оптический захват объектов может осуществляться одновременно с их флуоресцентной визуализацией. При этом переключение между различными флуоресцентными каналами не оказывает влияния на стабильность оптических ловушек, что позволяет проводить съемку многоканальных флуоресцентных изображений манипулируемых объектов.

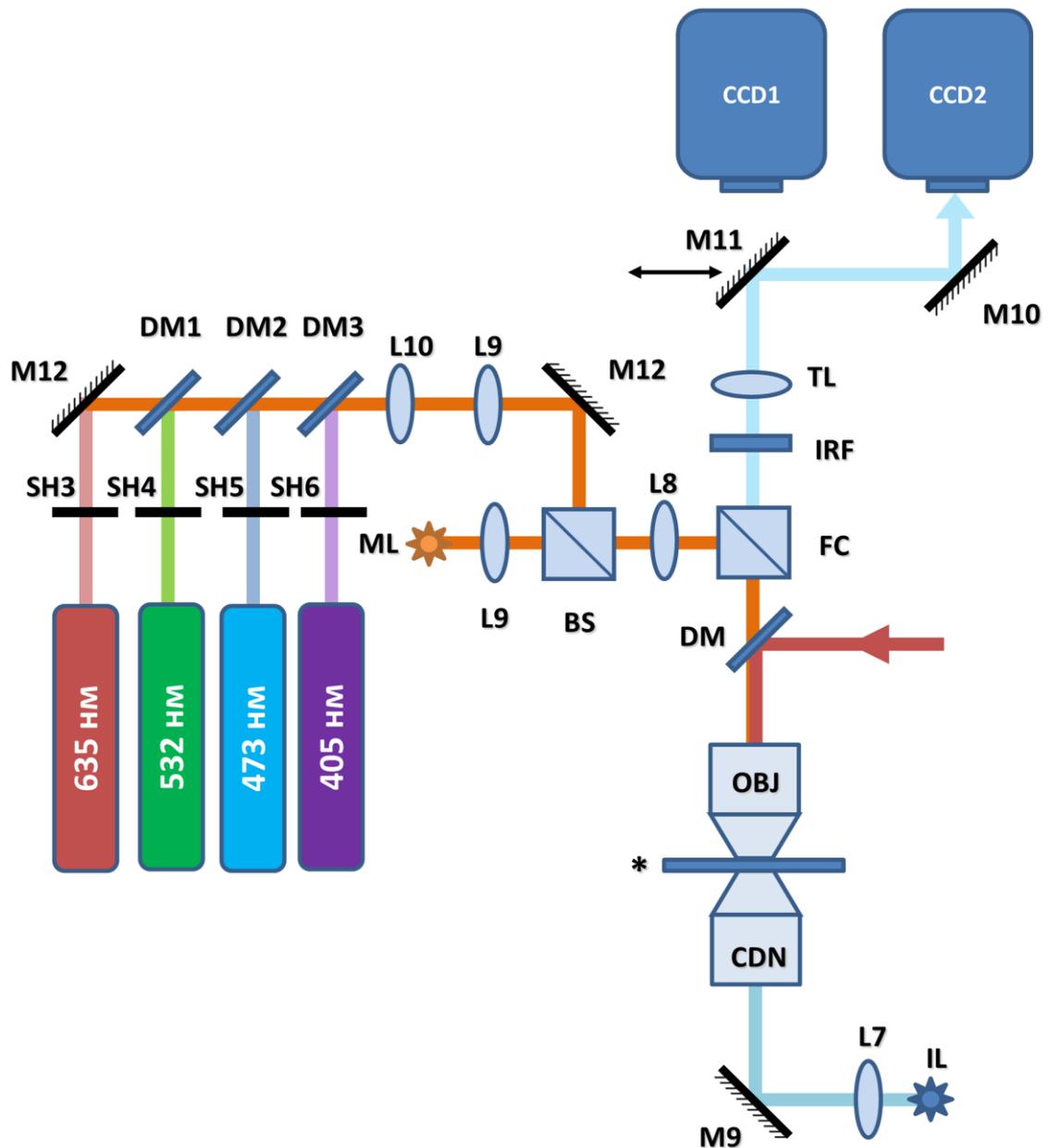


Рис. 1.14. Оптическая схема части установки “Лазерный пинцет”, относящейся к флуоресцентной микроскопии. CCD1, CCD2 – ПЗС камеры Cascade II 1024 (Photometrics) и iXon Ultra 897 (Andor Technology); 635 нм, 532 нм, 473 нм, 405 нм – лазеры с соответствующими длинами волн для возбуждения флуоресценции; M9-12 – зеркала; L7-L10 – линзы; DM, DM1, DM2, DM3 – дихроические зеркала отражающие свет длиной волны 1064 нм, 532 нм, 473 нм, 405 нм соответственно; ML – ртутная лампа для возбуждения флуоресценции; IL – галогеновая лампа осветительной системы микроскопа; BS – светоделительный куб; IRF – инфракрасный фильтр; TL – тубусная линза; FC - набор фильтров и дихроических зеркал для возбуждения/регистрации флуоресценции; SH3, SH4,

SH5, SH6 – управляемые оптические затворы; * - образец, установленный на пьезо-столик и моторизованный столик микроскопа; красной стрелкой показано введение в объектив микроскопа лазерного пучка, создающего оптическую ловушку.

1.3.3. Определение положения объекта в оптической ловушке

При проведении одномолекулярных исследований ДНК и ДНК-белковых комплексов в качестве объектов, манипуляция которыми осуществляется при помощи метода оптического захвата, используются полистироловые микросферы диаметром от сотен нанометров до нескольких микрон, к которым специфически прикрепляются молекулы ДНК. Для вычисления длины ДНК, а также приложенной к ней силы необходимо иметь инструмент точного определения положения микросферы, удерживаемой в оптической ловушке.

Для определения положения микросферы зачастую используются позиционно-чувствительный или квадрантный фотодетектор, на который подается дифракционная картина, сформированная при прохождении лазерного пучка через микросферу [69, 105, 134]. В качестве такого пучка может использоваться непосредственно лазерный пучок, создающий оптическую ловушку, или же лазерный пучок другой длины волны и более слабой интенсивности. При смещении микросферы относительно лазерного пучка происходит смещение дифракционной картины, попадающей на фотодетектор. После необходимой калибровки детектора, по смещению дифракционной картины можно вычислить фактическое смещение микросферы. Подобный способ детектирования был реализован в изначальной оптической схеме установки “Лазерный пинцет”. Использование фотодетектора позволяет измерять позицию микросферы в ловушке с высокой частотой (до 20 КГц) и субнанометровой точностью.

Однако такой способ детектирования также обладает недостатками в виде установки дополнительных элементов в оптической схеме и соответственно сложностью настройки экспериментальной установки при проведении

экспериментов. Использование одного фотодетектора позволяет отслеживать позицию только одной микросферы, что усложняет ситуацию при использовании двух оптических ловушек. Также детектируемый диапазон перемещения микросферы в данном случае ограничен размером микросферы, так как при сильных смещениях пучок света может не попасть на микросферу. При модернизации оптической схемы установки “Лазерный пинцет” возможность использовать фотодетектора была сохранена, однако в диссертационной работе данный способ детектирования не использовался, в связи с чем, соответствующие оптические элементы не были отмечены на оптической схеме экспериментальной установки (Рис.1.13).

Альтернативным способом определения положения микросфер является анализ изображения микросферы, полученного при помощи ПЗС-камеры (или КМОП камеры) [59, 178]. Основными недостатками детектирования при помощи камеры являются существенно более низкая частота съемки (до 100 Гц при использовании ПЗС-камер, до единиц КГц при использовании КМОП-камер) и точность определения положения микросфер (единицы – десятки нанометров). Однако современные алгоритмы анализа изображений микросфер позволяют вплотную подойти к субнанометровой точности определения положения [27, 78]. Основными преимуществами данного способа определения положения микросфер являются относительная простота (отсутствие необходимости выполнять настройку оптической системы детектирования), возможность отслеживать положение большого количества микросфер одновременно, а также существенно больший, по сравнению с использованием фотодетектора, детектируемый диапазон перемещений микросфер (десятки микрометров).

В данной работе для определения положения микросфер в оптических ловушках использовались их изображения, полученные при помощи ПЗС-камеры. Для этого сначала был измерен размер пикселя изображения камеры. Измерение размера пикселя проводилось при помощи калибровочной шкалы Leitz Wetslar с шагом штриха 10 мкм (рис.1.15.А). Изображение калибровочной шкалы анализировали при помощи программного пакета ImageJ, с помощью которого устанавливалось

соответствие между физическим расстоянием между калибровочными штрихами и расстоянием между штрихами, измеренным в пикселях. В результате размер пикселя для изображения с камеры Cascade II 1024 (Photometrics) составил 142 нм, а для камеры iXon Ultra 897 (Andor Technology) – 100 нм.

На начальных этапах работы анализ изображений микросфер производился по окончании съемки эксперимента. Для этого во время эксперимента записывалась серия изображений. После чего полученные изображения обрабатывались с помощью специально написанной программы в среде ImageJ. В ходе обработки изображения микросфер инвертировались, подвергались процедуре коррекции шума (встроенная функция ImageJ) и вычитания фона (рис.1.15.Б), после чего вычислялся центр масс обработанного изображения.

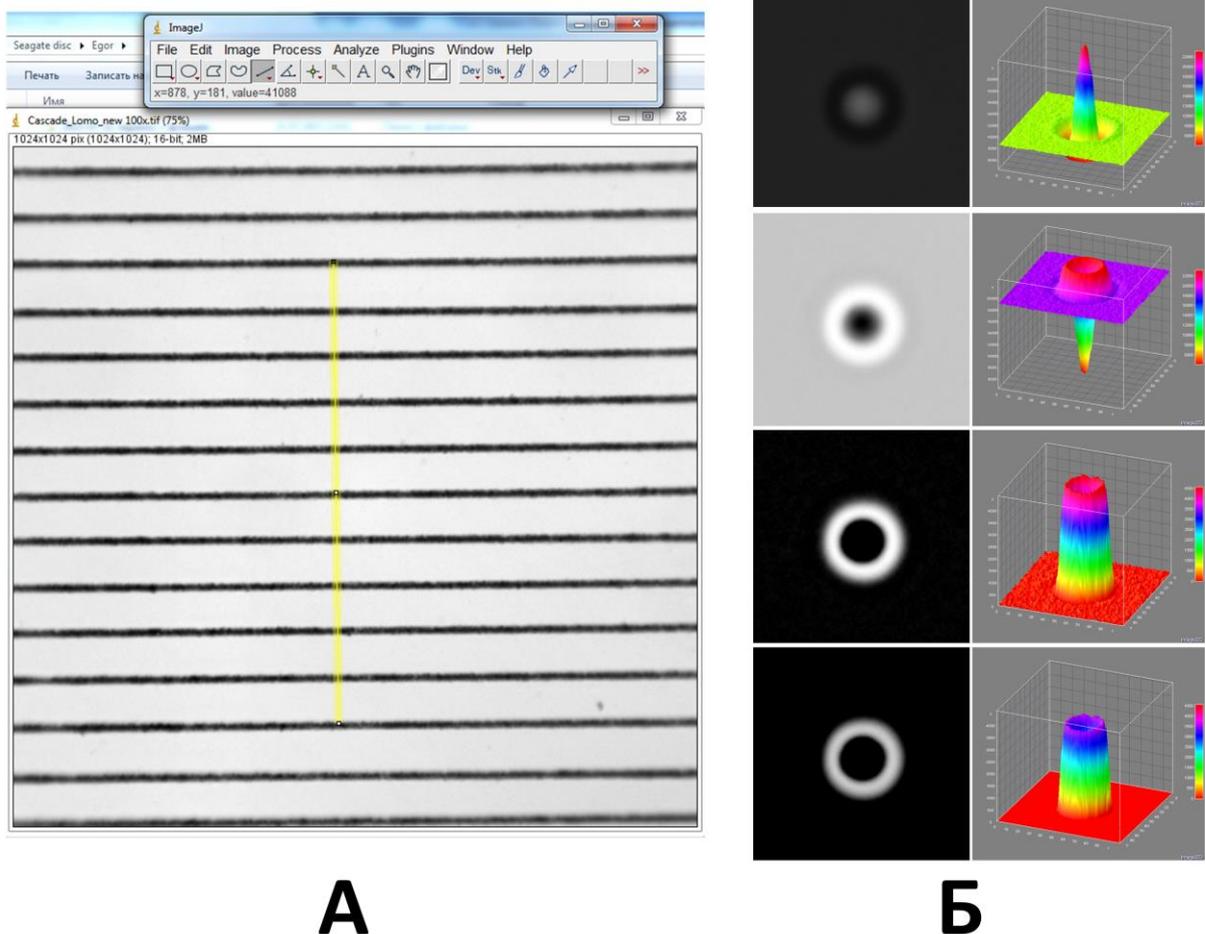


Рис. 1.15. А) Пример калибровки размера пикселя изображения камеры. Изображение калибровочной шкалы Leitz Wetslar с шагом штриха 10 мкм, полученное при помощи камеры Cascade II 1024 (Photometrics) и объектива LOMO

100X. Б) Обработка изображения микросферы в программном пакете ImageJ.

Сверху-вниз (слева показано изображение в стандартном двумерном представлении, справа – в трехмерном, где по оси Z отложена интенсивность): исходное изображение, инвертированное изображение, изображение после коррекции шума, изображение после вычитания фона.

Такой способ анализа позволяет оценить положение центра микросферы с точностью порядка 20 нм. Преимуществом данного способа детекции положения микросферы является относительная простота реализации. Однако такой способ обладает невысокой точностью и не позволяет проводить обработку изображений в режиме реального времени, что делает невозможным проведение экспериментов с использованием обратной связи, например, экспериментов в которых требуется поддержание постоянной силы натяжения ДНК.

В связи с этим было разработано программное обеспечение в среде LabView, позволяющее проводить потоковую обработку изображений микросфер, получаемых при помощи ПЗС-камеры. В данном случае, для регистрации изображений использовалась камера iXon Ultra 897 (Andor Technology), так как она обладает существенно большей скоростью съемки, нежели Cascade II 1024. При ограничении регистрируемой области изображения до размеров 100x100 пикселей (или 10x10 мкм) iXon Ultra 897 позволяет вести съемку с частотой более 100 Гц (около 8 микросекунд за один кадр).

Для начального определения положения центра микросферы использовался алгоритм, использующий вычисление центра масс обработанного изображения микросферы, описанный выше в данной главе. Затем, координаты центра микросферы уточнялись при помощи алгоритма на основе кросс-корреляционного анализа изображения [59]. Данный алгоритм предполагает симметричность изображения микросферы относительно ее центра. Для определения X-координаты центра микросферы использовался сектор изображения высотой 3 пикселя, расположенный по центру микросферы, предварительно определенный при помощи алгоритма на основе центра масс. Полученный двумерный массив

значений интенсивности каждого пикселя подвергался усреднению по оси Y (по трем точкам). Таким образом формировался одномерный массив, соответствующий профилю изображения микросферы вдоль оси X. Затем полученный массив и его обращенная форма подвергались кросс-корреляционному анализу, в результате которого вычислялось положение центра симметрии массива, и соответственно, X-координата центра микросферы. Определение Y-координаты центра микросферы осуществлялось аналогично. Данный способ позволяет в режиме реального времени отслеживать положение центра изображения микросферы с нанометровой точностью с частотой порядка 100 Гц.

1.3.4. Четырехканальная проточная камера для проведения одномолекулярных экспериментов

Для проведения одномолекулярных исследований ДНК и ДНК-белковых комплексов при помощи двух оптических ловушек была разработана конструкция четырехканальной проточной камеры, а также система подачи жидкостей в данную камеру. Четырехканальная проточная камера представляет собой микрофлюидное устройство с 4-мя входными каналами шириной 1 мм, сходящимися в общий канал шириной 4 мм. Каналы формируются в слое двухстороннего скотча (Scotch) толщиной 110 мкм, заключенном между предметным и покровным микроскопными стеклами (рис.1.16). К входным каналам при помощи прозрачного эпоксидного клея (POXIPOL) герметично крепятся полиэтиленовые трубки Warner Instruments PE-10 (внутренний диаметр 280 мкм). К общему каналу крепится трубка Warner Instruments PE-50 (внутренний диаметр 500 мкм), через которую отводится жидкость (Рис.1.17).

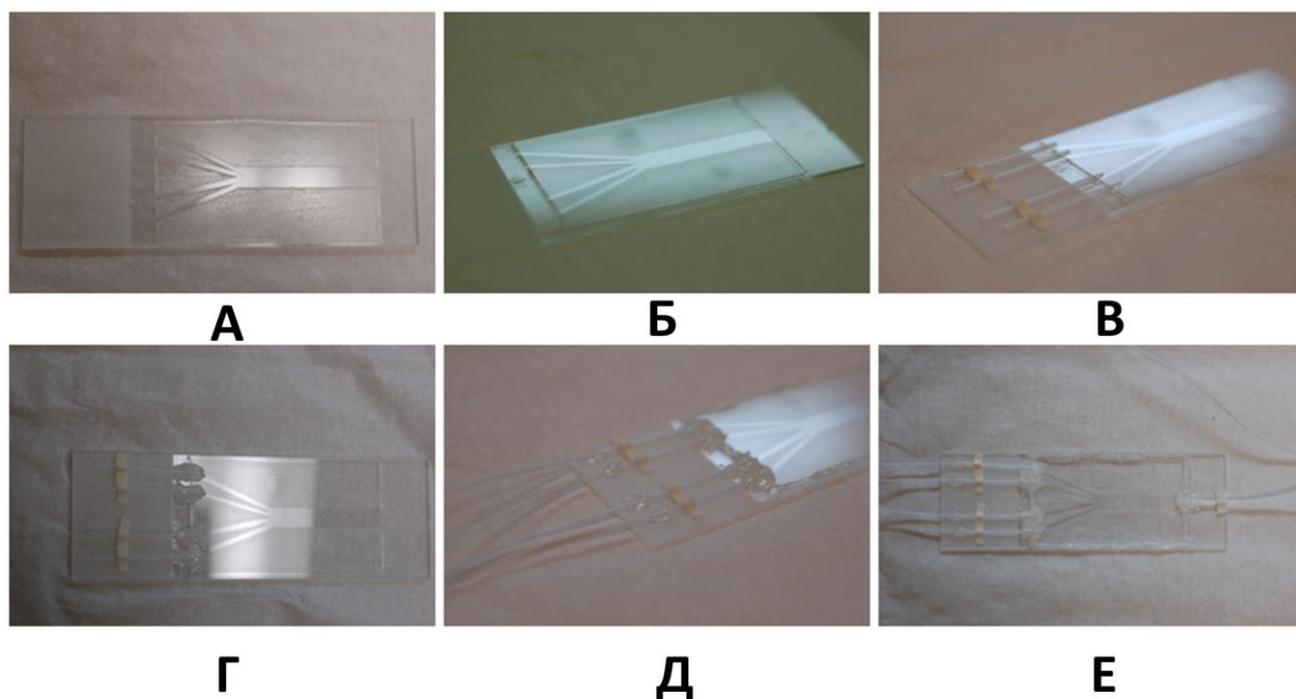


Рис. 1.16. Изготовление четырехканальной проточной камеры. А) В слое двустороннего скотча толщиной 110 мкм, наклеенного на предметное микроскопное стекло (26x76x1 мм, Menzel-Glaser, Thermo Scientific), вырезаются каналы: четыре входных канала шириной 1 мм, сходящиеся в общий канал шириной 4 мм. Б) Сверху на скотч помещается покровное стекло (24x40 мм, Menzel-Glaser, Thermo Scientific) и плотно прижимается, так чтобы в скотче, заключенном между двумя стеклами не наблюдалось воздушных пузырьков. В) К входным каналам прикладываются фрагменты трубки PE-50 длиной 25 мм со скошенными концами и предварительно фиксируются на предметном стекле полосками одностороннего скотча. Г) Подсоединенные фрагменты трубки PE-50 приклеиваются к предметному и покровному стеклу при помощи эпоксидного клея (POXIPOL). Д) В трубки PE-50 вставляются более длинные фрагменты трубки PE-10 длиной 400 мм, место соединения трубок фиксируется при помощи эпоксидного клея. Е) Аналогичным образом к выходному каналу подсоединяется фрагмент трубки PE-50 длиной 300 мм, и камера проклеивается по периметру эпоксидным клеем.

Трубки фиксируются в необходимом положении с помощью одностороннего скотча. Для окончательной фиксации и герметизации место стыковки трубки и камеры заливается эпоксидным клеем. В силу высокой вязкости и короткого

времени затвердевания, клей не попадает под “навес”, образованный наклонным скосом трубки, при этом прочно и герметично скрепляет трубку с предметным и покровным стеклами (рис.1.17). В результате прокачиваемая жидкость попадает в канал камеры через полость в застывшем клее, образовавшуюся под скосом трубки. Такое соединение трубок и проточной камеры было разработано как альтернатива распространенному способу соединения трубок, когда в предметном или покровном стекле высверливаются отверстия, в которые затем вставляются и приклеиваются трубки. Отсутствие необходимости сверления стекол ускоряет процесс изготовления проточной камеры, а также повышает чистоту проводимых в камере экспериментов.

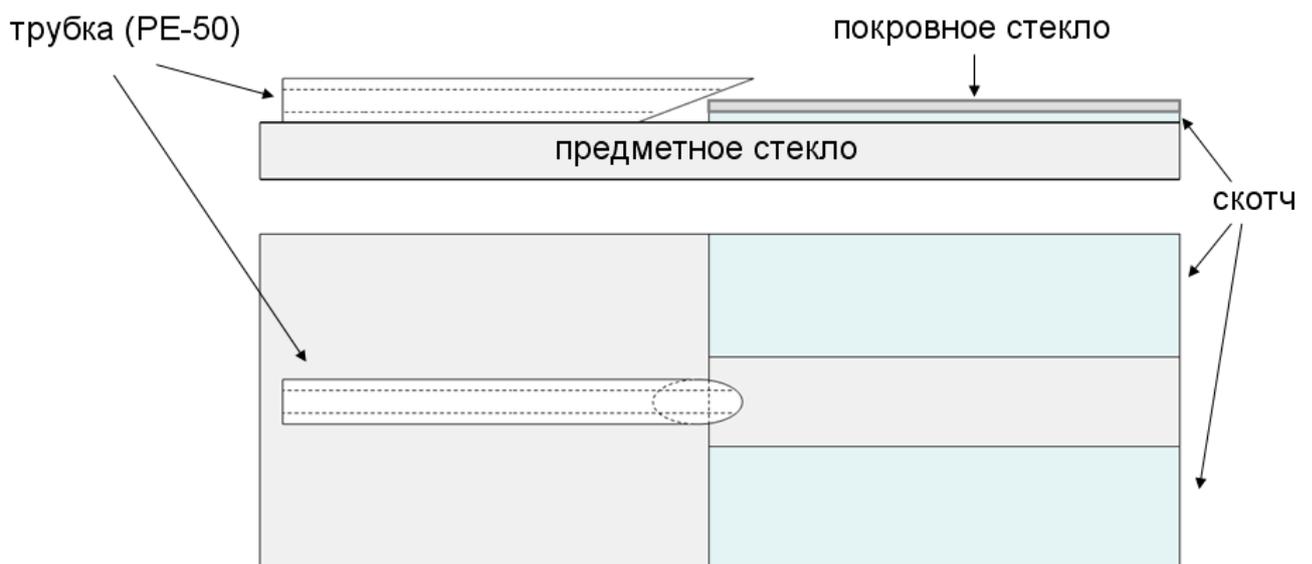


Рис. 1.17. Схема соединения фрагмента трубки РЕ-50 с каналом проточной камеры.

При подаче жидкости во входные каналы проточной камеры используются трубки с меньшим внутренним диаметром (280 мкм , РЕ-10) с целью минимизации так называемого “мертвого” объема, то есть объема, которым необходимо заполнить трубку, прежде чем необходимый раствор попадает в проточную камеру. Трубки РЕ-50 (внутренний диаметр 500 мкм) были выбраны для соединения с проточной камерой из соображений удобства изготовления камеры, так как при

использовании трубки большего диаметра легче выполняется процедура соединения трубки. Однако, трубки PE-10 также могут быть соединены с проточной камерой напрямую (рис.1.18.Б).

Подача жидкости в проточную камеру осуществляется при помощи прецизионного шприцевого насоса Harvard Apparatus Pump 11 Pico Plus, модернизированного для крепления четырех шприцов (рис.1.18.А). Для проведения экспериментов были подобраны шприцы BD microfine U-300, объемом 300 мкл, которые обеспечивают герметичный контакт с трубкой PE-10 и необходимый диапазон скоростей подачи жидкости при использовании данного насоса. Типичная скорость подачи жидкости в одном канале составляет 1 мкл/мин, что соответствует скорости потока внутри проточной камеры порядка 160 мкм/с. При такой скорости обеспечивается условие ламинарности потоков, в результате чего при объединении прокачиваемых растворов в общем канале проточной камеры смешивание между соседними потоками обусловлено только процессом диффузии в ограниченной области на их границе [17]. Тестирование разработанной системы, в ходе которого в каналы камеры подавали растворы красок, различных оттенков (рис.1.18.Б), показало формирование в проточной камере ламинарных потоков. Таким образом, в общем канале проточной камеры формируются области с различным содержанием растворов, между которыми отсутствуют физические границы. Использование данной системы позволяет перемещать объекты, удерживаемые при помощи оптических ловушек, между каналами, содержащими различные растворы, и тем самым быстро изменять условия в которых находится манипулируемый объект.

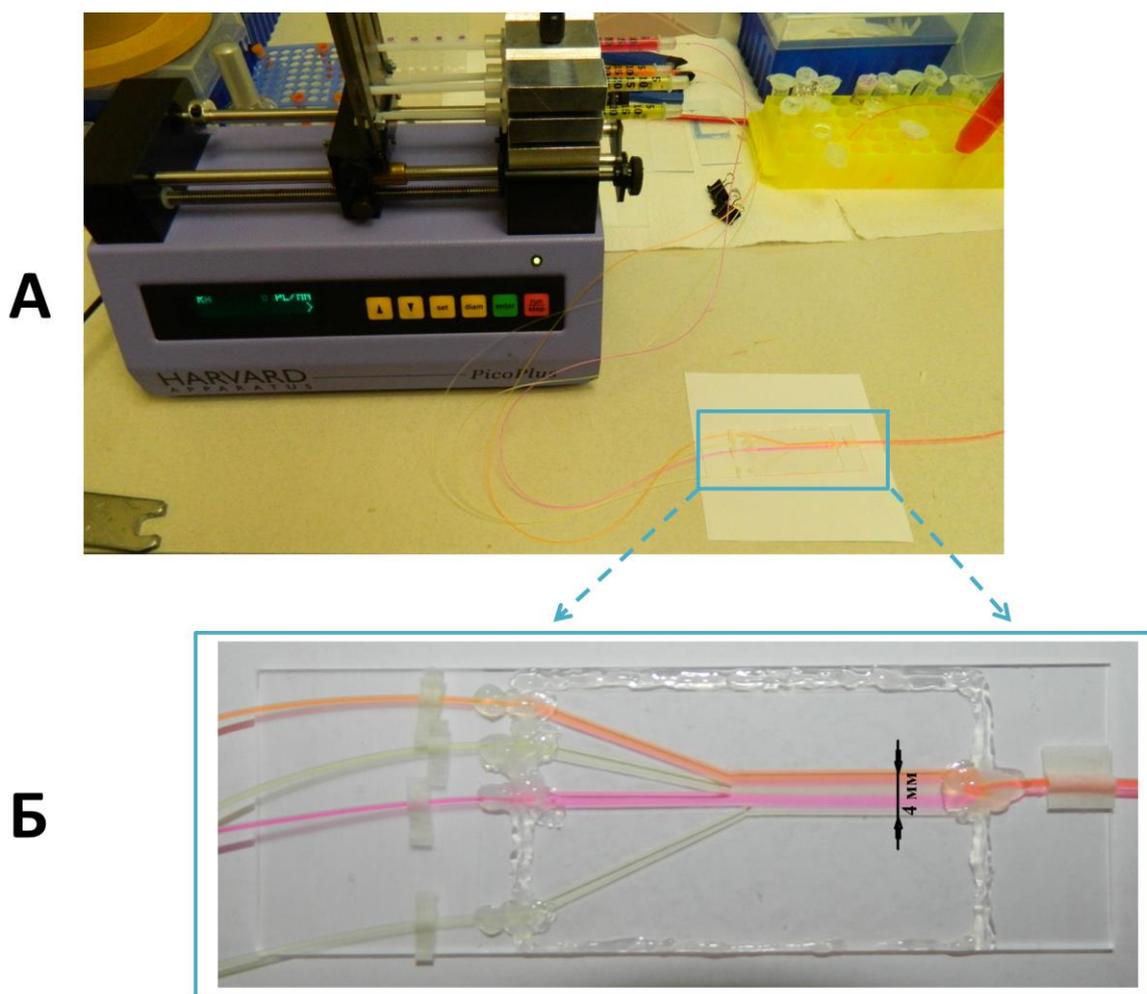


Рис. 1.18. А) Четырехканальная проточная камера, подключенная к насосу. Шприцевой насос Harvard Apparatus Pump 11 Pico Plus, оперирует четырьмя шприцами BD microfine U-300, подключенными к проточной камере. **Б) Четырехканальная проточная камера.** Для демонстрации образования ламинарных потоков в каналы проточной камеры вкачиваются окрашенные растворы разных цветов.

1.3.5. Приготовление модифицированных ДНК субстратов

Для специфического прикрепления молекулы ДНК к микросферам при проведении одномолекулярных экспериментов концы молекулы должны быть специфически мечены. В данной работе использовались полистиролловые микросферы, покрытые стрептавидином. Для прикрепления ДНК к таким микросферам, ее концы должны быть модифицированы биотином. В качестве

ДНК субстрата для одномолекулярных экспериментов была выбрана двунитевая ДНК бактериофага λ . Данная ДНК составляет 48502 пары оснований, что составляет длину около 16 мкм. Концы λ ДНК представляют собой однонитевые участки ДНК длиной 12 нуклеотидов, с нуклеотидными последовательностями 5'-GGGCGGCGACCT-3' и 5'-AGGTCGCCGCC-3' на левом и правом конце соответственно. Модифицирование данных однонитевых участков осуществлялось в ходе полимеразной реакции с использованием фрагмента Кленова ДНК полимеразы I и биотинилированных нуклеотидов biotin-11-dGTP (рис.1.19), согласно следующему протоколу:

1. К 10 мкл ДНК бактериофага λ (0,3 мг/мл, New England Biolabs) добавляются 1,5 мкл Т4 ДНК-лигазного буфера (10X, Fermentas), 0,4 мкл dATP (2,5 мМ), 0,4 мкл dCTP (2,5 мМ), 0,4 мкл dTTP (2,5 мМ, все Бигль), 1 мкл biotin-11-dGTP (1 мМ, Perkin Elmer). Раствор перемешивается аккуратным встряхиванием;
2. добавляется 1,5 мкл фрагмента Кленова ДНК полимеразы I (2 ед/мкл, Fermentas). Раствор перемешивается аккуратным встряхиванием;
4. пробирка с полученным раствором инкубируется в термоциклере при температуре 37°C в течение 45 минут.
5. фрагмент Кленова инактивируется инкубацией при температуре 80°C в течение 10 минут.
6. пробирка охлаждается до комнатной температуры;
7. избыточные нуклеотиды выводятся из раствора путем фильтрации через спин-колонку MicroSpin S-400 HR, GE Healthcare (центрифугирование 850g, 5 мин).

Таким образом, после достройки однонитевых концов каждая молекула λ ДНК имеет 4 молекулы биотина на одном конце и 6 молекул биотина на другом. Во избежание деградации ДНК при многократных циклах замораживания/размораживания полученный ДНК субстрат хранился при температуре +4°C в течение 1 месяца. По истечении данного срока ДНК субстрат изготавливался заново.

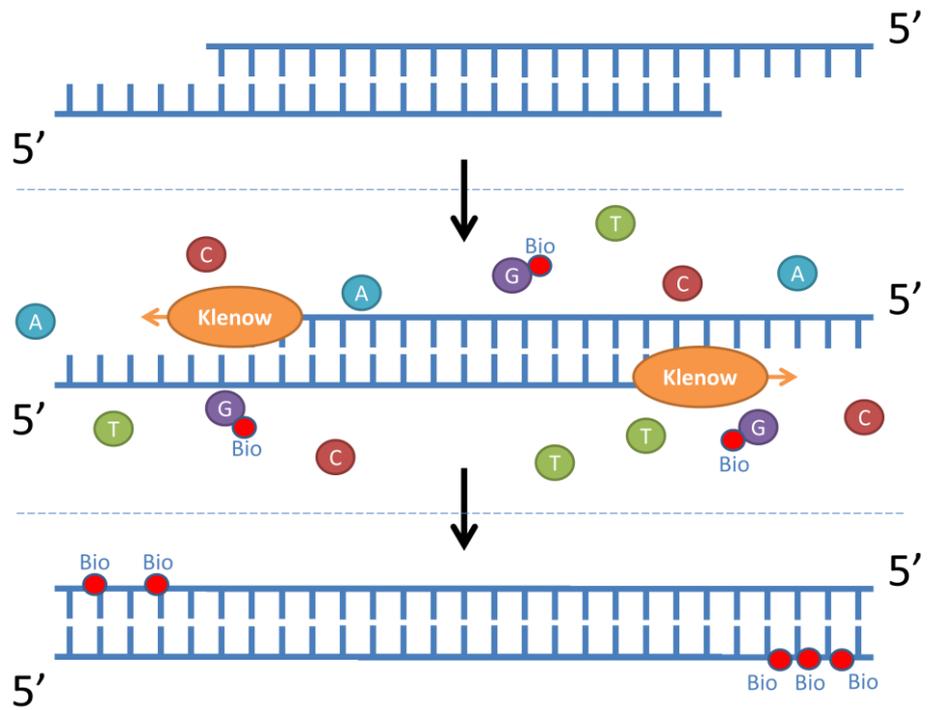


Рис. 1.19. Схема модифицирования λ ДНК при помощи биотинилированных нуклеотидов

Глава II. Особенности взаимодействия ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed.

2.1. Интеркалирующие красители ДНК

Помимо ДНК-связывающих белков, которые, взаимодействуя с ДНК, выполняют определенные функции в клетке, существует большое количество молекул небелковой природы, способных реагировать с ДНК. ДНК-связывающие агенты могут различаться в зависимости от механизма взаимодействия с ДНК. Например, различают вещества реагирующие с малой или большой бороздкой ДНК (Рис.2.1.Б), ДНК-интеркаляторы (Рис.2.1.А) или вещества, образующие ковалентные связи с ДНК (Рис.2.1.В) [14].

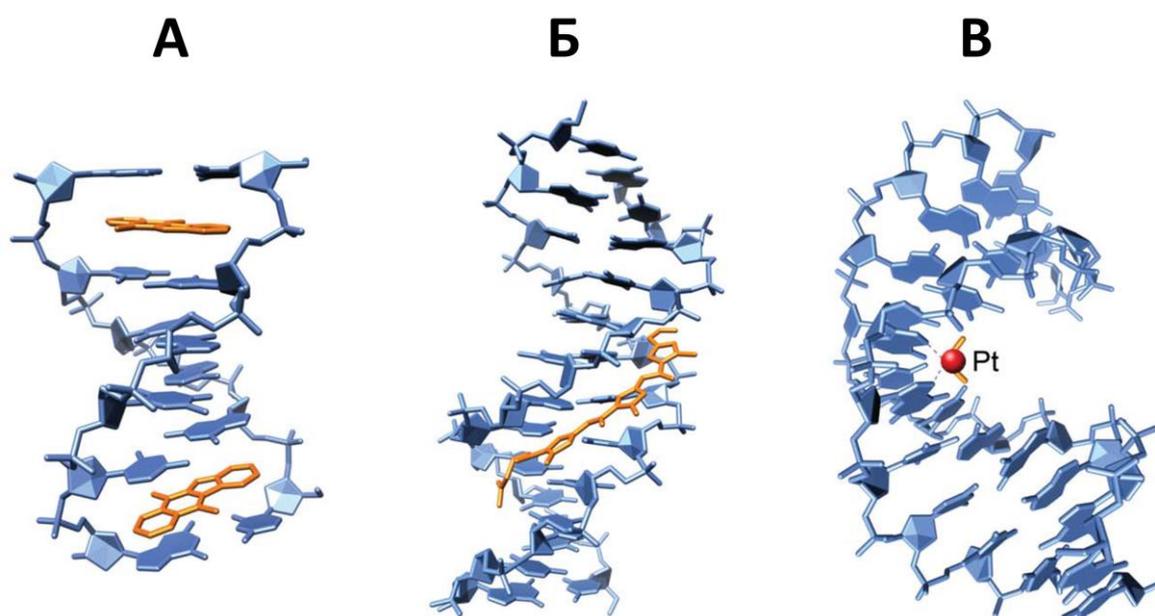


Рис.2.1. Механизмы связывания ДНК на примере структур ДНК в комплексе с лигандом. А) Интеркалятор (эллиптицин). Б) Агент, связывающий малую бороздку ДНК (дистамицин). В) Ковалентный ДНК кросс-линкер (цисплатин) [14].

Взаимодействие лигандов с ДНК зачастую приводит к изменению структуры ДНК и ее механических свойств [163, 188], что может оказывать заметное влияние на физиологию клетки. Структурные изменения ДНК могут повлиять на

взаимодействие с белками и, соответственно, сказываться на активности ферментативных реакций с участием ДНК [96, 133]. В связи с этим, ДНК-связывающие агенты обладают большим потенциалом при использовании их в качестве химиотерапевтических средств, с помощью которых, например, можно подавлять процессы репликации и транскрипции в раковых клетках [16, 79]. Агенты, специфически связывающие ДНК, также могут быть использованы для детектирования нуклеиновых кислот в случае, если физические свойства агента при взаимодействии с ДНК изменяются и могут быть зарегистрированы. Так ДНК-связывающие флуоресцентные красители получили широкое применение для *in vivo* и *in vitro* окрашивания ДНК, в частности для визуализации одиночных молекул ДНК.

2.1.1. ДНК интеркаляторы

В рамках структуры двойной спирали ДНК, комплементарные азотистые основания располагаются в одной плоскости. Это позволяет плоским полициклическим ароматическим молекулам встраиваться между соседними парами оснований (рис.2.1.А). Молекулы, связывающиеся с ДНК посредством данного механизма, относят к ДНК интеркаляторам. Наиболее важными для эффективной интеркаляции являются гидрофобные и ван-дер-Ваальсовские взаимодействия [144].

Встраивание интеркалятора существенно изменяет структуру ДНК. Размещение молекулы интеркалятора между парами оснований нарушает баланс сил, обеспечивающих стабильность В-формы ДНК, и приводит к локальному раскручиванию двойной спирали в области встраивания интеркалятора. Структурные исследования показали, что встраивание одной молекулы интеркалятора приводит к удлинению ДНК на величину порядка 0,34 нанометра [54, 70, 173, 191]. Однако, также было показано, что связывание одного интеркалятора исключает возможность встраивания второго интеркалятора в непосредственной близости, то есть встраивание двух молекул интеркалятора

между соседними парами оснований ДНК невозможно. Предполагается, что данный эффект является результатом локальных структурных изменений ДНК при интеркаляции, что приводит к ограничению доступа для других молекул к потенциальным сайтам связывания [80, 143].

Для повышения ДНК-связывающих свойств интеркаляторов синтезируют молекулы, в состав которых входят две или более интеркаляционных групп (так называемые бисинтеркаляторы, трисинтеркаляторы и т.д.). Это позволяет существенно повысить константу связывания при взаимодействии интеркалятора с ДНК [64, 107, 149]. При таком подходе молекула, взаимодействуя с ДНК, занимает несколько пар оснований, что также делает возможным синтез интеркаляторов, связывающихся с определенной последовательностью ДНК [73].

Существует широкий спектр интеркаляторов, обладающих флуоресцентными свойствами, которые используются в качестве красителей ДНК. В данной работе интеркалирующие красители используются в силу нескольких причин. Применение интеркалирующих красителей позволяет визуализировать ДНК при помощи метода флуоресцентной микроскопии. В связи с этим, интеркалирующие красители используются для визуализации одиночных молекул ДНК, манипуляция которыми осуществляется при помощи метода оптического захвата.

Также, в силу того, что встраивание молекулы интеркалятора в ДНК приводит к изменению структурных свойств, и, в частности, к удлинению молекулы ДНК, интеркаляторы являются хорошим тестовым ДНК-связывающим агентом, что позволяет использовать их для отработки методики наблюдения изменений механических свойств ДНК. Изменение механических свойств ДНК при взаимодействии с красителем может оказать влияние на биологические процессы, происходящие с ДНК. Поэтому данные о таких изменениях важны при использовании красителей в экспериментах, требующих визуализации ДНК.

Данная глава диссертации посвящена исследованию особенностей взаимодействия ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed с целью определения возможности их использования для визуализации одиночных молекул ДНК, а также с целью исследования изменений механических свойств ДНК при

взаимодействии с данными красителями.

2.1.2. YOYO-1

Молекула YOYO-1 представляет собой гомодимер оксазола желтого (YO), красителя нуклеиновых кислот [149]. YOYO-1 является бис-интеркалятором и применяется в различных методах, требующих визуализации ДНК, например таких, как гель-электрофорез, проточная цитометрия, создание геномных карт [128]. Считается, что краситель YOYO-1 специфически связывается с В-формой ДНК, что позволяет использовать его при исследовании структурных изменений ДНК [197]. Также YOYO-1 широко применяется для визуализации одиночных молекул ДНК [23, 28, 164, 192], в том числе для получения изображений с субдифракционным разрешением [49, 135].

Максимум возбуждения флуоресценции YOYO-1 приходится на длину волны 491 нм, в то время как максимум флуоресценции соответствует 509 нм (рис.2.2). YOYO-1 обладает высокой афинностью к нуклеиновым кислотам с константой связывания порядка 10^3 л/моль [197]. Квантовый выход флуоресценции YOYO-1 возрастает более чем на три порядка при взаимодействии с ДНК за счет снижения вероятности безизлучательной релаксации возбужденных молекул [149] и, как следствие, увеличения соотношения сигнал/шум при наблюдении флуоресценции.

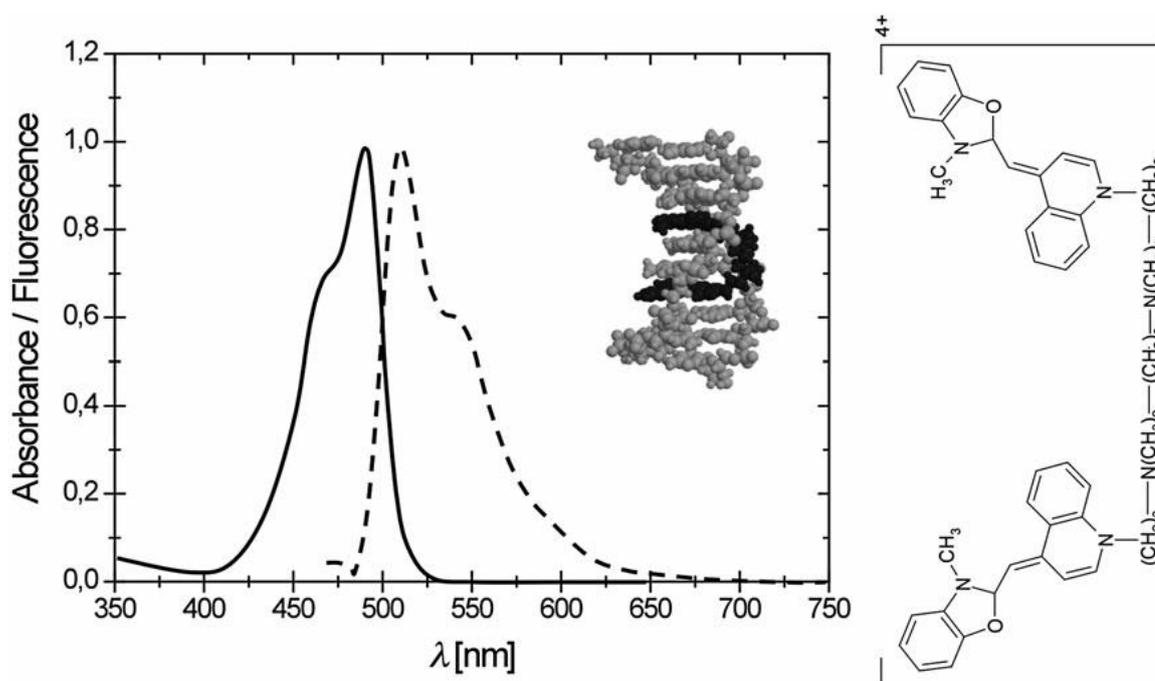


Рис.2.2. Интеркалирующий краситель YOYO-1. Спектры поглощения и флуоресценции. Структура молекулы YOYO-1: две интеркаляционные группы оксазола желтого, соединенные линкером [136].

2.1.3. GelRed

GelRed – новый перспективный краситель ДНК, разработанный компанией Biotium для замены высокотоксичного бромистого этидия, который широко используется для флуоресцентного окрашивания ДНК, в частности при исследовании ДНК методом гель-электрофореза [1]. Спектры поглощения и флуоресценции красителя GelRed, связанного с ДНК, идентичны бромистому этидию (рис.2.3). Максимум возбуждения флуоресценции бромистого этидия приходится на УФ область спектра в районе 300 нм, а также в видимой области спектра в районе 530 нм, в то время как максимум флуоресценции соответствует 595 нм (рис.2.3). Однако, чувствительность GelRed при окрашивании ДНК существенно выше по сравнению с бромистым этидием [77, 90]. Также GelRed обладает существенно меньшей токсичностью за счет того, что его структура не позволяет проходить молекулам GelRed через клеточную мембрану [1]. На данный момент структура молекулы GelRed является коммерческой тайной

производителя, однако, по неофициальной информации GelRed является димером бромистого этидия [32]. В связи с этим, можно предполагать, что взаимодействие данного красителя с ДНК должно приводить к изменениям свойств ДНК, характерным для встраивания ДНК интеркаляторов.

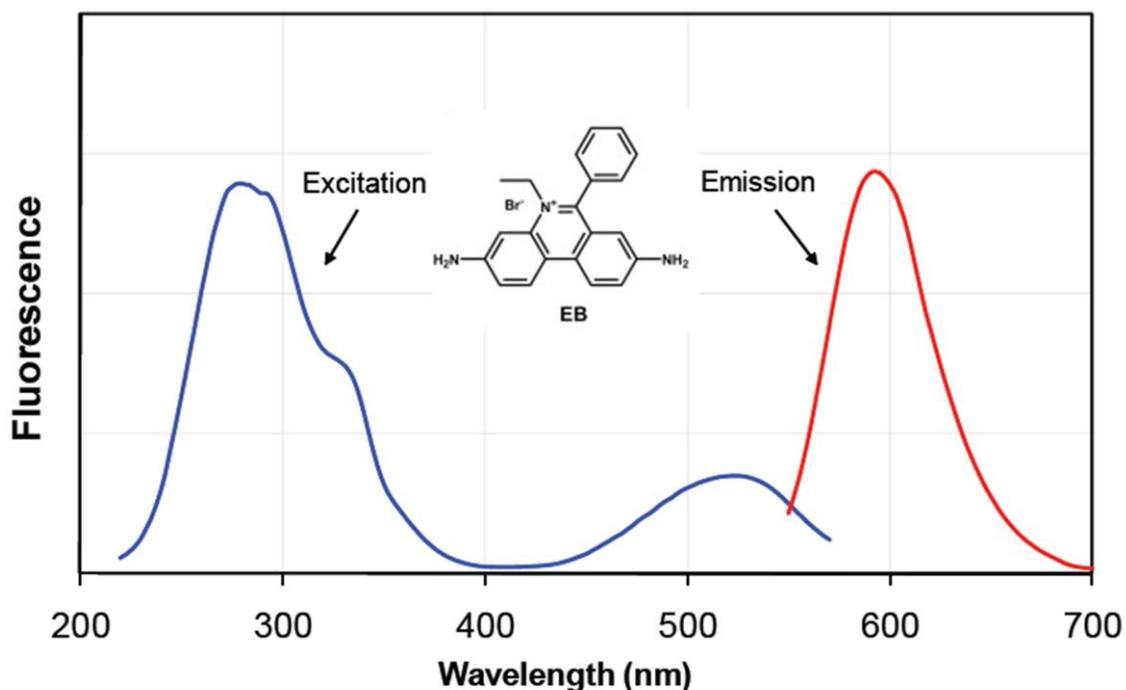


Рис.2.3. Краситель GelRed. Спектры поглощения и флуоресценции [1]. Вставка: структура молекулы бромистого этидия (предполагается, что GelRed является димером бромистого этидия).

2.2 Исследование взаимодействия YOYO-1 с ДНК

На первом этапе была исследована возможность применения красителя YOYO-1 для визуализации одиночных молекул ДНК при использовании комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии. Для этого был разработан протокол эксперимента по манипуляции одиночными молекулами ДНК, окрашенными YOYO-1, при помощи модернизированной установки “Лазерный пинцет”, а также с использованием четырехканальной проточной камеры и шприцевого насоса.

Ниже приведено описание процедур подготовки проточной камеры,

приготовления и подачи растворов, а также протокол проведения эксперимента.

2.2.1. Подготовка проточной камеры

Внутренняя поверхность проточной камеры и трубок, по которым в камеру попадают жидкости, очищают путем промывания одновременно всех четырех каналов со скоростью 20 мкл/мин:

1. 100 мкл этанола;
2. 300 мкл воды двойной степени очистки (MilliQ);

Критичным моментом при использовании проточной камеры является отсутствие воздушных пузырей, так как пузыри даже небольшого размера существенно изменяют распределение потоков в камере, что негативно влияет на проведение эксперимента. В случае попадания пузырей воздуха в камеру, процедуру промывки этанолом и водой повторяют.

Далее, проводят пассивацию внутренней поверхности камеры и трубок для предотвращения неспецифического взаимодействия с поверхностью камеры ДНК, микросфер и исследуемых ДНК-связывающих агентов, а также для устранения адсорбции компонентов промываемых растворов на поверхности трубок, так как это может приводить к снижению концентрации компонентов растворов при их попадании непосредственно в проточную камеру. Пассивацию поверхности камеры и трубок проводят путем промывания одновременно всех каналов 300 мкл 0,1%-ного водного раствора БСА (бычий сывороточный альбумин) и инкубации данного раствора в камере в течение 1 часа.

Затем каналы камеры промывают 300 мкл воды (MilliQ) для удаления непрореагировавшего с поверхностью БСА.

2.2.2. Приготовление и подача растворов

Непосредственно перед проведением эксперимента из раствора микросфер удаляют стрептавидин, несвязанный с микросферами, а микросферы переводят в

буфер для проведения эксперимента. Для этого необходимое количество микросфер растворяют в буфере Tris 50 мМ (рН 8,2) и полученный раствор откручивают в микроцентрифуге ($g=5000$) в течение 5 минут. После удаления супернатанта осажденные микросферы снова растворяют в буфере Tris 50 мМ (рН 8,2), процедуру осаждения микросфер и удаления супернатанта повторяют. Затем, осажденные микросферы растворяют в буфере, используемом в эксперименте.

В эксперименте по манипуляции одиночными молекулами ДНК, окрашенными YOYO-1, в качестве буферного раствора используют: Tris-HCl 50 мМ (рН 8,2), MgCl₂ 1 мМ, 2-меркаптоэтиламин 100 мМ, сахараза 15%, вода двойной степени очистки (MilliQ).

Для подачи в проточную камеру готовят растворы, соответствующие четырем каналам камеры:

1 канал: 0,01% раствор полистироловых микросфер диаметром 3 мкм, покрытых стрептавидином, 300 мкл;

2 канал: 25 пМ биотинилированных молекул ДНК и 200 нМ YOYO-1, 300 мкл;

3,4 канал: буферный раствор, по 300 мкл на канал;

Растворами заполняют шприцы BD Microfine U-300, объемом 300 мкл. При подготовке раствора молекул ДНК не допускается перешивание путем пипетирования или использование вортекса во избежание разрыва ДНК. Также, с целью сохранения целостности молекул ДНК набор в шприц раствора ДНК проводят при помощи насоса на скорости 20 мкл/мин. Набор остальных растворов в шприцы проводят вручную.

Затем, заполненные шприцы герметично соединяют с соответствующими входными трубками камеры. Объем входной трубки каждого канала составляет около 30 мкл, в связи с чем, перед началом эксперимента требуется заполнить трубки необходимыми растворами, прежде чем они попадут непосредственно в проточную камеру. Для этого в каналы камеры подают соответствующие растворы на скорости 20 мкл/мин по 60 мкл в каждый канал. После этого скорость потока снижают до 1 мкл/мин в канале.

При подаче растворов со скоростью 1 мкл/мин в каждом шприце, в проточной

камере формируются четыре канала, каждый из которых представляет собой ламинарный поток. Ширина каждого канала составляет 1 мм, а высота – около 100 мкм. Соответственно, линейная скорость потока жидкости внутри проточной камеры составляет около 160 мкм/с. При таких условиях сила потока, действующая на микросферы диаметром от 1 мкм до 5 мкм (типичный размер микросфер, используемых для закрепления молекул ДНК) составляет единицы пиконьютонов, что позволяет захватывать и удерживать микросферы в потоке при помощи оптических ловушек (максимальная сила, действующая на микросферу со стороны оптической ловушки, составляет порядка 100 пН).

2.2.3. Протокол проведения эксперимента по манипуляции одиночными молекулами ДНК, окрашенными YOYO-1

Для манипуляции и визуализации одиночной молекулы ДНК выполняют следующие шаги:

1. Путем перемещения микроскопного стола осуществляют фокусировку в середине первого канала проточной камеры на расстоянии 50 мкм от поверхности покровного стекла (Рис.2.4). Затем, при открывании соответствующих оптических затворов в объектив микроскопа подают лазерные пучки, отвечающие за создание стационарной и перемещаемой оптических ловушек. При попадании микросферы в область фокуса лазерного пучка происходит ее оптический захват. В область фокуса лазерного пучка могут попасть сразу несколько микросфер, в таком случае соответствующий лазерный пучок перекрывают при помощи оптического затвора, захваченные микросферы уносит поток жидкости, оптический затвор снова открывают и захват микросферы осуществляют заново. Для продолжения эксперимента необходимо добиться ситуации, когда в каждой из оптических ловушек находится только одна микросфера.

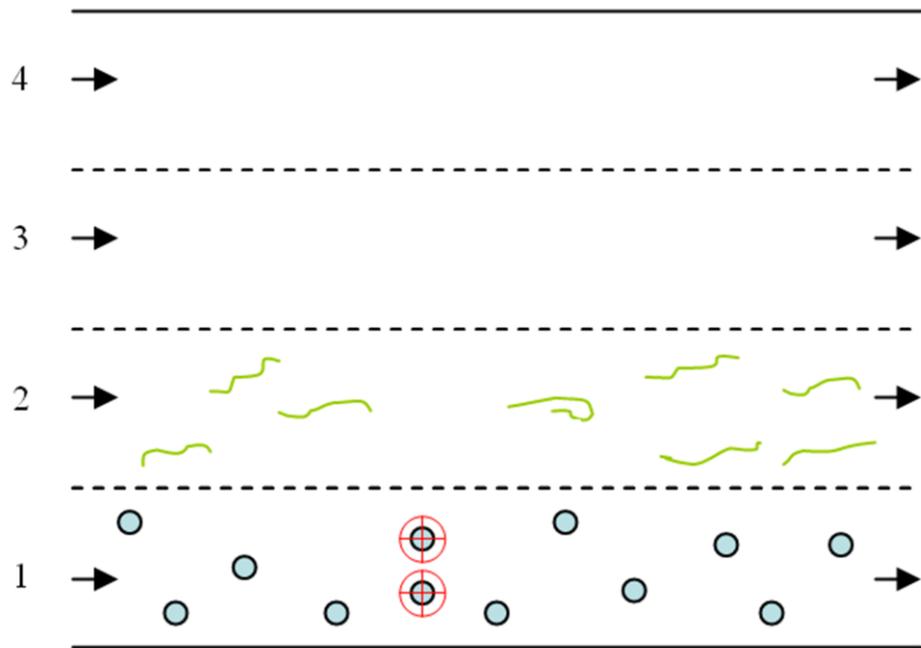


Рис. 2.4. Оптический захват двух микросфер в первом канале проточной камеры.

2. Путем перемещения микроскопического стола захваченные микросферы переносят в середину второго канала проточной камеры. При этом микросферы, удерживаемые в оптических ловушках, остаются неподвижными относительно объектива микроскопа, а их перемещение осуществляется за счет смещения проточной камеры относительно объектива. Второй канал содержит раствор биотинилированных молекул ДНК, окрашенных YOYO-1. Для визуализации прикрепления молекулы ДНК к микросфере микроскоп переводят в режим наблюдения флуоресценции. Возбуждение и регистрация флуоресценции YOYO-1 осуществляют при помощи ртутной лампы, набора оптических фильтров Alexa 488 и ПЗС камеры. При столкновении молекулы ДНК с микросферой происходит прикрепление одного конца ДНК к микросфере за счет взаимодействия биотин-стрептавидин и выпрямление ДНК под действием силы потока (Рис.2.5).

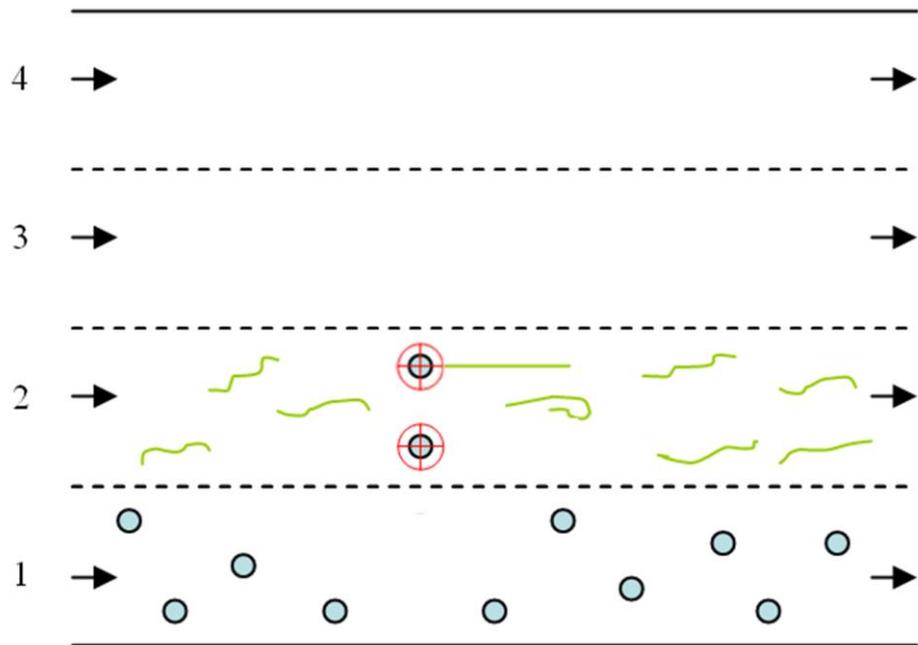


Рис. 2.5. Прикрепление молекулы ДНК к микросфере во втором канале проточной камеры.

3. Для предотвращения прикрепления дополнительных молекул ДНК микросферы переносят в третий канал, содержащий буферный раствор. Путем изменения положения пьезо-зеркала микросферы располагаются относительно друг друга так, чтобы незакрепленный конец ДНК касался второй микросферы. При этом в большинстве случаев происходит прикрепление ДНК ко второй микросфере за счет взаимодействия биотин-стрептавидин. Проверку закрепления ДНК проводят путем смещения микросферы в перемещаемой оптической ловушке в направлении, перпендикулярном направлению движения потока в камере. В таком случае, при закреплении на обеих микросферах молекула ДНК образует дугу за счет действия на нее силы со стороны потока (Рис.2.6).

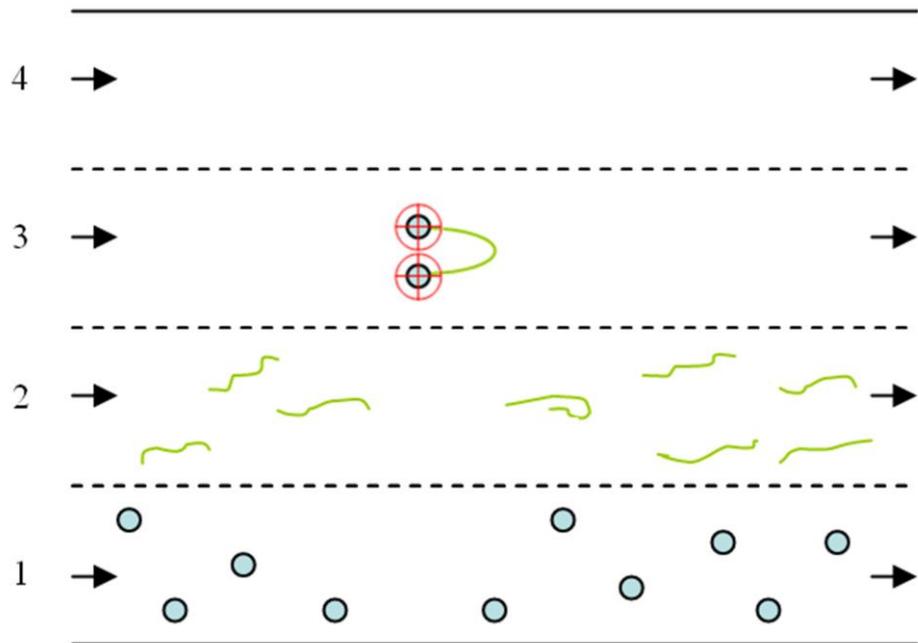


Рис. 2.6. Прикрепление молекулы ДНК ко второй микросфере в третьем канале проточной камеры.

Для оптимизации флуоресцентной визуализации прикрепления ДНК к микросферам, помимо Tris-HCl, который используют для поддержания необходимого уровня кислотности, в состав буферного раствора включают: $MgCl_2$ 1 мМ - для эффективного взаимодействия YOYO-1 с ДНК, 2-меркаптоэтиламин 100 мМ – для предотвращения появления разрывов ДНК при возбуждении флуоресценции YOYO-1, 15% сахарозы – для повышения вязкости раствора с целью увеличения гидродинамической силы, под действием которой происходит выпрямление ДНК после прикрепления к микросфере. Квантовый выход флуоресценции YOYO-1 увеличивается на три порядка при взаимодействии с ДНК, что позволяет проводить флуоресцентную визуализацию одиночных молекул ДНК во втором канале, содержащем 200 нМ YOYO-1, за счет низкого уровня фонового свечения YOYO-1. Условия проведения эксперимента подобраны так, что при переносе молекулы ДНК в канал, не содержащий YOYO-1, наблюдение флуоресценции YOYO-1, связанного с ДНК, можно проводить в течение длительного времени (десятки секунд) без существенного уменьшения

уровня флуоресцентного сигнала и разрывов ДНК. Флуоресцентные изображения, полученные в ходе прикрепления молекулы ДНК к микросферам, представлены на рис.2.7. В случаях невозможности прикрепления ДНК к микросфере, прикрепления двух или более молекул или разрыва ДНК - лазерные пучки, создающие оптические ловушки, перекрывают при помощи оптических затворов и процедуру оптического захвата шариков и прикрепления к ним молекулы ДНК проводят заново (пункты 1-3 данного протокола).

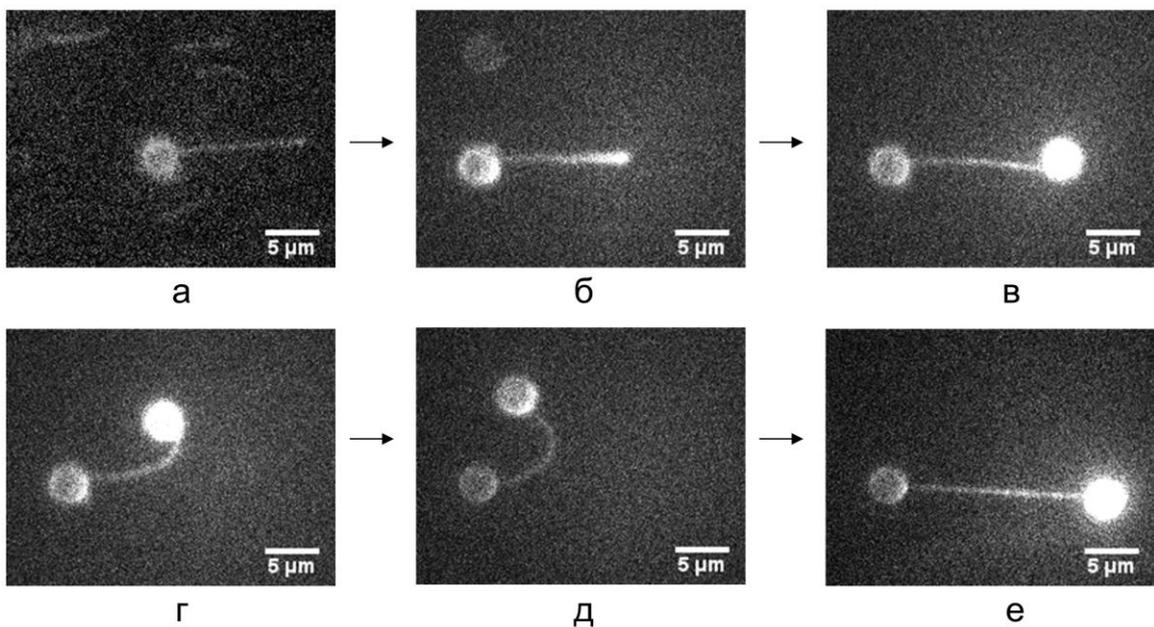


Рис. 2.7. Флуоресцентные изображения процесса прикрепления молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1, к микросферам. А) Прикрепление ДНК к одной из микросфер во втором канале проточной камеры. Б) Перенос микросфер в третий канал, для предотвращения прикрепления дополнительных молекул к микросферам. В) Приведение в контакт второй микросферы и свободного конца ДНК. Г,Д) Проверка закрепления свободного конца ДНК на второй микросфере. Е) Выключение одной из ловушек: молекула ДНК выпрямлена под действием силы, действующей на микросферу со стороны потока.

2.2.4. Динамика изменения длины ДНК при взаимодействии с YOYO-1

Приведенный выше протокол эксперимента по манипуляции одиночными молекулами ДНК был использован для исследования взаимодействия YOYO-1 с ДНК. Для этого в третий канал камеры подавали буферный раствор с повышенной концентрацией $MgCl_2$ (10 мМ), а в четвертый канал – раствор, содержащий 50 нМ YOYO-1 (Рис.2.8).

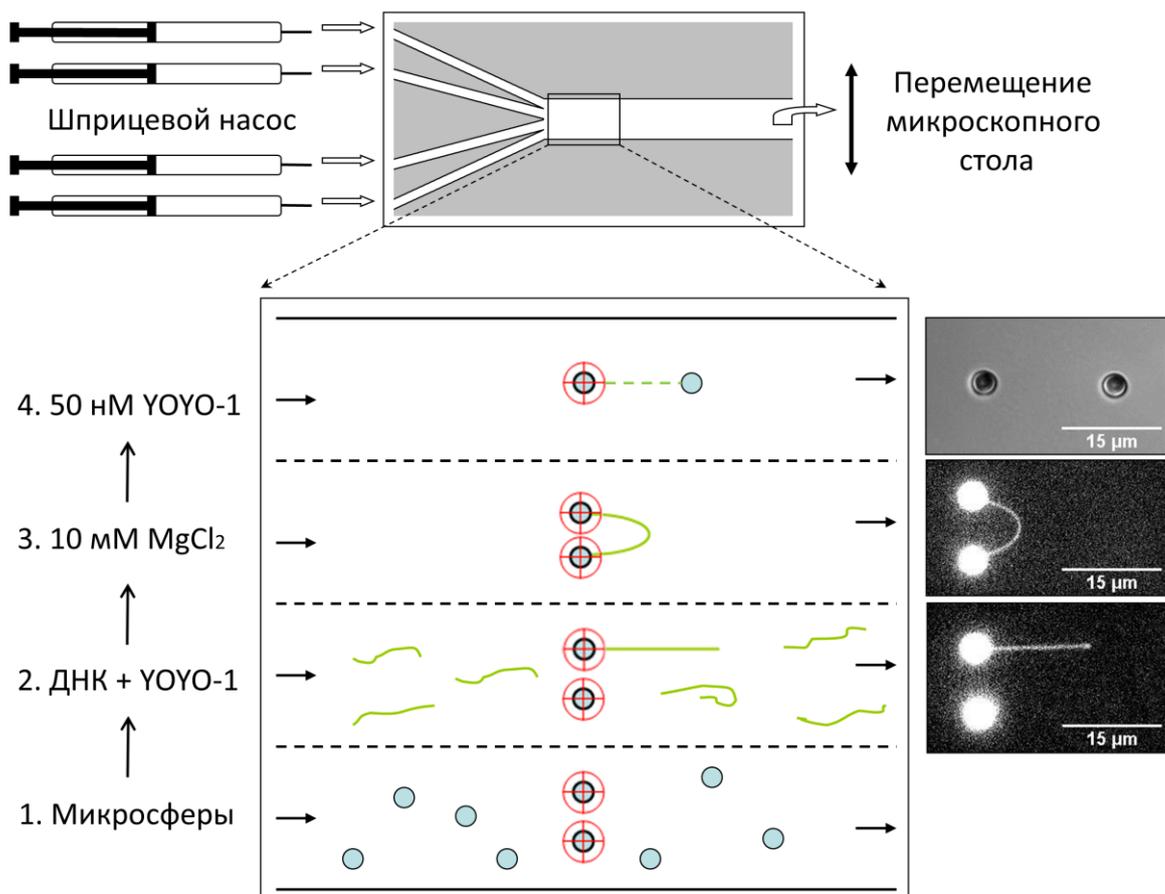


Рис. 2.8. Схема эксперимента по исследованию взаимодействия YOYO-1 с ДНК. В первом канале проточной камеры проводят оптический захват микросфер. Путем перемещения микроскопического стола микросферы переводят во второй канал, содержащий молекулы ДНК, окрашенные YOYO-1, для закрепления ДНК на одной из микросфер. В третьем канале проводят прикрепление ДНК ко второй микросфере. Также за счет повышенной концентрации $MgCl_2$ (10 мМ) в третьем канале происходит диссоциация YOYO-1 от ДНК. Одну из оптических ловушек выключают и полученную конструкцию переводят в четвертый канал,

содержащий 50 нМ YOYO-1, где наблюдается динамика увеличения длины ДНК при взаимодействии с YOYO-1.

В первых трех каналах камеры осуществляли оптический захват двух микросфер и прикрепление к ним молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1. За счет повышенной концентрации $MgCl_2$ в третьем канале в течение 5 минут происходила диссоциация YOYO-1 от ДНК. Процесс диссоциации детектировали по постепенному снижению флуоресцентного сигнала до уровня фона.

Затем микроскоп переводили в режим дифференциального интерференционного контраста, и микросферы перемещали в четвертый канал, содержащий 50 нМ YOYO-1. После этого одну из оптических ловушек выключали путем перекрывания оптического затвора для обеспечения растяжения ДНК с постоянной силой, за счет силы вязкого трения, действующей на отпущенную микросферу. При этом изображения микросфер регистрировали при помощи ПЗС камеры с частотой съемки 1 Гц. Встраивание молекул YOYO-1 приводило к увеличению длины ДНК, что отражалось в увеличении расстояния между микросферами. Полученную серию изображений обрабатывали при помощи программного пакета Fiji ImageJ для вычисления координат центров масс обеих микросфер. Длину молекулы ДНК определяли, как расстояние между центрами масс микросфер за вычетом двойного радиуса микросфер (3 мкм).

Таким образом, была охарактеризована динамика изменения длины ДНК при взаимодействии с YOYO-1 при постоянной силе растяжения ДНК (Рис.2.9). Контурная длина молекулы ДНК бактериофага λ составляет около 16,4 мкм (48502 пар оснований). Длина ДНК увеличилась и составила 22,6 мкм (на 37% больше контурной длины неокрашенной ДНК) при инкубации в 50 нМ растворе YOYO-1. При этом стандартное отклонение индивидуальных измерений длины ДНК составило 27 нм. В начальный момент регистрации молекула ДНК уже является удлиненной. Данный факт указывает на то, что встраивание YOYO-1 начинается мгновенно при внесении ДНК в четвертый канал. Перемещение молекулы ДНК в середину канала, где осуществляется наблюдение, занимает примерно 20 секунд. За это время длина молекулы ДНК успевает увеличиться на 1,1 мкм (6,7 %). В

течение 150 секунд длина ДНК линейно возрастает, после чего процесс интеркаляции YOYO-1 в ДНК выходит в насыщение, и длина ДНК остаётся постоянной. Линейная регрессия первого участка зависимости позволила определить скорость удлинения молекулы ДНК за счёт интеркаляции YOYO-1, которая составила 44 ± 4 нм/сек.

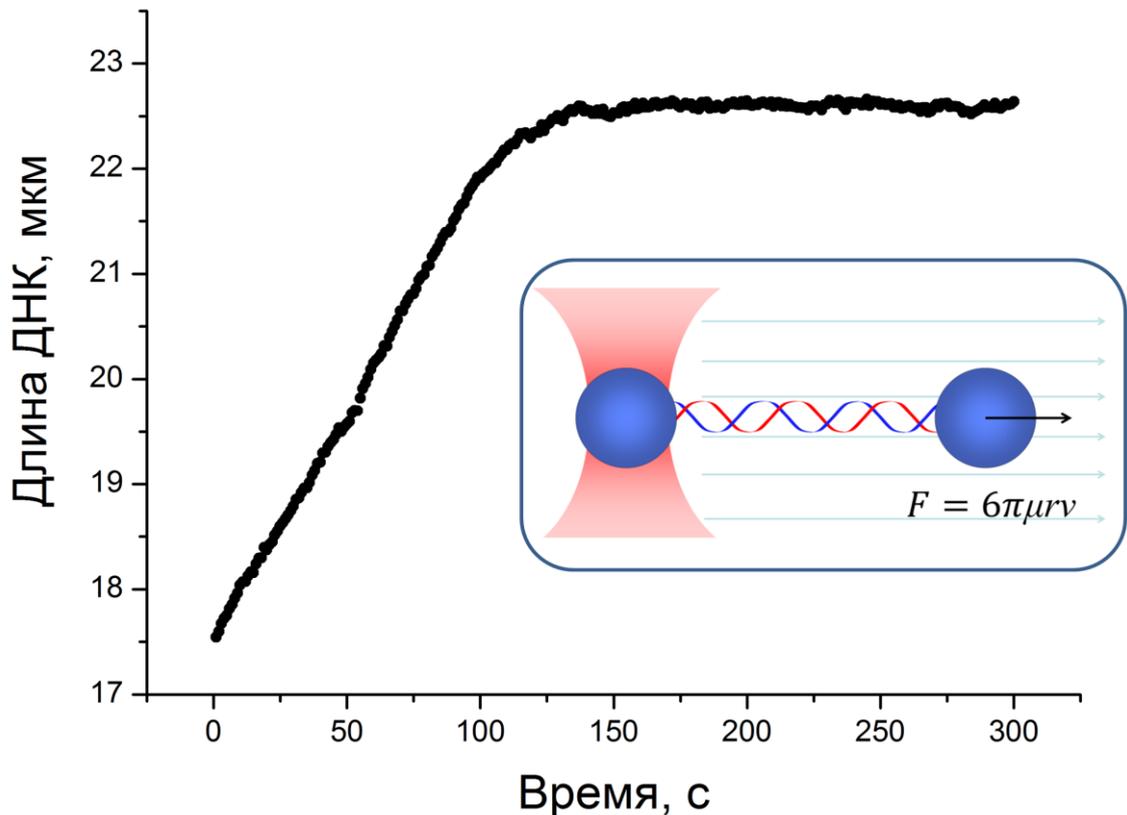


Рис. 2.9. Динамика изменения длины ДНК в присутствии 50 нМ YOYO-1. **Вставка:** выпрямление молекулы ДНК в потоке при выключении одной из оптических ловушек. Одна микросфера находится в оптической ловушке, в то время как вторая растягивает молекулу ДНК за счёт силы вязкого трения, действующей на микросферу, значение которой определяется по закону Стокса ($F=6\pi\mu r v$, где μ – динамическая вязкость жидкости, r – радиус микросферы, v – скорость потока).

2.3. Исследование взаимодействия GelRed с ДНК

Для исследования взаимодействия красителя GelRed с ДНК в протокол эксперимента по манипуляции одиночными молекулами ДНК были внесены изменения. В данном случае прикрепление ДНК к микроферам проводили без окрашивания и визуализации ДНК при помощи YOYO-1. В проточную камеру подавали следующие растворы:

- 1 канал: 0,01% раствор полистироловых микрофер диаметром 3 мкм, покрытых стрептавидином, 300 мкл;
- 2 канал: 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;
- 3 канал: буферный раствор;
- 4 канал: GelRed, 0,02 мкг/мл.

В качестве буферного раствора во всех каналах использовали следующий раствор: Tris 50 мМ (рН 7,5, Amresco), Глицерин 10% (MP Biomedicals).

Для изоляции и манипуляции одной молекулой ДНК выполняли следующие шаги:

1. Путем перемещения микроскопного стола осуществляли фокусировку в середине первого канала проточной камеры на расстоянии 50 мкм от поверхности покровного стекла, после чего проводили оптический захват двух микрофер.
2. Путем перемещения микроскопного стола микроферы переносили в середину второго канала проточной камеры и инкубировали в течение 30 секунд. За это время к микроферам успевает прикрепиться в среднем одна молекула ДНК.
3. После инкубации во втором канале микроферы переносили в третий канал, содержащий буферный раствор. Путем изменения положения пьезо-зеркала микроферу, находящуюся в перемещаемой ловушке, помещали на расстоянии 13 мкм по направлению потока от микроферы в стационарной ловушке. Затем, за счет движения перемещаемой ловушки расстояние между микроферами периодически изменяли в диапазоне 10-16 мкм. В случае отсутствия

прикрепления ДНК к одной или обоим микросферам, изменение положения перемещаемой ловушки не оказывает влияния на положение микросферы в стационарной ловушке. В случае, когда молекула ДНК прикреплена к обоим микросферам, микросферы оказываются «связанными» друг с другом посредством молекулы ДНК. Увеличение расстояния между ними приводит к растяжению молекулы ДНК, что в свою очередь приводит к возникновению силы, смещающей микросферу из центра стационарной ловушки. При достижении расстояния между микросферами более чем 15 мкм наблюдается смещение микросферы из центра стационарной ловушки. Таким образом, по наблюдению связанного движения микросфер регистрировался факт прикрепления обоих концов ДНК к микросферам.

4. При отсутствии связанного движения микросфер лазерные пучки перекрывали при помощи оптических затворов, микросферы выпускали из оптических ловушек, и проводили повторную попытку прикрепления ДНК к микросферам путем выполнения шагов 1-3, указанных выше.

5. В случае успешного прикрепления ДНК к микросферам, перемещаемую ловушку выключали путем перекрывания соответствующего оптического затвора. Таким образом, молекулу ДНК растягивали за счет силы, действующей на отпущенную микросферу со стороны потока. Для микросферы диаметром 3 мкм, находящейся в 10%-ном водном растворе глицерина, движущегося относительно микросферы со скоростью 160 мкм/с, сила вязкого трения составляет порядка 3 пН. При натяжении ДНК бактериофага λ (48502 пар оснований) с силой 3 пН расстояние между ее концами должно составлять около 15,8 мкм. В связи с этим в случае, когда расстояние между микросферами составляло меньше 15,5 мкм, считали, что между микросферами закреплено две или большее количество молекул ДНК, и процедуру прикрепления ДНК к микросферам выполняли заново (шаги 1-3).

После этого микросферы переводили в 4-й канал, содержащий GelRed (0,02 мкг/мл), где проводили регистрацию изменения длины молекулы ДНК, растянутой

с постоянной силой, при взаимодействии с GelRed, аналогично процедуре описанной выше для YOYO-1. Динамика изменения длины ДНК при взаимодействии с GelRed представлена на рис. 2.10. Так же, как и в случае YOYO-1 встраивание красителя приводило к удлинению молекулы ДНК. Длина ДНК до инкубации с GelRed составила $15,77 \pm 0,09$ мкм (среднее значение \pm стандартное отклонение). После инкубации с $0,02$ мкг/мл GelRed длина ДНК увеличилась и составила $21,47 \pm 0,11$ мкм (среднее значение \pm стандартное отклонение). Линейная регрессия первого участка зависимости позволила определить скорость удлинения молекулы ДНК за счёт встраивания GelRed, которая составила 159 ± 2 нм/сек

По окончании удлинения ДНК микроскоп переводили в режим наблюдения флуоресценции для получения флуоресцентного изображения молекулы ДНК, окрашенной GelRed. Получение флуоресцентных изображений ДНК в 4-м канале, содержащем $0,02$ мкг/мл GelRed, было затруднено за счет высокого уровня фонового сигнала флуоресценции. В связи с этим для получения изображения ДНК, окрашенной GelRed, после инкубации в 4-м канале микросферы переводили в 3-й канал, содержащий только буферный раствор, где проводилась регистрация флуоресцентного сигнала в отсутствии фонового свечения GelRed. Для эффективного возбуждения флуоресценции GelRed, связанного с ДНК, мощности ртутной лампы оказалось недостаточно. В связи с этим для возбуждения флуоресценции GelRed использовали твердотельный лазер с длиной волны 523 нм. Флуоресцентное изображение молекулы ДНК, полученное в данных условиях представлено на рис.2.10.

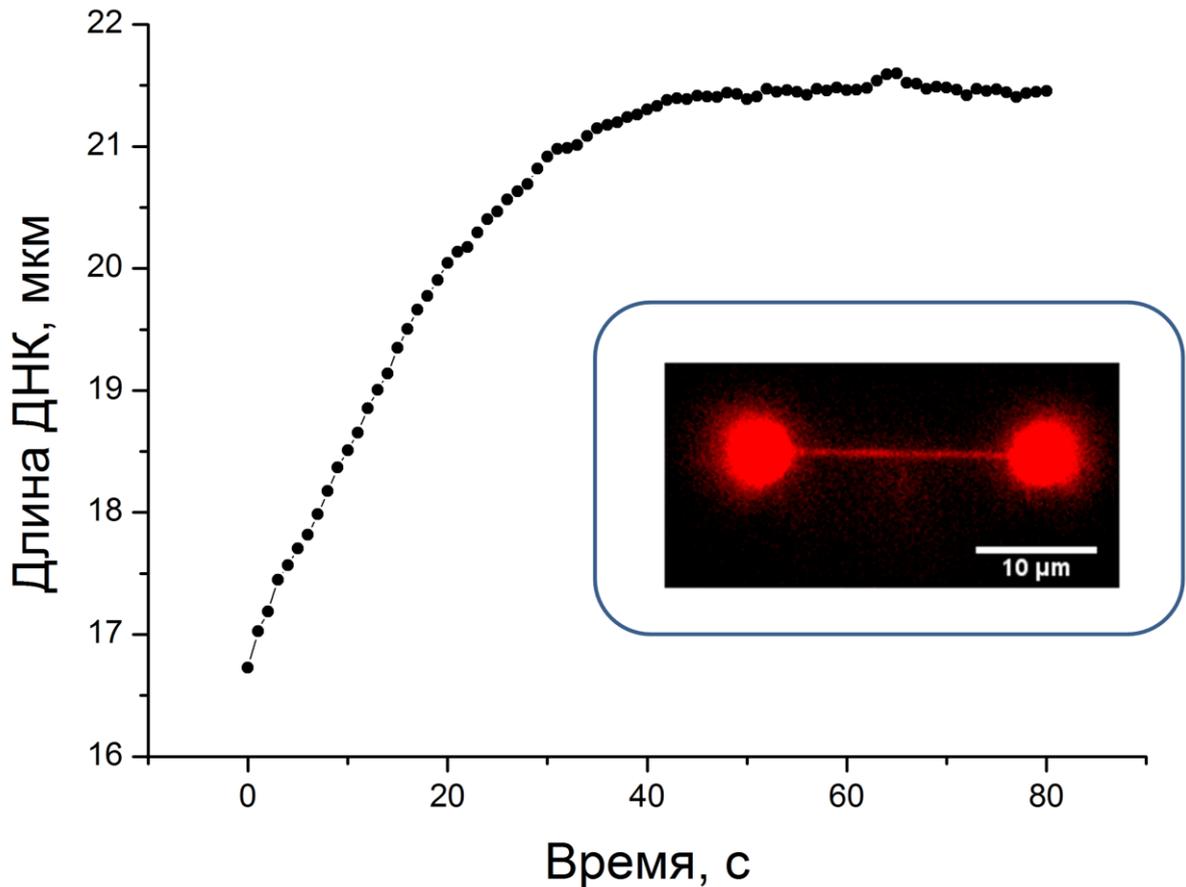


Рис. 2.10. Динамика изменения длины ДНК в присутствии GelRed (0,02 мкг/мл). Вставка: флуоресцентное изображение молекулы ДНК, окрашенной GelRed.

2.4. Заключение по результатам исследований взаимодействия красителей YOYO-1 и GelRed с ДНК

Представленные в данной главе протоколы манипуляции одиночными молекулами ДНК с использованием и без использования флуоресцентного окрашивания ДНК были успешно применены для исследования особенностей взаимодействия ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed. В данном случае YOYO-1 был использован как известный ДНК связывающий агент, встраивание которого приводит к увеличению длины ДНК за счет интеркалирования молекулы красителя между парами оснований ДНК. Полученные данные об изменении длины ДНК в присутствии YOYO-1 находятся в согласии с ранее опубликованными данными, полученными другими одномолекулярными методами [145], что свидетельствует о работоспособности разработанного экспериментального подхода. Кроме того,

стоит отметить, что данные о динамике удлинения ДНК в присутствии YOYO-1, полученные в ходе данной работы, обладают существенно большей точностью, нежели существующие литературные данные [145].

В ходе работы было впервые исследовано влияние красителя GelRed на механические свойства ДНК. Результаты исследования показали, что связывание GelRed, как и в случае YOYO-1, приводит к увеличению длины ДНК. Насыщение процесса удлинения ДНК в случае с GelRed наступает за меньшее время, по сравнению с YOYO-1 (около 50 секунд и 150 секунд соответственно). Однако конечная длина ДНК, измеренная в ходе инкубации с GelRed (0,02 мкг/мл), оказалась на 1,1 мкм меньше конечной длины ДНК, полученной в ходе инкубации с YOYO-1 (50 нМ). Таким образом, полученные данные позволяют сделать предположение об интеркалирующих свойствах красителя GelRed.

В данной главе также были представлены результаты экспериментов по флуоресцентной визуализации одиночных молекул ДНК при помощи красителей YOYO-1 и GelRed. Было продемонстрировано, что оба красителя могут быть использованы для визуализации отдельных молекул ДНК. Однако использование YOYO-1 для этой цели является более предпочтительным по сравнению с GelRed, так как для наблюдения флуоресценции молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1, требуется менее мощный источник света для возбуждения флуоресценции. Также, в отличие от GelRed, в случае YOYO-1 визуализацию ДНК можно осуществлять в растворе с большой фоновой концентрацией красителя (200 нМ). В случае GelRed для эффективной визуализации молекулы ДНК требуется перевести окрашенную молекулу в раствор, не содержащий краситель, для уменьшения фонового свечения GelRed.

Глава III. Особенности взаимодействия ДНК с белком TIP49a.

3.1 Обзор литературы по белку TIP49a

TIP49A и его гомолог TIP49B представляют собой эволюционно высококонсервативные эукариотические белки, принадлежащие к суперсемейству AAA+ АТФаз. Данный класс АТФаз представлен во всех видах живых организмов и включает в себя ДНК-зависимые АТФазы, шапероны и протеазы. Белки AAA+ зачастую формируют гексамерные структуры в виде кольца. Характерной особенностью AAA+ белков является наличие высококонсервативных мотивов Уокер А и Уокер В, ответственных за связывание и гидролиз нуклеотидов соответственно [65, 190]. Связывание и гидролиз АТФ зачастую вызывают конформационные изменения, необходимые для транслокации или реконфигурации субстратов [2, 44, 83].

TIP49A и TIP49B были обнаружены в конце 20 – начале 21 века в результате независимых исследований в различных организмах, в связи с чем существует целый ряд различных наименований данных белков (Pontin и Reptin, RUVBL1 и RUVBL2, TAP54a, Tih1p, p50, NMP238, ECP54) [9, 87, 88, 141, 150, 198]. Белки семейства TIP49 являются необходимыми для жизнедеятельности дрожжей и высших эукариот и участвуют в сложной сети белок-белковых взаимодействий, а также являются участниками различных белковых комплексов. На данный момент установлено, что белки TIP49a и TIP49b вовлечены в широкий спектр клеточных процессов (рис.3.1), например, таких как ремоделирование хроматина [25, 131, 155, 187], регуляция транскрипции [86, 119, 129], биогенез малых ядрышковых рибонуклеопротеиновых комплексов (snoRNP) [95, 126, 194, 195], митоз [41, 55, 158], онкогенная трансформацию клеток [12, 20, 45], а также образование активного комплекса теломеразы [184]. TIP49a и TIP49b также играют важную роль в канцерогенезе. Нарушение функции этих белков приводит к онкологической трансформации клеток человека (рак желудка, гепатокарцинома, рак простаты и др.) [61, 101, 102]. Однако, каким образом пара этих

консервативных белков может принимать участие в таком большом диапазоне биологических процессов, до сих пор остается в значительной степени неизвестным.

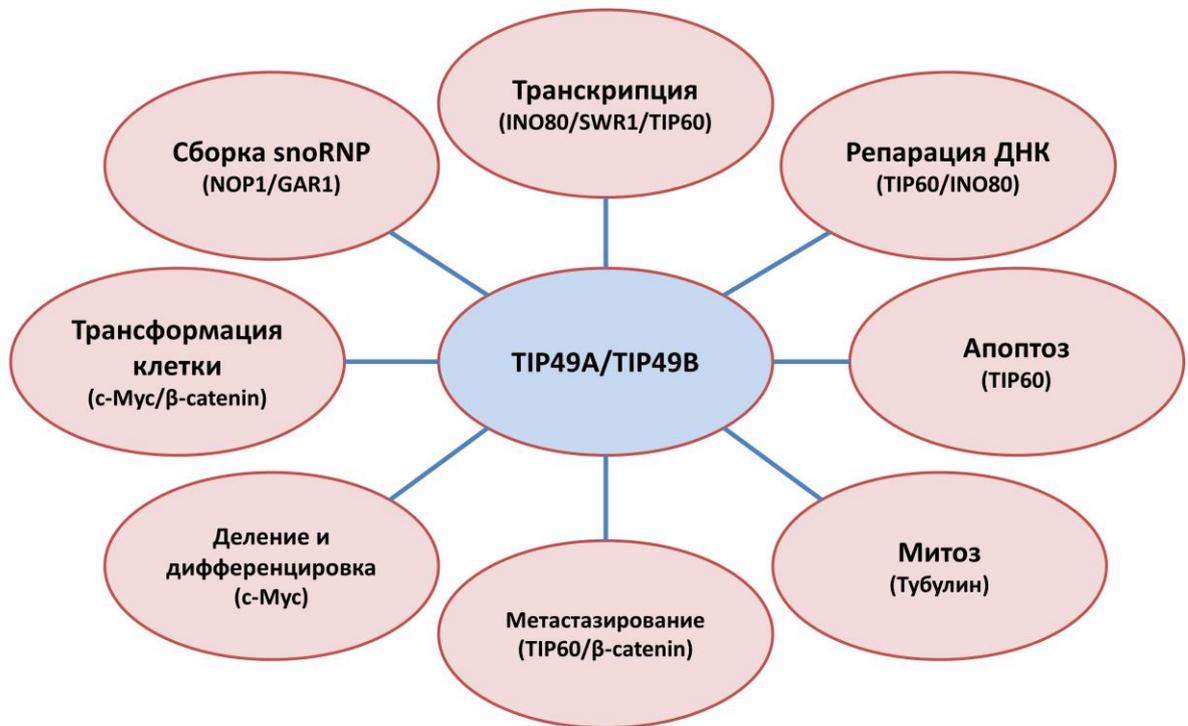


Рис.3.1. TIP49A и TIP49B вовлечены во множество клеточных процессов.

Белки семейства TIP49 участвуют: 1) в транскрипции, регулируя функции комплексов INO80, SWR1 и TIP60; 2) в репарации ДНК, являясь компонентами INO80 и TIP60; 3) в сборке малых ядрышковых нуклеопротеинов (snoRNP), оказывая влияние на формирование малой ядрышковой РНК (snoRNA); 4) в клеточной трансформации, регулируя функции с-Мус и β-катенина; 5) в метастазировании злокачественных опухолей, регулируя экспрессию KAI1 посредством участия в комплексах TIP60 и β-катенин; 6) в апоптозе, посредством участия в комплексе TIP60; 7) в митозе, регулируя сборку микротрубок; 8) в делении и дифференцировке клеток, регулируя функции с-Мус [84].

Белки TIP49A и TIP49B человека состоят из последовательности 456 и 463 аминокислот соответственно и в основном локализуются в ядре, но также присутствуют в цитозоле [74, 150]. И TIP49A и TIP49B примерно на 30% гомологичны бактериальному белку RuvB, ферменту, который в комплексе с

белками RuvA и RuvC осуществляет разрешение холидееских структур, образуемых в ходе гомологичной рекомбинации и репарации повреждений ДНК (подробнее о процессе гомологичной рекомбинации указано в главе, посвященной белку RecA) [37, 38].

На основании данных о пространственной структуре в последовательности белка TP49A можно выделить 3 домена (рис.3.2.А, Б): N-концевой домен, характерный для белков AAA+; домен-вставку длиной 170 аминокислотных остатков, уникальный для белков TP49 и структурно схожий с ДНК-связывающим доменом белка RPA (эукариотического белка, связывающего однонитевую ДНК) и С-концевой домен, также характерный для семейства AAA+. N-концевой и С-концевой домены содержат высококонсервативные мотивы Уокер А и Уокер В, ответственные за связывание и гидролиз АТФ, а также мотивы сенсор I и сенсор II, необходимые для определения связывания ди- и трифосфатов соответственно. Белок TP49A способен образовывать гомогексамерные комплексы, состоящие из мономеров TP49A, гетерогексамеры, состоящие из мономеров TP49A и TP49B, а также додекамеры, состоящие из двух гексамерных колец (рис.3.2.Б, В). При этом так называемый аргининовый “палец”, остаток аргинина, принимающий участие в гидролизе АТФ, находится вблизи АТФ-связывающего сайта соседней субъединицы, координируя гидролиз АТФ между субъединицами в рамках гексамера [113, 137]. Такой способ связывания АТФ между двумя структурными доменами белка, который обеспечивает доступ соседних субъединиц в гексамерном кольце (через остаток аргинина) к месту связывания АТФ, является характерным для белков семейства AAA+ [34, 85, 89, 147].

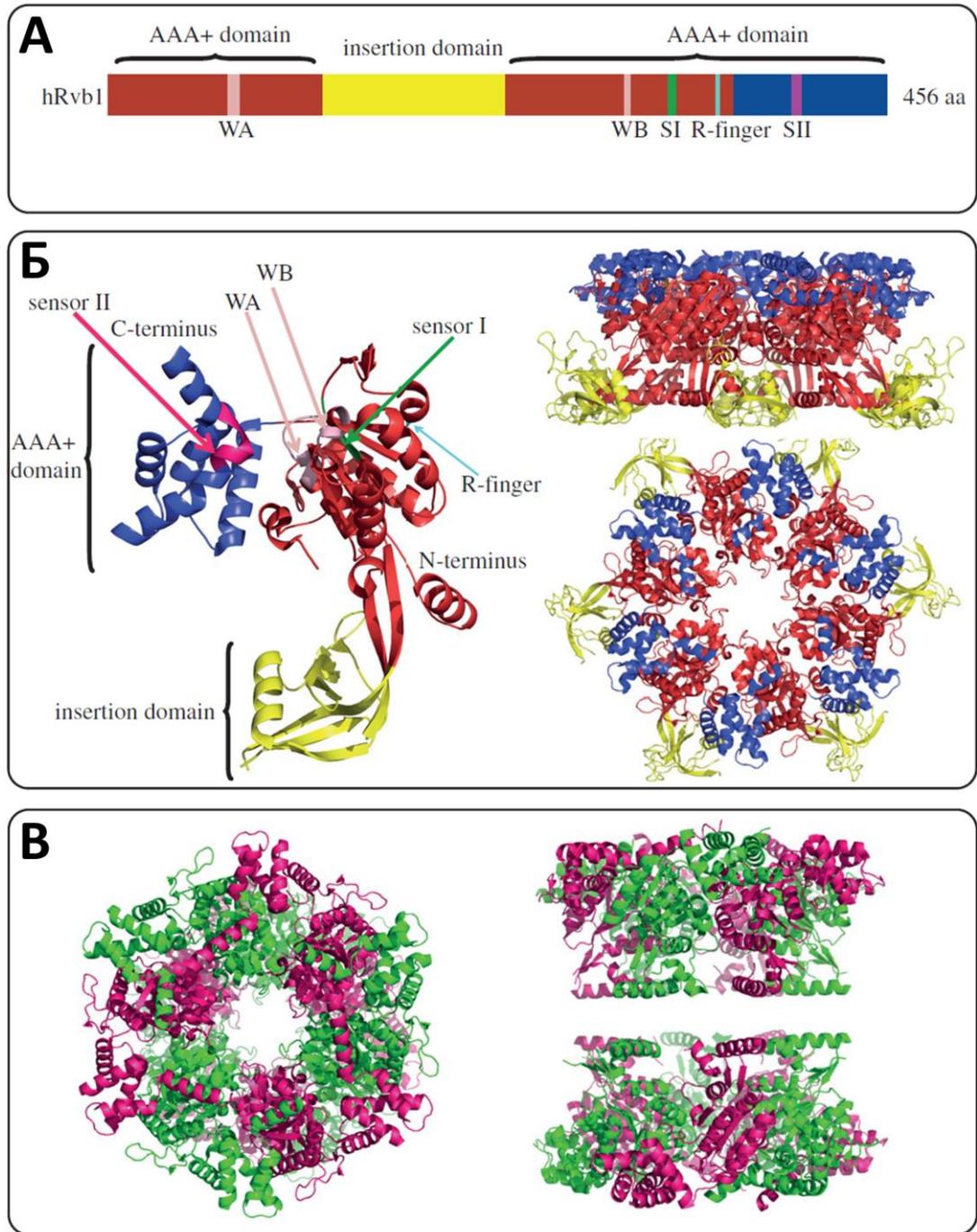


Рис.3.2. Структура белка TIR49A. А) Организация доменов белка TIR49A человека: красным и синим цветом соответственно показаны N-концевой и C-концевой домены, характерные для AAA+ АТФаз; желтым цветом показан домен-вставка, уникальный для белков TIR49. Также, обозначены консервативные мотивы АТФ-связывающего сайта, характерные для AAA+ АТФаз: WA, Уокер А; WB, Уокер В; SI, сенсор I; SII, сенсор II; R-finger, аргининовый “палец”. Б) Слева: кристаллическая структура мономера TIR49A человека; справа: вид сбоку и сверху гексамера TIR49A человека. Цветовые обозначения доменов соответствуют

(А). В) Вид сверху и сбоку структуры додекамерного комплекса TIP49A/TIP49B человека, полученной для белков TIP49 с усеченным доменом-вставкой. Мономеры TIP49A обозначены зеленым цветом, мономеры TIP49B – розовым [124].

Недавние исследования структур хроматин ремоделирующих комплексов INO80 и SWR-C выявили присутствие белков TIP49A и TIP49B в рамках этих комплексов в форме гексамеров и додекамеров [127, 171, 193]. При этом в гексамерном кольце белки располагаются в чередующемся порядке TIP49A-TIP49B. Так как, белки TIP49 составляют существенную часть данных хроматин ремоделирующих комплексов и необходимы для их биологической активности, можно предположить, что TIP49A и TIP49B непосредственно взаимодействуют с ДНК. Действительно, в работе [113] была показана слабая ДНК-связывающая активность белка TIP49A. Также, существуют противоречивые свидетельства о том, что белки TIP49 являются ДНК-геликазами [60, 87, 95, 132]. Однако, на данный момент устоявшейся модели взаимодействия белков TIP49 с ДНК нет. В связи с этим, одной из целей данной работы являлось исследование взаимодействия TIP49A с ДНК на одномолекулярном уровне при помощи комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии.

3.2. Взаимодействия ДНК с TIP49a

Для проведения экспериментов по исследованию взаимодействия TIP49a с ДНК белок экспрессировали в клетках *E.coli* согласно следующему протоколу.

3.2.1. Протокол экспрессии, выделения и очистки белка TIP49a

Вектор pET3a-TIP49a, несущий ген TIP49a с his-tag (последовательность из шести гистидинов) на N-конце белка, был получен от Григорьева М. Ю. (Universite de Toulouse;Toulouse, Laboratoire de Biologie Moleculaire Eucaryote, Франция). Для наработки белка TIP49a использовали бактериальную экспрессионную систему на

основе рЕТ-векторов и штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3), позволяющую экспрессировать до 50% необходимого белка от всех клеточных белков. Профаг λ DE3, присутствующий в штамме BL21 (DE3), содержит ген, кодирующий Т7 РНК-полимеразу под контролем lac-UV5 промотора. В плазмиде рЕТ3а ген, который необходимо экспрессировать, помещают под контроль Т7-промотора. Индукция IPTG приводит к экспрессии Т7-полимеразы и синтезу клонированного в плазмиду рЕТ3а гена.

Несколько клонов клеток BL21 (DE3), трансформированных вектором рЕТ3а-ТIP49а, наращивали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), до оптической плотности 0,6 оптических единиц при длине волны 595 нм. Экспрессию белка ТIP49а индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ. Для сохранения плазмиды в индуцируемых клетках в среду дополнительно добавляли ампициллин (50 мкг/мл) одновременно с введением индуктора экспрессии. Затем культуру клеток инкубировали при температуре 25°C в течение трех часов, после чего клетки осаждали центрифугированием 3500 g при +4 °C и замораживали с последующим хранением при -80 °C.

Экспрессию белка ТIP49а разными клонами клеток BL21 (DE3), содержащих вектор рЕТ3а-ТIP49а, анализировали с помощью электрофоретического разделения белков в 10% денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-PAGE) с последующим окрашиванием Кумасси (0,25 % красителя G250, 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты). Для дальнейшей работы был отобран клон с максимальным уровнем экспрессии ТIP49а.

Клетки BL21 (DE3), содержащие вектор рЕТ3а-ТIP49а, выбранного клона наращивали и индуцировали в объеме 3000 мл среды LB. После трехчасовой инкубации клетки осаждали центрифугированием при +4 °C и осадок замораживали. Все последующие стадии проводили при +4 °C.

Осадок размораживали на льду в течение 15 минут, затем растворяли его до гомогенного состояния в лизисном буфере: 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 1 мг/мл лизоцима, 1 мМ PMSF, 5 мМ β -меркаптоэтанол и инкубировали в течение получаса. Для фрагментирования хромосомной ДНК и

окончательного разрушения бактериальных мембран суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 4 раза по 30 секунд и осаждали центрифугированием в течение получаса при 15000 g. Надосадочную жидкость наносили на предварительно подготовленную колонку HisTrap HP, Ni-Сефароза, объемом 1 мл. Перед нанесением надосадочной жидкости, содержащей раствор бактериальных белков, колонку уравнивали 20 мл лизисного буфера (без лизоцима).

После нанесения надосадочной жидкости колонку промывали 5 мл буфера содержащего 50 mM NaH_2PO_4 (pH 8,0), 300 mM NaCl , 5 mM β -меркаптоэтанола, 5 мл аналогичного буфера с 20 mM имидазола и 5 мл буфера с 50 mM имидазола. Белок TP49a элюировали с колонки буфером, содержащим 250 mM имидазола двумя фракциями по 500 мкл. После этого колонку промывали буфером с 500 mM имидазола. Полученные фракции анализировали при помощи электрофоретического разделения белков в 10% денатурирующем ПААГ, окрашенном реактивом Кумасси (Рис.3.3). Для дальнейших экспериментов использовали вторую фракцию, полученную при промывании колонки буфером с 250 mM имидазола, которую диализовали против буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM DTT, 10% глицерина и 150 mM KCl . Затем полученный белок разделяли на алиquotы по 20 мкл и замораживали в жидком азоте с последующим хранением при температуре -80°C .

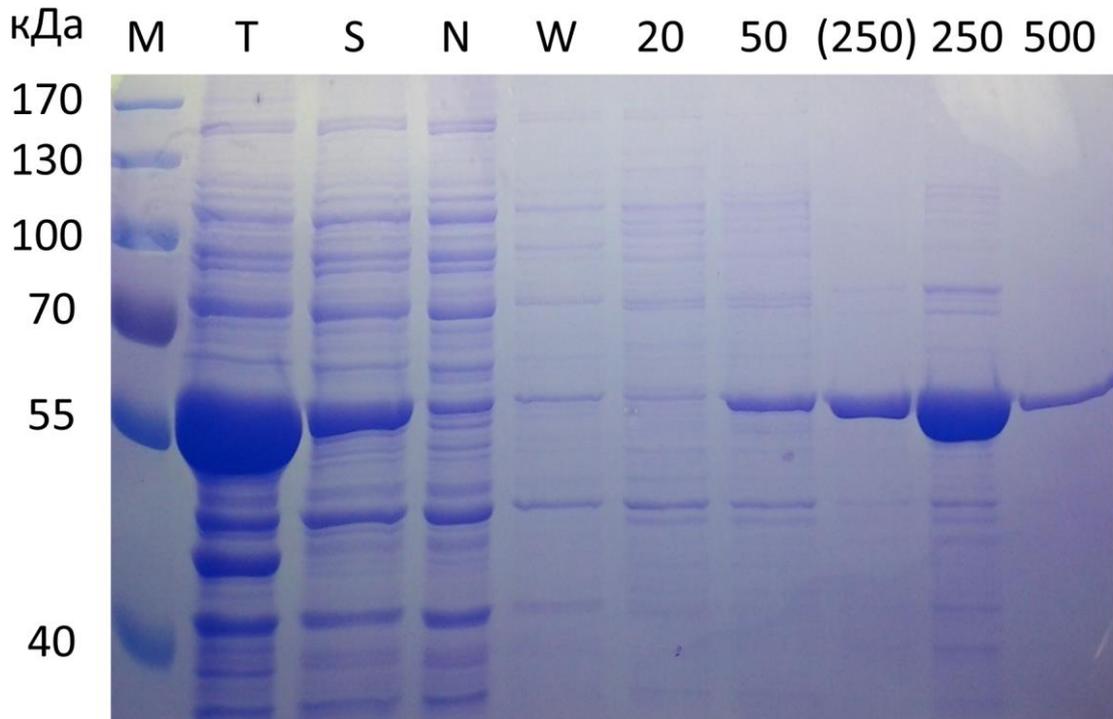


Рис. 3.3. Экспрессия и очистка белка TIP49a. Фотография электрофоретического разделения белков в 10% денатурирующем ПААГ, окрашенном реактивом Кумасси. М – молекулярный маркер; Т – субклеточная фракция белков, полученных при лизисе клеток; S – растворимая субклеточная фракция белков, которую наносили на колонку HisTrap; N – фракция белков, не связавшихся с колонкой HisTrap; W - фракция белков после промывания колонки буфером без имидазола; 20, 50, (250), 250, 500 - фракции белков после промывания колонки буфером с соответствующей концентрацией имидазола: 20 мМ, 50 мМ, 250 мМ, 250 мМ, 500 мМ.

3.2.2. Исследование взаимодействия ДНК с TIP49a

На первом этапе для исследования взаимодействия ДНК с TIP49a применяли схему эксперимента, аналогичную ранее использованной для исследования взаимодействия ДНК с GelRed (глава II). Эксперимент проводили в четырехканальной микрофлюидной камере, в каналы которой подавали следующие растворы (по 300 мкл):

1 канал: 0,01% раствор полистироловых микросфер диаметром 5 мкм, покрытых

стрептавидином;

2 канал: 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;

3 канал: буферный раствор;

4 канал: раствор белка TIR49a, 300 нМ.

В качестве буферного раствора во всех каналах использовали следующий раствор: Tris 50 мМ (pH 7,5, Amresco), Глицерин 10% (MP Biomedicals).

В первых трех каналах проточной камеры осуществляли прикрепление молекулы ДНК к двум микросферам. Затем одну из оптических ловушек выключали для приложения к ДНК постоянной силы, действующей на отпущенную микросферу со стороны потока. Полученную конструкцию переводили в четвертый канал, содержащий 500 нМ TIR49a, и осуществляли регистрацию длины ДНК, измеряя расстояние между микросферами. Наблюдение за длиной молекулы ДНК, помещенной в раствор TIR49a, проводили в течение длительного времени (каждую молекулу инкубировали более 10 минут), однако изменений длины ДНК, превышающих точность определения длины (30 нм), не было зарегистрировано. Неоднократные (более 3 раз) повторения эксперимента, а также проведение экспериментов с повышенной концентрацией TIR49a (500 нМ и 1 мкМ) показали аналогичный результат. Вследствие этого был сделан вывод о том, что либо TIR49a не взаимодействует с ДНК в данных экспериментальных условиях, либо взаимодействие TIR49a с ДНК не приводит к изменению длины ДНК.

Для дальнейшего исследования взаимодействия TIR49a с ДНК использовали комбинацию методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии. Для флуоресцентной визуализации процесса взаимодействия TIR49a с ДНК был синтезирован белок слияния TIR49a - Dendra2 (His-tag-Dendra2-TIR49a, рис.3.4). Экспрессию, выделение и очистку белка слияния Dendra2-TIR49a (далее НДТ) проводили аналогично протоколу экспрессии, выделения и очистки белка TIR49a, приведенному выше. Dendra2 представляет собой фотопереключаемый флуоресцентный белок, найденный в коралле дендронефтия (*Dendronephthya sp.*).

В данной работе фотопереклюаемые свойства Dendra2 не использовали, однако, фотопереключение Dendra2 может быть в перспективе использовано для получения флуоресцентных изображений с субдифракционным разрешением. Максимум возбуждения флуоресценции Dendra2 (до фотопереключения) приходится на 490 нм, при этом максимум эмиссии флуоресценции соответствует длине волны 507 нм (рис.3.4).

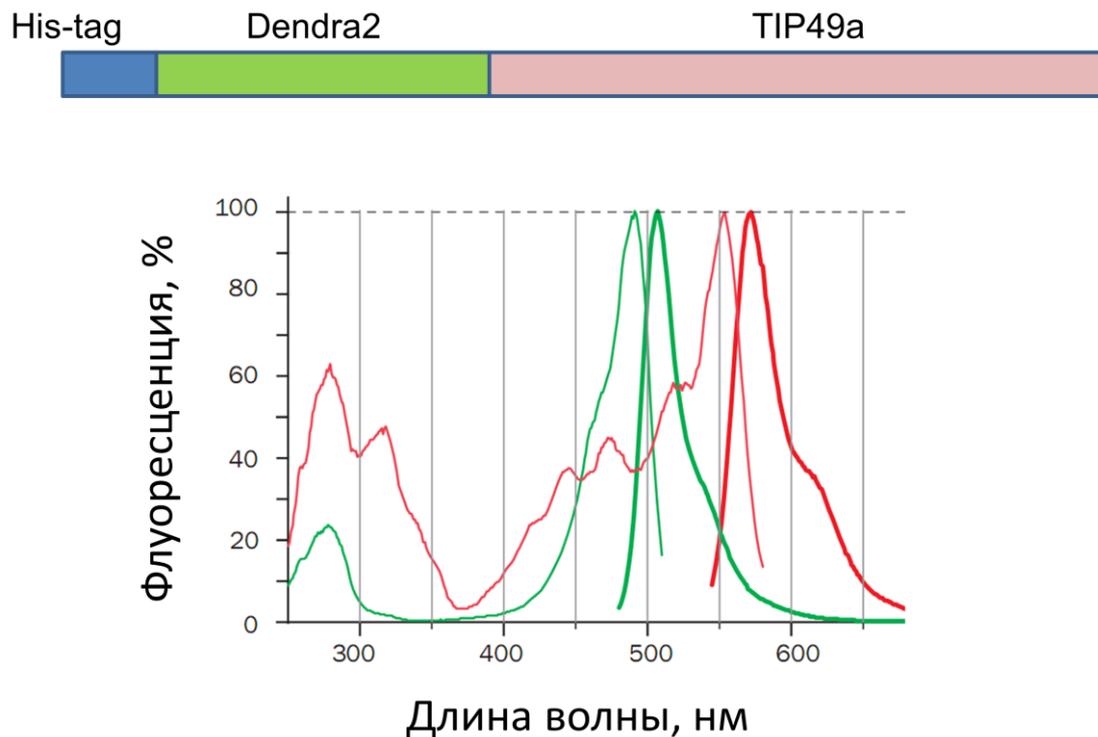


Рис. 3.4. Схема генетической конструкции His-tag – Dendra2 – TIP49a. Спектры поглощения и флуоресценции двух состояний флуоресцентного белка Dendra2 (до фотопереключения – зеленый, после – красный).

При проведении эксперимента в каналы микрофлюидной камеры подавали следующие растворы (по 300 мкл):

- 1 канал: 0,01% раствор полистироловых микросфер диаметром 5 мкм, покрытых стрептавидином;
- 2 канал: 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;
- 3 канал: буферный раствор;
- 4 канал: раствор белка-слияния НДТ, 300 нМ.

В качестве буферного раствора во всех каналах использовали следующий раствор: Tris 50 мМ (рН 7,5, Amresco), Глицерин 10% (MP Biomedicals).

В первых трех каналах осуществляли прикрепление молекулы ДНК к двум микросферам. В третьем канале микросферы располагали на расстоянии 16 мкм друг от друга для натяжения ДНК с силой порядка 5 пН. После этого микросферы переводили в 4 канал, содержащий 300 нМ НДТ. После инкубации в четвертом канале в течение 2 минут микросферы переносили в третий канал, микроскоп переводили в режим наблюдения флуоресценции с использованием набора фильтров Alexa 488, и регистрировали флуоресцентные изображения НДТ, связавшегося с молекулой ДНК при помощи ПЗС-камеры. После этого процедуру инкубации ДНК в четвертом канале повторяли снова. Флуоресцентные изображения молекул ДНК, полученные после инкубации в растворе, содержащем НДТ, представлены на рис.3.5.

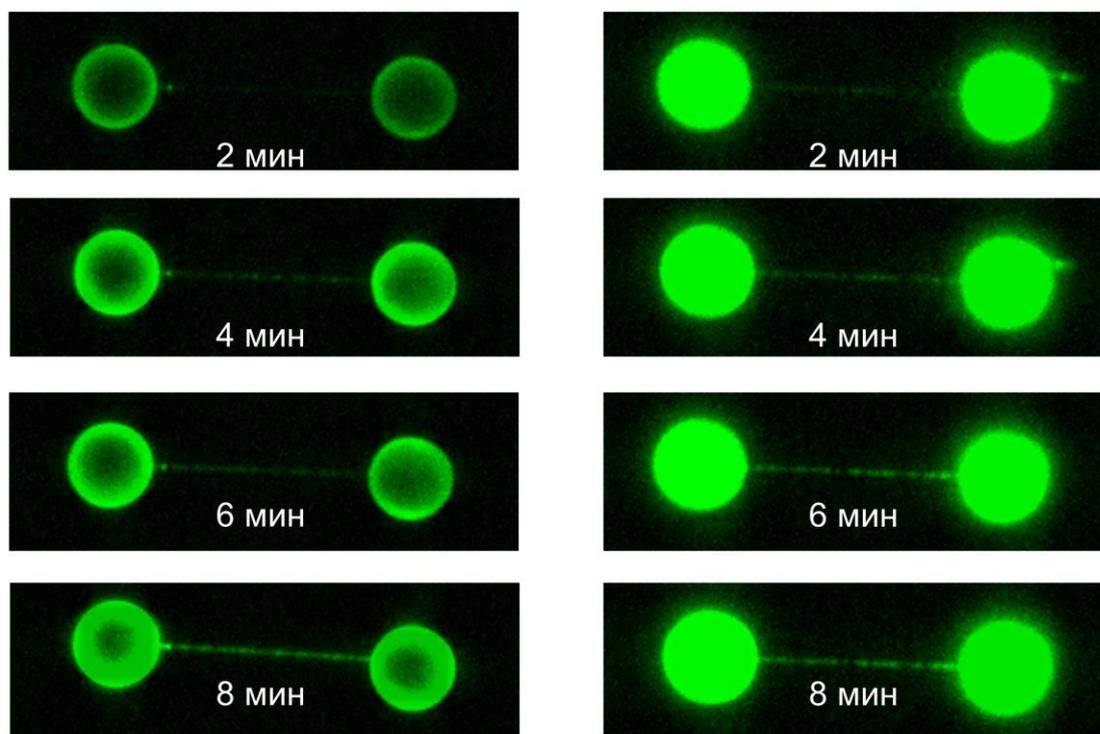


Рис. 3.5. Флуоресцентные изображения одиночных молекул ДНК после инкубации в растворе с флуоресцентно-меченным белком TIR49a.

С увеличением времени инкубации ДНК в четвертом канале наблюдается усиление флуоресцентного сигнала белка НДТ, связанного с ДНК. При этом

наблюдается постепенное увеличение степени покрытия ДНК белком НДТ. Данное наблюдение свидетельствует о способности белка ТР49а взаимодействовать с ДНК в данных экспериментальных условиях. Распределение НДТ по ДНК представляется в значительной степени гомогенным, что позволяет сделать предположение о том, что ТР49а образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК. Также равномерность распределения ТР49а позволяет сделать предположение о том, что взаимодействие ТР49а с ДНК преимущественно происходит за счет связывания мономеров ТР49а или олигомеров ТР49а определенной молекулярной массы. Однако, в ходе изучения связывания ТР49а с ДНК, также наблюдали связывание с ДНК объектов, интенсивность флуоресценции которых превышает, среднюю интенсивность флуоресценции НДТ, связанного с ДНК (рис.3.6). Данный факт свидетельствует о том, что различные олигомерные формы белка ТР49а также способны взаимодействовать с ДНК.

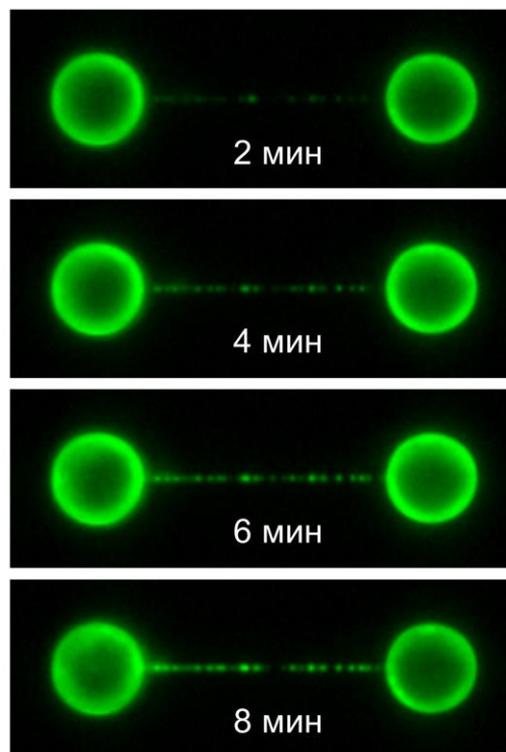


Рис. 3.6. Флуоресцентные изображения молекулы ДНК после инкубации в растворе с флуоресцентно-меченным белком ТР49а.

Глава IV. Особенности взаимодействия белка RecA с ДНК

4.1. Обзор литературы по белку RecA

Клеточная ДНК постоянно подвержена спонтанным повреждениям. Аккуратное восстановление таких повреждений необходимо для поддержания жизнедеятельности организмов, так как в противном случае быстрое накопление мутаций может привести к гибели организма или его потомков. В связи с этим значительная часть ресурсов клетки затрачивается на проведение целого ряда процессов, которые обеспечивают своевременную репарацию повреждений ДНК [123, 196].

Среди различных типов повреждений одним из наиболее опасных является возникновение двунитевых разрывов ДНК, так как потенциально это может привести к фрагментации хромосом и реорганизации генома, что негативно отражается на жизнедеятельности клетки и в многоклеточных организмах существенно повышает риск появления злокачественных новообразований [72, 82]. Двунитевые разрывы ДНК могут вызывать различные факторы, например, внутриклеточные метаболиты, окисляющие агенты, ионизирующее излучение, ошибки, возникающие в ходе репликации.

Для восстановления двунитевых разрывов клетки используют два механизма: негомологичное соединение концов и гомологическую рекомбинацию. В процессе негомологичного соединения концов происходит объединение двух поврежденных концов ДНК и их сшивка при помощи ДНК-лигазы [35]. Зачастую это сопровождается потерей нескольких нуклеотидов в месте репарации, что неизбежно вносит мутации в генетический код. Восстановление двунитевых разрывов в ходе гомологической рекомбинации, напротив, позволяет аккуратно устранить повреждение ДНК без изменения исходной последовательности нуклеотидов [108].

4.1.1. Гомологическая рекомбинация

Гомологическая рекомбинация является консервативным механизмом, который используется во всех известных видах живых организмов для аккуратного восстановления двунитевых разрывов ДНК. Необходимым условием для проведения гомологической рекомбинации является наличие неповрежденной копии ДНК, в связи с чем, данный процесс активно происходит во время и после репликации, когда в качестве образца для восстановления поврежденной ДНК может быть использован гомологичный участок неповрежденной копии [71]. Основным механизмом гомологической рекомбинации можно разделить на три этапа, которые схожи для всех видов живых организмов (Рис.4.1) [200].

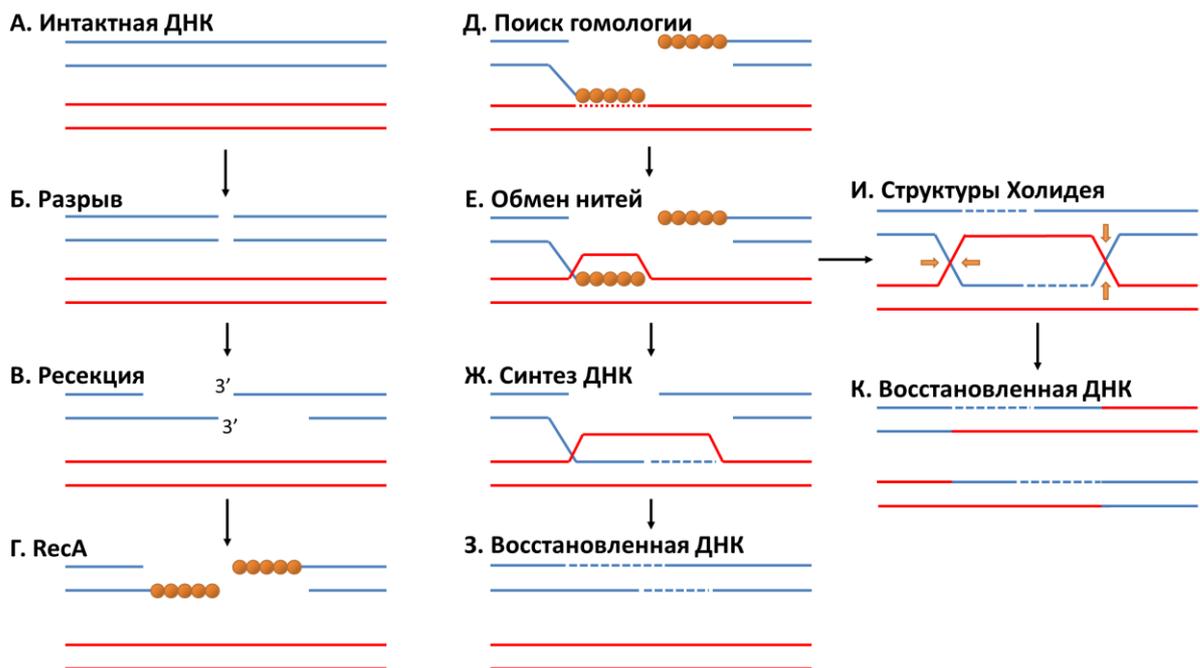


Рис. 4.1. Схема восстановления двунитевого разрыва ДНК с помощью механизма гомологической рекомбинации. А) Интактная ДНК. Б) Двунитевой разрыв в одной из копий ДНК. В) Ресекция поврежденных концов ДНК с образованием 3'-однонитевых участков, Г) на которых формируются филаменты RecA. Д) ДНК-белковый филамент выполняет поиск гомологичной последовательности на неповрежденной копии ДНК и Е) катализирует реакцию обмена нитей. Ж) Достаивание внедренной нити ДНК. З) Извлечение достроенной нити из гетеродуплекса и восстановление поврежденной молекулы.

И) Альтернативный вариант: образование структур Холидея и К) обмен участками между гомологичными молекулами ДНК в результате восстановления поврежденной ДНК [200].

В случае прокариот на первой стадии гомологической рекомбинации (пресинапсис) белок RecA формирует спиральные филаменты на однонитевых 3'-концах ДНК, образованных в процессе деградации 5'-концов в месте двунитевого разрыва ДНК [24] (Рис.4.1(А-Г)). В бактерии *Escherichia coli* высвобождение однонитевых 3'-концов ДНК для посадки RecA может осуществляться независимо по крайней мере двумя различными группами белков [3]. В одном случае однонитевые 3'-концы ДНК формируются в результате работы комплекса RecBCD, обладающего геликазной и нуклеазной активностями, а также способствующего связыванию RecA с ДНК [159, 162, 196]. Также, независимо от RecBCD, формирование 3'-концов ДНК и построение филамента RecA может осуществляться в результате работы целого ряда ферментов: геликазы RecQ, экзонуклеазы RecJ [66, 122], а также комплекса RecFOR, способствующего формированию филамента RecA [63, 121, 174].

На второй стадии гомологической рекомбинации (синапсис), сформированный на однонитевой ДНК филамент RecA осуществляет поиск гомологичного участка на неповрежденной копии ДНК (Рис.4.1(Д)). При нахождении такого участка, RecA катализирует реакцию обмена нитями, в результате чего происходит локальное расплавление дуплекса неповрежденной копии ДНК, и образование так называемого гетеродуплекса, в рамках которого однонитевой участок поврежденной ДНК замещает идентичный участок неповрежденной копии (Рис.4.1 (Е)) [29, 31, 199].

На третьей стадии гомологической рекомбинации (постсинапсис) происходит синтез ДНК (Рис.1.13(Ж)) и разрешение образованных гетероструктур ДНК, которое в свою очередь может осуществляться двумя способами. В одном случае происходит образование структур Холидея, которые представляют собой две гомологичные двунитевые молекулы ДНК, нити которых переплетены, образуя

крестообразную структуру (Рис.4.1(И)). Такие структуры могут перемещаться вдоль ДНК в процессе миграции точек ветвления ДНК в результате работы геликазы RecG [154] или комплекса RuvABC [37, 38], обладающего геликазной активностью. В результате разрешения структур Холидея происходит обмен участками между гомологичными молекулами ДНК (Рис.4.1 (К)). Также разрешение гетеродуплекса может происходить без образования структур Холидея. В этом случае достроенный участок ДНК извлекается из гетеродуплекса, и восстановление двунитевого разрыва происходит без обмена участками между гомологичными молекулами ДНК (Рис.4.1(З)) [33, 200]. В результате по окончании процесса гомологической рекомбинации двунитевой разрыв ДНК восстанавливается без изменения исходной последовательности нуклеотидов.

4.1.2. RecA

RecA является центральным ферментом гомологической рекомбинации среди бактерий и обладает высокой степенью консервативности. Гомологи RecA встречаются во всех видах живых организмов: RadA - у архей [116, 152], Rad51 и Dcm1 - у эукариот [112]. Считается, что активной формой RecA является филамент, сформированный на однонитевой ДНК. В процессе гомологической рекомбинации RecA осуществляет поиск гомологии, обмен нитей, а также миграцию точек ветвления ДНК. При этом связывание ДНК происходит в присутствии АТФ, а гидролиз АТФ способствует диссоциации RecA от ДНК. Помимо непосредственного участия в процессе гомологической рекомбинации RecA также обладает регуляторными функциями [81, 138, 170].

RecA (*Escherichia coli*) представляет собой белок, содержащий 352 аминокислотных остатка и обладающий молекулярной массой 38 kDa [10]. Исследования структуры ДНК-белковых комплексов, образуемых RecA, позволили установить, что RecA формирует правозакрученные спиральные филаменты на однонитевой ДНК (онДНК), в рамках которых на один виток филамента приходится 6 мономеров RecA (Рис.4.2.А). онДНК располагается

близко к оси филамента и оборачивается вокруг нее. Плоскости азотистых оснований располагаются практически перпендикулярно оси филамента. При этом RecA связывается с ДНК в пропорции один мономер на три нуклеотида.

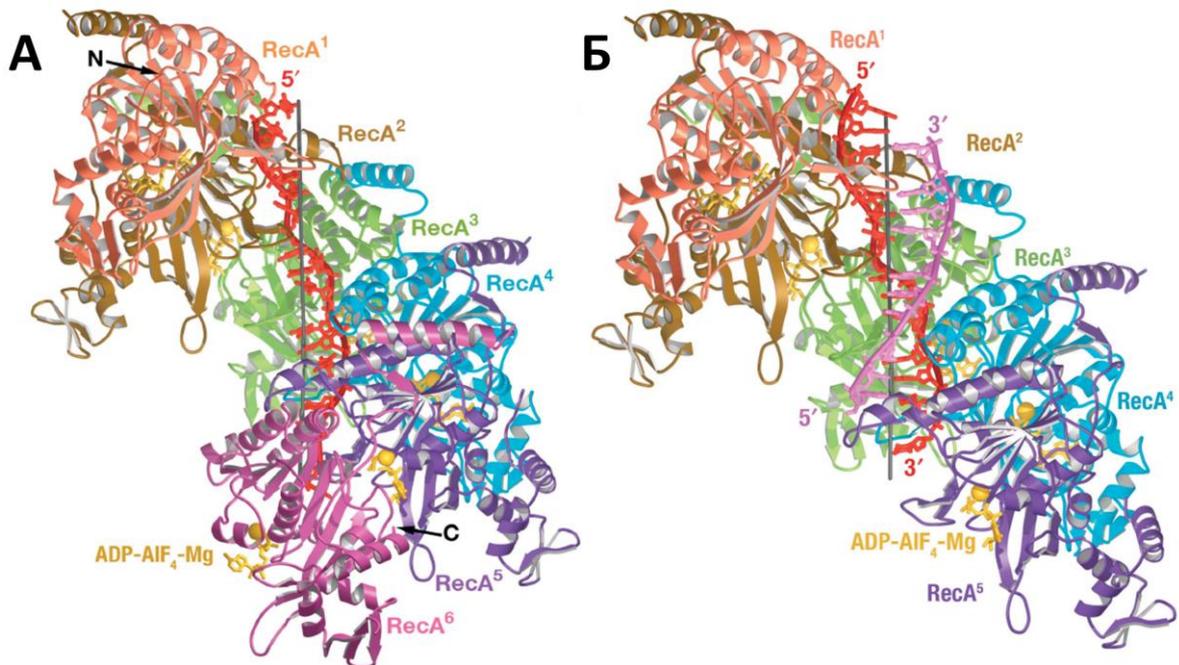


Рис. 4.2. Структуры пресинаптического (А) и постсинаптического (Б) комплексов, формируемых белком RecA. А) Комплекс из шести мономеров RecA, шести молекул АДФ- AlF_4 (негидролизуемый аналог АТФ)-Mg и 18-нуклеотидной последовательности $(\text{dT})_{18}$. Б) Комплекс из пяти мономеров RecA, пяти молекул АДФ- AlF_4 -Mg и двух нуклеотидных последовательностей – $(\text{dT})_{15}$ и $(\text{dA})_{12}$ [24].

Взаимодействие RecA с ДНК происходит за счет образования водородных связей с сахарофосфатным остовом и ван-дер-ваальсовых взаимодействий с азотистыми основаниями. При этом азотистые основания остаются доступными для формирования Уотсон-Криковских связей с комплементарной нитью ДНК для осуществления реакции обмена нитей. Молекулы АТФ и ионы магния располагаются между АТФазными сайтами соседних мономеров RecA. Связывание АТФ стабилизирует так называемое активное состояние филамента, в котором стабилизируются контакты RecA с ДНК. Гидролиз АТФ приводит к

дестабилизации взаимодействий между соседними мономерами RecA, что отражается в нарушении связывания с ДНК.

Каждый нуклеотидный триплет находится в конформации, схожей с расположением нуклеотидов в В-форме двунитевой ДНК. Однако общая длина ДНК в рамках филамента RecA оказывается в 1,5 раза больше длины, соответствующей В-форме ДНК с таким же количеством нуклеотидов, за счет существенного увеличения расстояния между нуклеотидными триплетами. В рамках филамента RecA аксиальное расстояние между соседними нуклеотидами, принадлежащими к разным нуклеотидным триплетам, составляет 7,8 ангстрем, тогда как в рамках В-формы ДНК расстояние между соседними нуклеотидами составляет 3,4 ангстрем [24].

In vitro RecA способен формировать филаменты как на онДНК, так и на двунитевой ДНК (днДНК). Предполагается, что филамент, сформированный на днДНК, соответствует постсинаптическому комплексу, то есть комплексу, который формируется в результате образования гетеродуплекса после внедрения комплекса RecA-онДНК в гомологичный участок днДНК. Структура постсинаптического комплекса (RecA-днДНК) (Рис.4.2.Б) очень близка к структуре пресинаптического комплекса. В данном случае сохраняется пропорция – один мономер RecA на три пары оснований ДНК. Пары оснований ДНК также располагаются триплетами, где в рамках триплета конформация ДНК близка к В-форме. Между триплетами ДНК оказывается растянута, что приводит к общему удлинению днДНК на 50% по сравнению с В-формой. В этом случае расстояние между соседними парами оснований, принадлежащими к двум разным триплетам, составляет 8,4 ангстрем [24, 42, 43].

RecA также имеет вторичный сайт связывания с ДНК, причем афинность данного сайта к онДНК выше, чем к днДНК. Роль вторичного ДНК-связывающего сайта в процессе обмена нитей до сих пор не ясна. Предполагается, что данный сайт используется для взаимодействия с нитью ДНК, вытесняемой во время реакции обмена нитей, для стабилизации гетеродуплекса ДНК [75, 114, 115].

При помощи структурных исследований комплексов RecA-ДНК были получены

данные о некоторых промежуточных этапах гомологической рекомбинации с атомарным разрешением. Однако такой подход позволяет исследовать эти комплексы лишь в статическом состоянии. В то же время для фундаментального понимания этого сложного биофизического процесса необходима также характеристика его динамических особенностей. В связи с этим применение современных одномолекулярных подходов исследования ДНК-белковых взаимодействий является актуальным и перспективным для изучения гомологической рекомбинации и в частности для изучения динамики взаимодействия RecA с ДНК.

4.1.3. Одномолекулярные исследования гомологической рекомбинации

Последние 20 лет различные одномолекулярные подходы активно используются для изучения гомологической рекомбинации. Так как в процессе взаимодействия RecA и других рекомбиназ с ДНК происходит изменение длины ДНК, методы, осуществляющие механическую манипуляцию одиночными молекулами ДНК, хорошо подходят для изучения динамики взаимодействия таких белков с ДНК. В данном случае связывание белка или наоборот, диссоциация приводят к изменению длины ДНК, которое может быть детектировано с высокой точностью в режиме реального времени. Таким образом, наблюдая за динамическими изменениями длины ДНК можно изучать динамику построения/разборки филаментов RecA и его гомологов.

На первом этапе гомологической рекомбинации при формировании пресинаптического комплекса происходит построение филамента RecA (у бактерий) или Rad51 (у эукариот) на ДНК. На завершающем этапе гомологической рекомбинации происходит разборка филамента в результате гидролиза АТФ. Процесс построения филамента состоит из двух стадий: нуклеации, в ходе которой первично образуется стабильный ДНК-белковый комплекс, и непосредственно роста филамента из точки нуклеации [22]. Динамика построения и разборки филаментов RecA/Rad51 на онДНК и днДНК была

исследована при помощи различных одномолекулярных подходов, в том числе с использованием метода TPM [76, 139], флуоресцентной микроскопии [11, 56], магнитного захвата [52, 177, 179], оптического захвата [67, 106, 156], а также комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии [21, 53, 180]. Одномолекулярные методы также применяются для исследования центрального этапа гомологической рекомбинации – образования гетеродуплекса в ходе реакции обмена нитей [36, 47, 51, 103].

4.2. Влияние белка RecX (*E. coli*) на динамику взаимодействия ДНК с RecA (*E. coli*)

На данный момент процесс взаимодействия RecA (*E. coli*) с ДНК представляется достаточно подробно изученным, в том числе и с помощью одномолекулярных подходов. Научный интерес представляет изучение регуляции функций RecA посредством различных белковых кофакторов. Одним из регуляторов активности RecA является белок RecX. RecX представляет собой небольшой (19,4 кДа) белок, который был найден во многих бактериях, в том числе и в *Escherichia coli*. Ген, кодирующий RecX, зачастую располагается в непосредственной близости к гену, кодирующему RecA [186, 201], в результате чего экспрессия RecX осуществляется с промотора RecA (в случае *E. coli*) [130]. RecX является негативным регулятором RecA, что *in vitro* отражается в ингибировании АТФазной активности RecA в присутствии RecX, а также в ингибировании реакции обмена нитей [165]. Структурные исследования показали, что RecX взаимодействует с RecA, связываясь с большой бороздкой спирального филамента RecA, сформированного на ДНК [157, 182]. Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что RecX стимулирует диссоциацию RecA от ДНК, что приводит к разборке филамента RecA [39]. Однако, механизм действия RecX, посредством которого осуществляется разборка филамента RecA, в настоящее время остается неясен. В данной работе впервые исследована динамика разборки филамента RecA, сформированного на двунитевой ДНК, в присутствии RecX на одномолекулярном

уровне.

Эксперименты по исследованию влияния белка RecX на формирование и стабильность комплекса RecA-ДНК планировалось проводить при кислотном уровне pH (pH 6,34), при котором ассоциация RecA с двунитовой ДНК происходит существенно эффективней, по сравнению с нейтральным уровнем pH. Однако, было установлено, что при pH 6,34 смесь белков RecA и RecX агрегирует. В связи с этим, эксперименты проводили при pH 7,5.

Полимеризация RecA (*E. coli*) на двунитовой ДНК зависит от нескольких физиологических факторов, таких как pH, температура реакции, а также сила натяжения ДНК. В условиях нейтрального уровня pH процесс нуклеации (*E. coli*) RecA на двунитовой ДНК, не содержащей однонитевых концов, существенно осложнен необходимостью преодоления высокого энергетического барьера [52]. Высокая температура реакции, а также приложение к ДНК силы, снижает энергетический барьер и способствует процессу нуклеации, а также стабилизирует филамент RecA.

Для обеспечения возможности регулировать температуру при проведении одномолекулярных экспериментов часть экспериментальной установки поместили в бокс, изготовленный из оргстекла. Бокс постоянно продували воздухом, проходящим через водонагреваемый радиатор, соединенный с водяной баней. Таким образом, был обеспечен постоянный нагрев элементов экспериментальной установки, соприкасающихся с микрофлюидной камерой, - объектива микроскопа, микроскопного моторизованного стола, пьезо-столика, конденсора. Температуру измеряли при помощи термодпары, закрепленной на покровном стекле микрофлюидной камеры. Такая схема нагрева экспериментальной установки позволяла поддерживать нужную температуру нагрева микрофлюидной камеры с точностью не хуже 1 градуса в течение нескольких часов. Все эксперименты, приводимые в данной главе, проводили при температуре 37°C.

4.2.1. Калибровка жесткости оптической ловушки

Для определения и регулирования силы натяжения ДНК был разработан протокол калибровки жесткости стационарной оптической ловушки. Процедуру калибровки проводили в начале каждого эксперимента, в ходе которого необходимо было измерять силы при помощи метода оптического захвата:

1. Для проведения калибровки в первом канале микрофлюидной камеры осуществляли оптический захват микросферы при помощи стационарной оптической ловушки.
2. Микросферу переносили в третий канал, содержащий буферный раствор или раствор исследуемого белка (в зависимости от эксперимента).
3. Подачу растворов в микрофлюидную камеру прекращали для того, чтобы добиться полной остановки потока жидкости.
4. Микросферу помещали на необходимом расстоянии от покровного стекла микрофлюидной камеры и при помощи пьезостолика осуществляли смещение микрофлюидной камеры с заданной скоростью относительно объектива микроскопа на расстояние 40 мкм в направлении движения потока жидкости в камере. Затем пьезостолик смещали в исходное положение с той же заданной скоростью. Таким образом, сдвигая микрофлюидную камеру относительно объектива, осуществляли перемещение жидкости относительно микросферы, удерживаемой в оптической ловушке, с заданной скоростью. Согласно закону Стокса, при перемещении пьезо-столика на микросферу действует сила вязкого трения, величина которой определяется, как:

$$F=6\pi\mu r v,$$

где μ – вязкость жидкости, r – радиус микросферы, v – скорость движения жидкости (или скорость перемещения пьезо-столика). Действие силы вязкого трения приводило к смещению микросферы из центра оптической ловушки. Изображения микросферы регистрировали при помощи ПЗС

камеры с частотой 100 Гц. Полученные изображения обрабатывали в режиме реального времени для вычисления смещения положения центра микросферы. Таким образом, за счет смещения пьезо-столика к микросфере прикладывали силу, известной величины, и путем анализа изображений микросферы определяли величину смещения микросферы из центра оптической ловушки, под действием данной силы. Пример временной зависимости смещения центра микросферы, удерживаемой в оптической ловушке, при периодическом перемещении пьезо-столика представлен на рис.4.3.

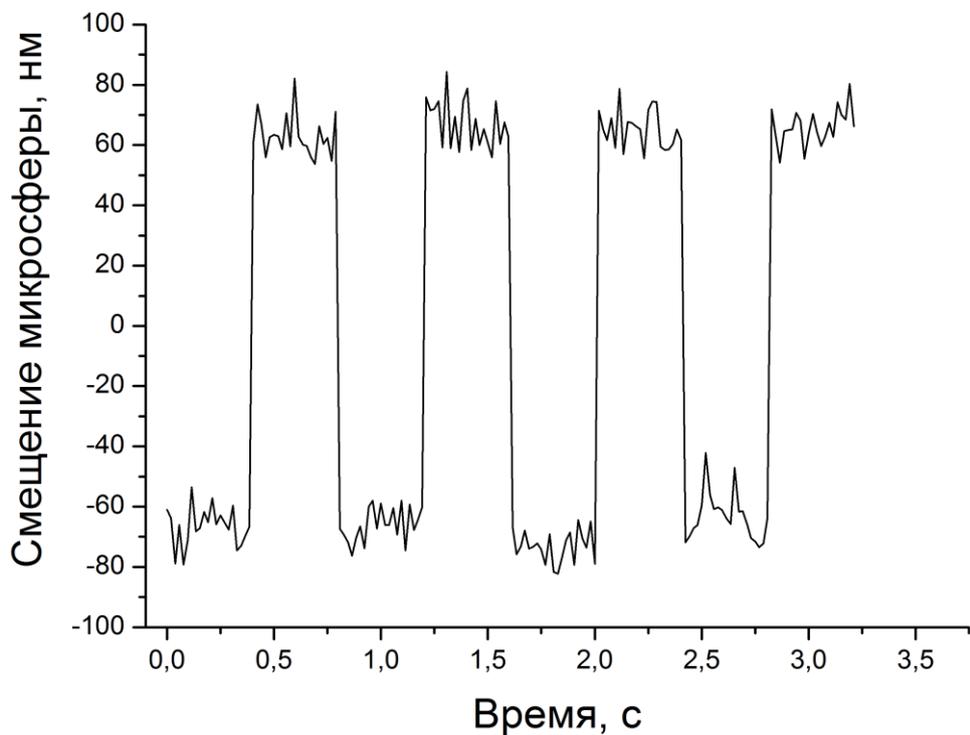


Рис. 4.3. Временная зависимость смещения центра микросферы диаметром 2,1 мкм, удерживаемой в оптической ловушке, при периодическом перемещении пьезо-столика со скоростью 100 мкм/с.

5. Процедуру, описанную в пункте 4, повторяли для различных значений скорости смещения пьезо-столика в диапазоне от 50 мкм/с до 350 мкм/с.
6. На основании полученных данных определяли зависимость смещения микросферы из центра оптической ловушки от приложенной силы. Пример

такой зависимости представлен на рис.4.4. На основании линейной регрессии данной зависимости определяли жесткость оптической ловушки.

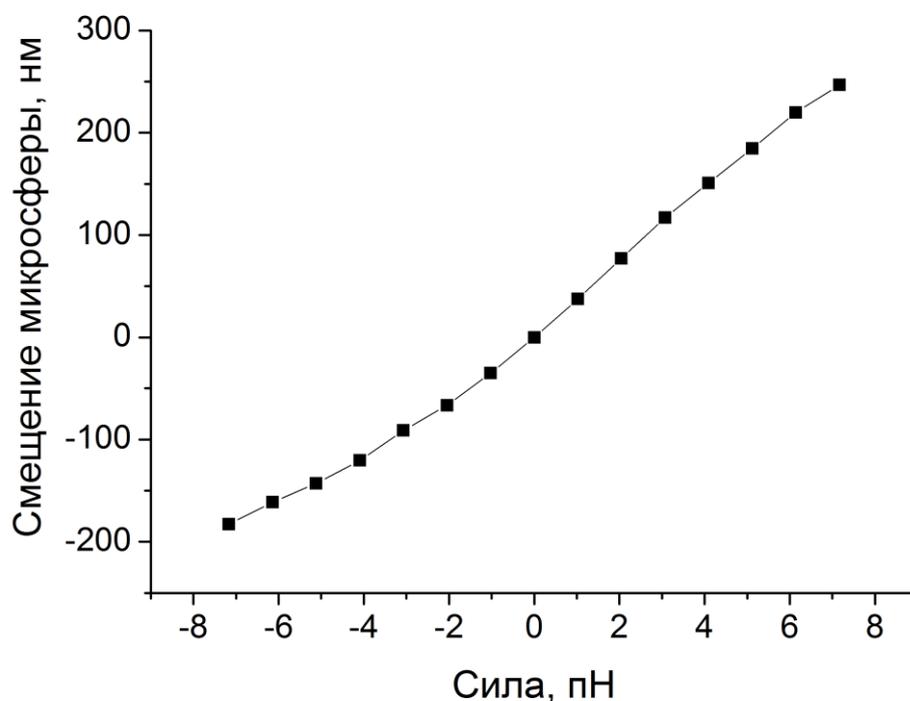


Рис. 4.4. Зависимость смещения центра микросферы диаметром 2,1 мкм от приложенной силы.

Стоит отметить, что линейность зависимости смещения микросферы из центра оптической ловушки от приложенной силы соблюдается в ограниченном диапазоне (рис.4.4). В связи с этим при измерении сил, жесткость оптической ловушки подбиралась такой, чтобы при приложении максимальной измеряемой силы, смещение микросферы из центра оптической ловушки не превышало линейный диапазон зависимости смещения микросферы от приложенной силы (200 нм для микросфер диаметром 2,1 мкм).

Подстройку жесткости оптической ловушки осуществляли путем изменения интенсивности лазерного излучения, используемого для создания оптических ловушек, за счет изменения тока накачки лазера. На рис.4.5 приведена зависимость жесткости оптической ловушки от тока накачки лазера для

микросферы диаметром 2,1 мкм. Линейная регрессия полученной зависимости позволяет определить жесткость оптической ловушки (K , пН/нм) для микросферы диаметром 2,1 мкм как функцию от тока накачки лазера (I , сА):

$$K = 4,34 \cdot 10^{-4} \cdot I - 0,29,$$

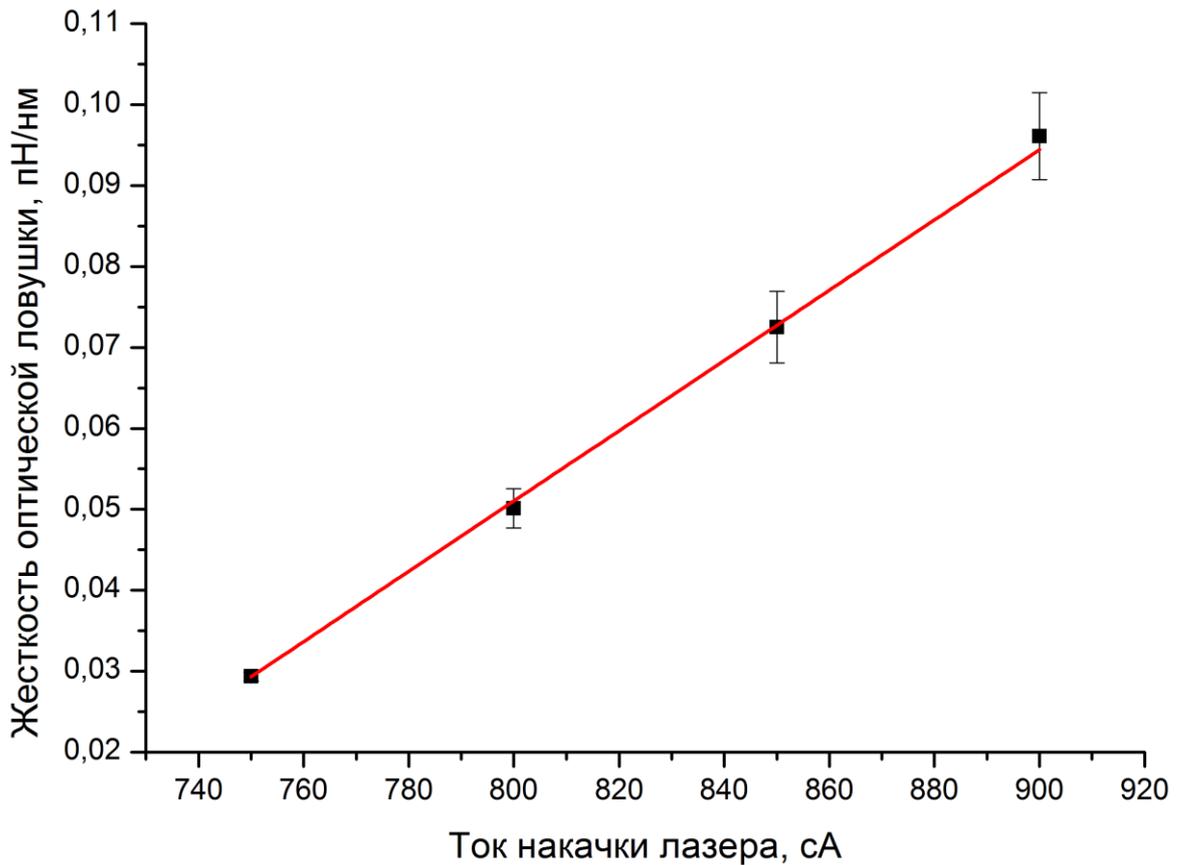


Рис. 4.5. Зависимость жесткости оптической ловушки от тока накачки лазера, полученная при калибровке трех различных микросфер диаметром 2,1 мкм.

Процедуру калибровки жесткости оптической ловушки проводили при помощи специального программного обеспечения, разработанного в среде LabView, которое выполняло автоматическое перемещение пьезо-столика, регистрацию и обработку изображений микросфер, определение зависимости смещения микросферы от приложенной силы и вычисление жесткости оптической ловушки.

Также, для проведения исследований взаимодействия ДНК с RecA было разработано программное обеспечение, реализующее режим поддержания постоянной заданной силы натяжения ДНК. Данное программное обеспечение осуществляет регистрацию и обработку изображений микросфер, удерживаемых в оптических ловушках, в режиме реального времени с частотой 100 Гц, что позволяет одновременно определять длину ДНК (как расстояние между двумя микросферами) и силу натяжения ДНК, измеряя смещение микросферы из центра стационарной ловушки и пересчитывая данное смещение в силу согласно предварительно проведенной калибровке жесткости стационарной оптической ловушки:

$$F = K \cdot \Delta X,$$

где F – сила натяжения ДНК, K – жесткость оптической ловушки, ΔX – смещение микросферы из центра оптической ловушки. Поддержание постоянной силы натяжения ДНК осуществлялось за счет регулирования расстояния между микросферами путем изменения положения перемещаемой оптической ловушки.

4.2.2. Исследование влияния белка RecX (*E. coli*) на динамику взаимодействия ДНК с RecA (*E. coli*)

Белки RecA (*E.coli*), RecA (*D.radiodurans*) и RecX (*E.coli*), исследование которых приведено в данной главе, предоставил Дмитрий Байтин (Петербургский институт ядерной физики, Гатчина, Россия).

На первом этапе было исследована взаимодействие RecA (*E.coli*) с ДНК в отсутствии RecX. Для этого в микрофлюидную камеру подавали следующие растворы (рис.4.6):

1 канал: раствор, содержащий 50 фМ полистироловых микросфер диаметром 2,1 мкм, покрытых стрептавидином;

2 канал: раствор, содержащий 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;

3 канал: буферный раствор;

4 канал: раствор, содержащий 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ.

Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, глицерин 10%. Эксперименты проводили при температуре 37 °С.

В первых трех каналах микрофлюидной камеры проводили захват микросфер и прикрепление к ним молекулы ДНК. В третьем канале за счет смещения перемещаемой оптической ловушки ДНК растягивали с силой 45 пН и, сохраняя силу натяжения неизменной, переводили в четвертый канал, содержащий 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ. В данных условиях происходило формирование филамента RecA (*E.coli*) на двунитевой ДНК, что приводило к увеличению длины ДНК. При изменении длины ДНК сила натяжения поддерживалась на постоянном уровне за счет смещения перемещаемой ловушки.

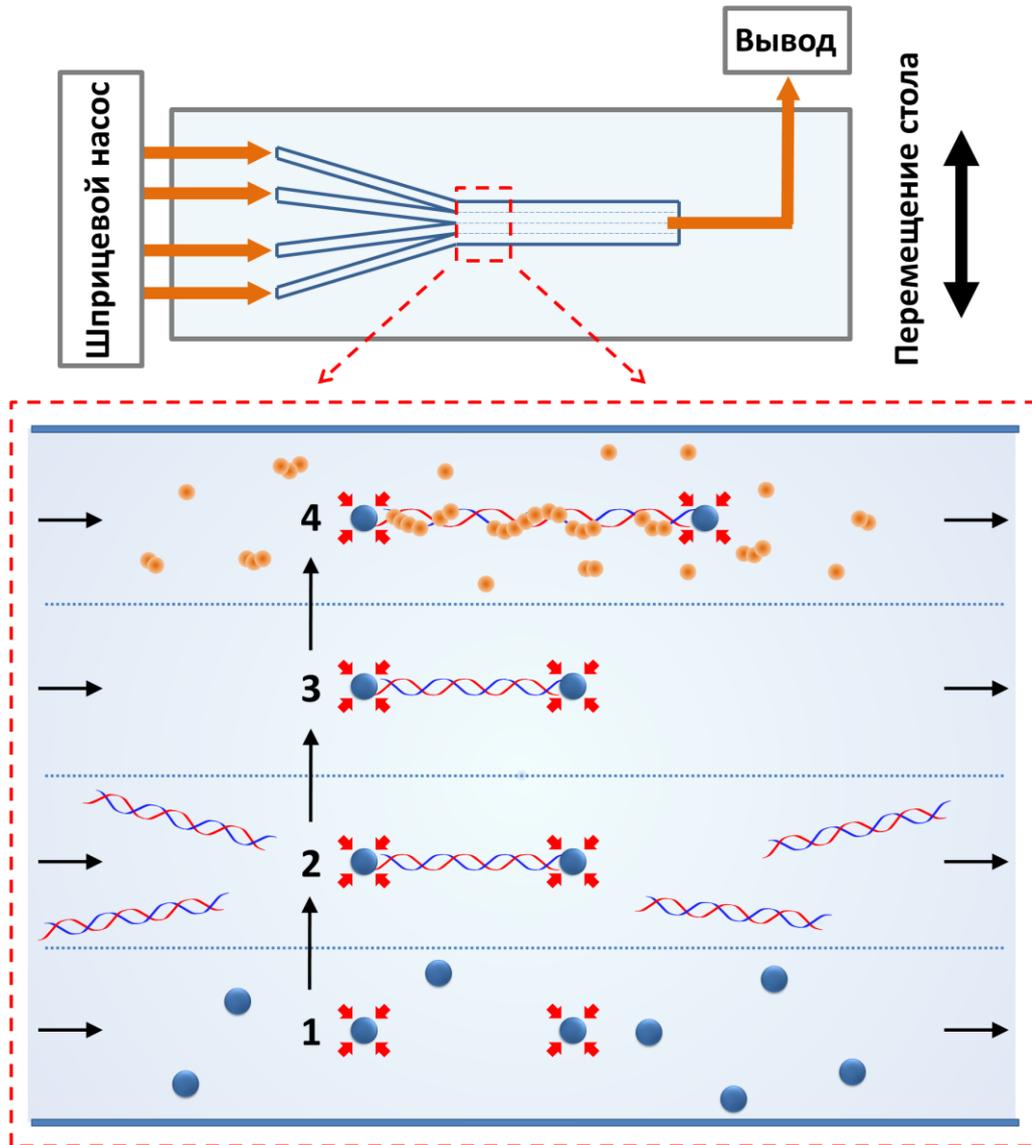


Рис. 4.6. Схема проведения эксперимента по исследованию взаимодействия ДНК с ResA. В первых трех каналах микрофлюидной камеры проводится захват микросфер и прикрепление к ним молекулы ДНК. В третьем канале за счет смещения перемещаемой оптической ловушки ДНК растягивается с силой 45 пН. Затем ДНК переводится в четвертый канал, содержащий 200 нМ ResA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ, где происходит построение филамента ResA на ДНК при постоянной силе натяжения ДНК.

В данных экспериментальных условиях процесс построения филамента ResA (*E.coli*) на двунитовой ДНК происходил достаточно медленно (рис.4.7). Низкая скорость построения филамента связана в первую очередь с низкой скоростью

нуклеации RecA (*E.coli*) на двунитевой ДНК в данных условиях. На временной зависимости увеличения длины ДНК наблюдаются преимущественно линейный рост, соответствующий постоянной скорости роста филамента, что свидетельствует о кооперативности процесса построения филамента [176].

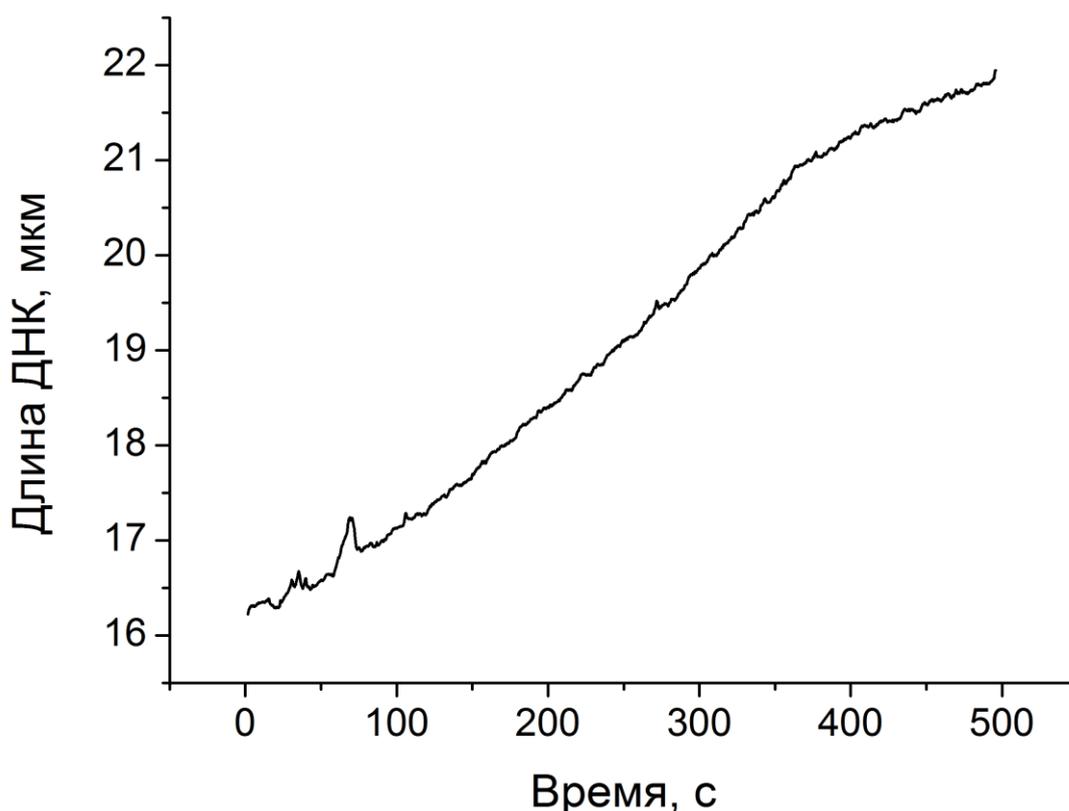


Рис. 4.7. Увеличение длины ДНК за счет формирования филамента RecA (*E.coli*) при инкубации в растворе, содержащем 200 нМ RecA, 1 мМ АТФ, и силе натяжения ДНК 45 пН.

Для проведения исследования влияния белка RecX (*E. coli*) на динамику взаимодействия ДНК с RecA (*E. coli*) в микрофлюидную камеру подавали следующие растворы:

1 канал: раствор, содержащий 50 фМ полистироловых микросфер диаметром 2,1 мкм, покрытых стрептавидином;

2 канал: раствор, содержащий 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;

3 канал: раствор, содержащий 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ;

4 канал: раствор, содержащий 200 нМ RecA (*E.coli*), 1 мМ АТФ и 100 нМ RecX (*E.coli*).

Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, глицерин 10%. В этом случае после закрепления ДНК на микросферах построение филамента RecA на ДНК проводили в третьем канале при растяжении ДНК с силой 45 пН. Затем силу натяжения ДНК снижали до уровня 3 пН путем выключения одной из оптических ловушек. В этом случае молекула ДНК растягивалась с постоянной силой, определяющейся скоростью потока. После этого ДНК переводили в четвертый канал, в который помимо 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ также добавляли 100 нМ RecX (*E.coli*). В данных условиях наблюдалось постепенное уменьшение длины ДНК, что свидетельствовало о разборке филамента RecA (рис.4.8). При проведении контрольных экспериментов без добавления в RecX в четвертый канал, уменьшения длины ДНК не наблюдали.

На временных зависимостях разборки филамента RecA в присутствии RecX наблюдаются резкие изменения скорости укорочения ДНК, что свидетельствует об изменении количества разбираемых непрерывных филаментов RecA. Наличие линейных участков, соответствующих постоянной скорости разборки филаментов, свидетельствует о кооперативности процесса разборки филамента [176]. Данное наблюдение подтверждает модель, в рамках которой RecX регулирует активность RecA и способствует разборке филамента RecA за счет ингибирования роста филамента [39]. В рамках данной модели RecX связывается с растущим 3'-концом филамента RecA, блокируя его дальнейший рост. При этом в результате гидролиза АТФ происходит кооперативная диссоциация RecA с 5'-конца филамента.

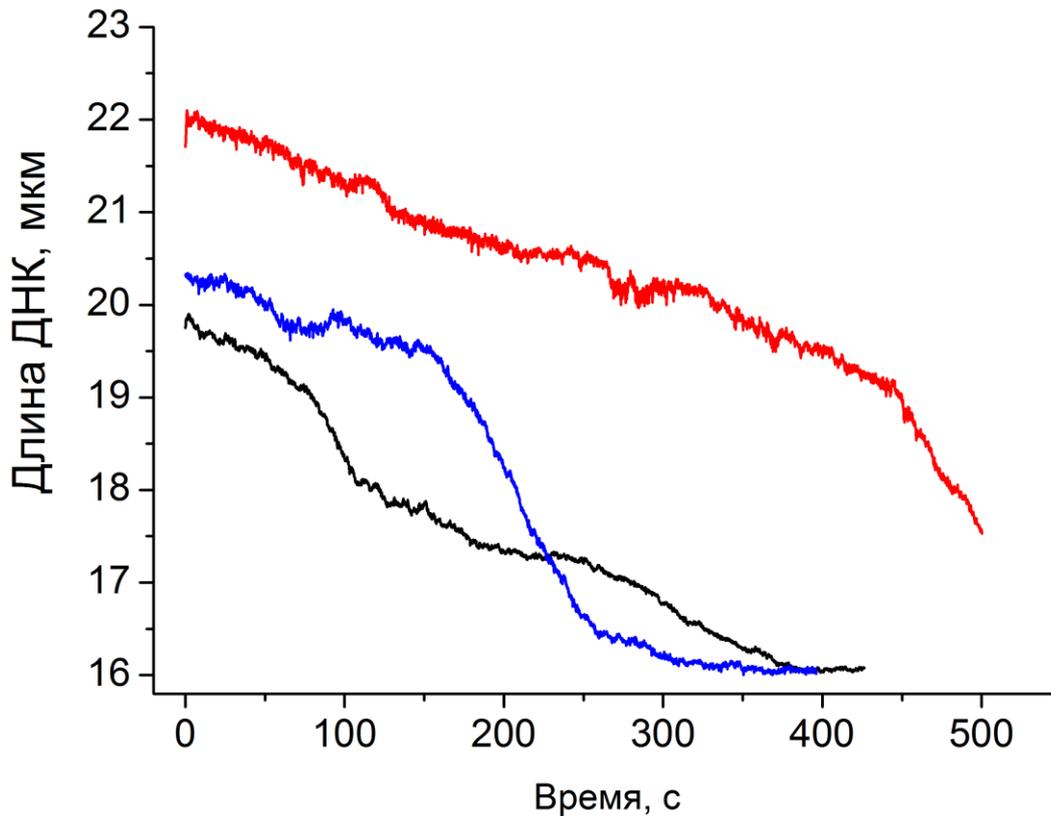


Рис. 4.8. Уменьшение длины ДНК за счет разборки филамента RecA (*E.coli*) при инкубации в растворе, содержащем 200 нМ RecA (*E.coli*), 1 мМ АТФ и 100 нМ RecX (*E.coli*).

4.3. Взаимодействие ДНК с RecA (*D.radiodurans*)

Deinococcus radiodurans - экстримофильная бактерия, хорошо известная по своей экстраординарной устойчивости к ультрафиолетовому облучению и ионизирующей радиации. *D.radiodurans* способен выживать при дозе облучения в 5 килогрей без значительных летальных последствиях или индуцированного мутагенеза [30]. Данный фенотип по всей видимости сформировался благодаря эволюционной адаптации к условиям жизни и обязан множеству молекулярных механизмов обеспечивающих столь высокую резистентность к облучению. В ходе облучения, хромосомная ДНК бактерии претерпевает сильную фрагментацию [161]. Реконституция генома, включающая объединение этих фрагментов в более длинные сегменты, а затем и в целую хромосому требует присутствие в клетке

функционального RecA. Линия клеток *D.radiodurans* не несущая функционального RecA теряет почти всю свою резистентность к облучению [117]. Белки RecA (*E. coli*, EcRecA) и RecA (*D.radiodurans*, DrRecA) обладают на 53% идентичными последовательностями аминокислот [142]. Во многих отношениях RecA из *D.radiodurans* похож на белки RecA других бактерий. DrRecA способен образовывать спиральный филамент на ДНК, гидролизовать АТФ или дАТФ и проводить обмен гомологичными нитями ДНК *in vitro*. Однако отличительной особенностью DrRecA является способность проводить как прямой перенос нити ДНК, так и обратный. В последнем случае филамент инициируется на двунитевой ДНК, а не одонитевой ДНК. Предпочтение одонитевой или двунитевой ДНК для осуществления прямого или обратного переноса нити зависит от сопутствующих условий, например порядок добавления каждой из ДНК в реакцию. В случае, когда обе разновидности ДНК присутствуют в растворе одновременно DrRecA предпочтительнее взаимодействует с двунитевой ДНК [94]. Таким образом взаимодействие белка DrRecA с двунитевой ДНК представляет особый интерес.

DrRecA на данный момент представляется существенно менее изученным, нежели EcRecA. Для сравнения ДНК связывающих свойств EcRecA и DrRecA был применен одномолекулярный подход с использованием метода ТРМ (Tethered Particle Motion) [76]. Было установлено, что при низком значении рН нуклеация DrRecA на днДНК происходит значительно быстрее по сравнению с EcRecA, однако, процесс элонгации филамента происходит медленнее. Также было сделано предположение о том что конечная длина филамента DrRecA меньше EcRecA на основе данных о меньшем радиусе окрестности колебания микросферы, к которой прикреплена молекула ДНК, взаимодействующая с RecA. Однако, следует отметить, что метод ТРМ не позволяет проводить прямого измерения длины молекулы ДНК, а также меньший радиус окрестности колебания микросферы может быть связан не только с меньшей длиной молекулы ДНК, но и с большей гибкостью.

В данной работе проведено прямое сравнительное исследование формирования филаментов EcRecA и DrRecA на двунитевой ДНК в идентичных условиях при нейтральном уровне pH а также выполнено сравнение механических свойств филаментов EcRecA и DrRecA.

4.3.1. Исследование взаимодействия ДНК с RecA (*D.radiodurans*)

При проведении исследования взаимодействия ДНК с DrRecA в микрофлюидную камеру подавали следующие растворы:

1 канал: раствор, содержащий 50 фМ полистироловых микросфер диаметром 2,1 мкм, покрытых стрептавидином;

2 канал: раствор, содержащий 5 пМ биотинилированных молекул ДНК;

3 канал: буферный раствор;

4 канал: раствор, содержащий 1 мкМ RecA и 1 мМ АТФ γ S.

Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl₂, глицерин 10%. В первых трех каналах осуществляли прикрепление молекулы ДНК к двум микросферам. Затем в третьем канале ДНК растягивали с силой 40 pN и переносили в четвертый канал, где при постоянной силе растяжения ДНК наблюдалось увеличение ее длины при взаимодействии с RecA. Негидролизуемый аналог АТФ АТФ γ S использовали с целью предотвращения диссоциации RecA от ДНК. Для выполнения прямого сравнения свойств DrRecA и EcRecA были проведены идентичные опыты с использованием данных белков.

Результаты экспериментов выявили значительные отличия в процессах взаимодействия ДНК с DrRecA и EcRecA (рис.4.9). Временные зависимости увеличения длины ДНК при построении филаментов носят нелинейный характер в случае обоих белков, что свидетельствует об образовании множественных точек нуклеации в процессе формирования филаментов. Однако для выхода в

насыщения процесса связывания DrRecA с ДНК потребовался значительно меньший промежуток времени по сравнению с EcRecA. В случае DrRecA увеличение длины ДНК на 25% произошло в пять раз быстрее, а увеличение длины ДНК достигло максимального значения в 1,5 раза быстрее, нежели в случае EcRecA. Кроме того, величина окончательного удлинения ДНК в случае DrRecA оказалось воспроизводимо меньшей по сравнению с EcRecA - соответственно $45,8 \pm 0,5\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) для DrRecA и $48,3 \pm 1,5\%$ (среднее значение \pm стандартное отклонение) для EcRecA (проведение t-теста выявило значение p меньше 0,001).

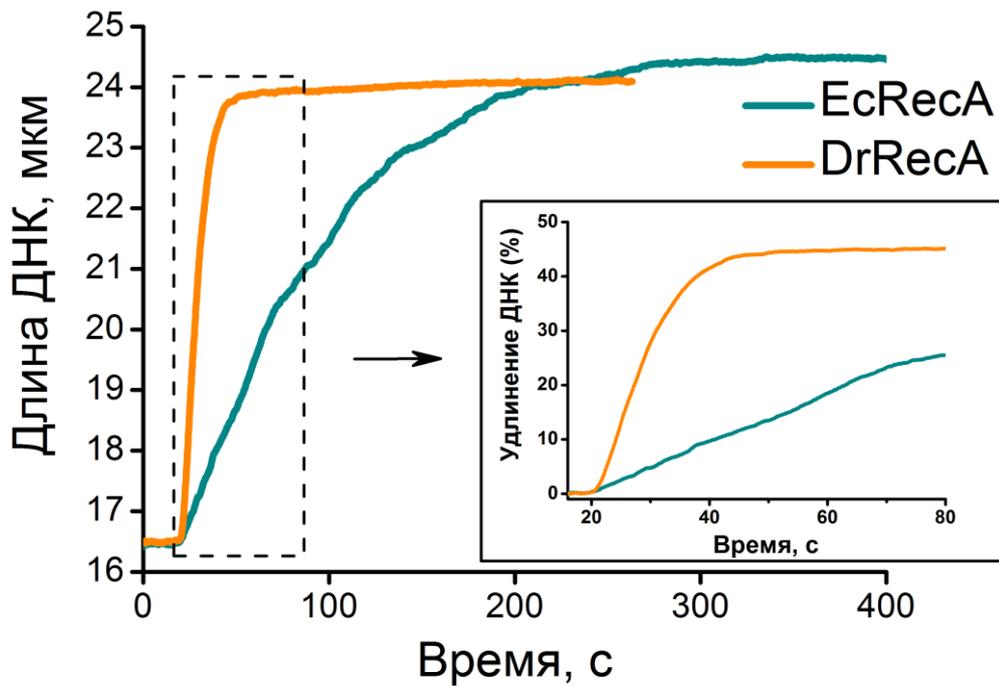


Рис. 4.9. Динамика увеличения длины ДНК за счет формирования филаментов EcRecA и DrRecA в идентичных условиях.

Меньшее значение увеличения длины ДНК при взаимодействии с DrRecA может быть вызвано возможно более компактной структурой филамента DrRecA. Кристаллическая структура DrRecA является наиболее компактной из всех опубликованных структур RecA [142]. Однако кристаллическая структура в

данной работе была получена для филаментов DrRecA, сформированных в отсутствие ДНК, в связи с чем, эти результаты не могут однозначно соответствовать структуре филаментов RecA, сформированных на ДНК. Кроме того, электронная микроскопия ДНК-белковых филаментов DrRecA не выявила данных о более компактной форме филаментов DrRecA по сравнению с EcRecA.

С другой стороны причиной меньшей длины ДНК, полученной при взаимодействии с DrRecA, может быть наличие промежутков между отдельными филаментами, которые могут возникать при большом количестве точек нуклеаций. Случайные события нуклеации на ДНК могут в итоге привести при дальнейшем связывании RecA с ДНК к образованию участков ДНК, размер которых меньше размера участка ДНК минимальной длины, с которой может связаться RecA.

Наименьшей единицей связывания с ДНК является мономер ДНК, который занимает 3 пары оснований. В связи с этим, при случайной множественной нуклеации RecA на ДНК могут появляться промежутки между соседними филаментами размером в 1 или 2 пары оснований. В случае EcRecA значение окончательного удлинения ДНК оказалось несколько меньше, опубликованного максимального удлинения в 50%, что свидетельствует о наличии промежутков между филаментами EcRecA.

Причиной меньшей длины ДНК, покрытой DrRecA, может быть большее количество таких промежутков по сравнению с EcRecA. Такая ситуация может возникнуть в случае, если соотношение скорости нуклеации и скорости элонгации для EcRecA и DrRecA отличаются, как это было продемонстрировано для человеческого гомолога RecA – Rad51[177]. При низком уровне pH, данное соотношение существенно отличается, так как DrRecA в этих условиях демонстрирует большую скорость нуклеации и меньшую скорость элонгации по сравнению с EcRecA [76]. Учитывая факт, что DrRecA обладает менее выраженной зависимостью скорости нуклеации от pH нежели EcRecA, можно предположить что соотношение скорости нуклеации и скорости элонгации при нейтральном уровне pH для данных белков тоже отличается. Наличие большего

количества промежутков между филаментами должно отражаться в большей эластичности комплексов DrRecA-ДНК по сравнению с EcRecA, как это было показано для Rad51 [104, 177].

Для характеристики механических свойств филаментов DrRecA и их сравнения с EcRecA после окончания полимеризации RecA были получены зависимости длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения. Полимеризация RecA на ДНК считалась завершённой, если длина ДНК достигала максимального значения, и в течение нескольких минут не наблюдалось каких-либо детектируемых изменений длины ДНК. После этого подачу жидкостей в микрофлюидную камеру останавливали, и измерение зависимости длины ДНК-белковых филаментов от силы растяжения проводили после полной остановки потока жидкости внутри камеры.

ДНК-белковые комплексы растягивали путем увеличения расстояния между микросферами. При этом одновременно регистрировалось расстояние между микросферами и сила натяжения ДНК, определяемая по смещению микросферы из центра стационарной ловушки. Примеры зависимостей длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения, полученные для EcRecA и DrRecA, представлены на рис.4.10. Полученные зависимости аппроксимировали при помощи модели описания полимерных цепей Worm-like chain (WLC), в рамках которой основными параметрами полимера являются контурная длина и персистентная длина (мера гибкости полимера). Для получения данных о механических параметрах ДНК и ДНК-белковых комплексов использовали модель WLC, скорректированную для проведения экспериментов по растяжению одиночных молекул ДНК [15]:

$$F = \frac{k_B T}{L_p} \left[\frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left(\frac{z}{L_0} \right)^i \right],$$

где F – сила растяжения, L_p – персистентная длина, z – измеренная длина ДНК, L_0 – контурная длина ДНК, $\alpha_2 = 0,5164228$, $\alpha_3 = 2,737418$, $\alpha_4 = 16,07497$,

$\alpha_5 = 38,87607$, $\alpha_6 = 39,49944$, $\alpha_7 = 14,17718$.

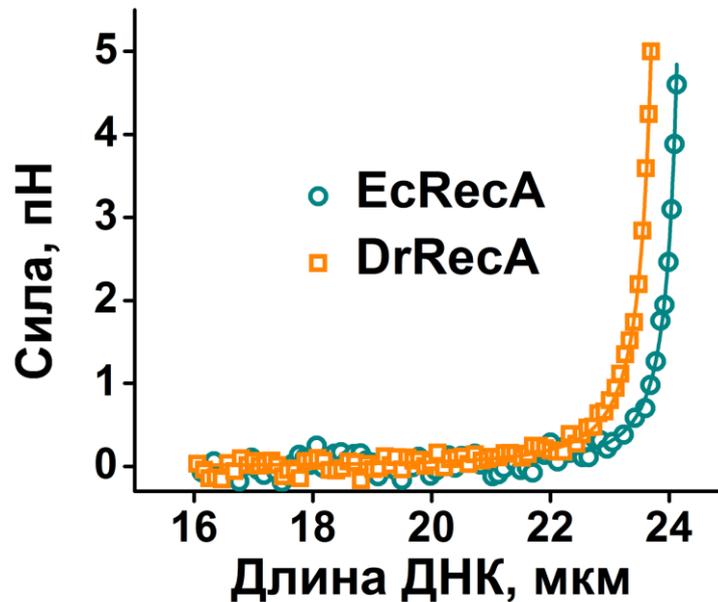


Рис. 4.10. Зависимости длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения, полученные для EsRecA и DrRecA.

Для проверки достоверности данного подхода были проведены контрольные эксперименты по измерению контурной и персистентной длин двунитевой ДНК в буфере 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 10% глицерина. В ходе анализа зависимостей длины ДНК от силы растяжения были получены следующие значения: L_c (контурная длина) = $16,5 \pm 0,1$ мкм и P (персистентная длина) = 43 ± 5 нм (среднее значение \pm стандартное отклонение). Полученные данные находятся в согласии с ожидаемым значением контурной длины ДНК бактериофага λ (48502 пар оснований $\times 0,34$ нм = $16,49$ мкм), а также с опубликованными данными о персистентной длине двунитевой ДНК [40]. В случае ДНК-белковых комплексов EsRecA полученные значения персистентной длины, $P = 960 \pm 120$ нм, и контурной длины, $L_c = 24,54 \pm 0,03$ мкм (среднее значение \pm стандартное отклонение) также находятся в согласии с ранее опубликованными данными [67]. В связи с этим, был сделан вывод о том, что данные о персистентной и контурной длинах полученные данным способом являются достоверными.

Анализ данных, полученных для ДНК-белковых комплексов DrRecA-ДНК, выявил существенно меньшее значение персистентной длины, $P = 690 \pm 90$ нм (среднее значение \pm стандартное отклонение), по сравнению с EcRecA. Меньшее значение персистентной длины свидетельствует о большей гибкости комплексов DrRecA-ДНК по сравнению с EcRecA. Значение контурной длины комплексов DrRecA-ДНК составило $L_c = 24,15 \pm 0,06$ мкм (среднее значение \pm стандартное отклонение), что также оказалось ниже аналогичного значения, полученного для EcRecA. Увеличение контурной длины ДНК при взаимодействии с EcRecA и DrRecA составило 48,6% и 46,3% соответственно (Рис.4.11). Для подтверждения статистически достоверной разницы распределений значений L_c и P для ДНК-белковых комплексов DrRecA и EcRecA, полученные данные подвергли проверке при помощи t-теста, в результате которого, значение p составило меньше 0,001 в обоих случаях, что свидетельствует о достоверном различии полученных распределений.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о том, что находясь в одинаковых условиях, DrRecA формирует филаменты на двунитевой ДНК значительно быстрее EcRecA. ДНК-белковые комплексы образованные DrRecA обладают большей гибкостью и меньшей длиной, нежели в случае EcRecA. Наиболее вероятно, причиной данных свойств филаментов DrRecA является наличие большего количества промежутков между филаментами DrRecA по сравнению с EcRecA за счет большего соотношения скоростей нуклеации и элонгации филаментов в случае DrRecA. Полученные результаты подтверждают модель, в рамках которой DrRecA формирует на ДНК менее продолжительные и более частые филаменты, что потенциально обеспечивает более эффективное использование белка RecA при репарации ДНК.

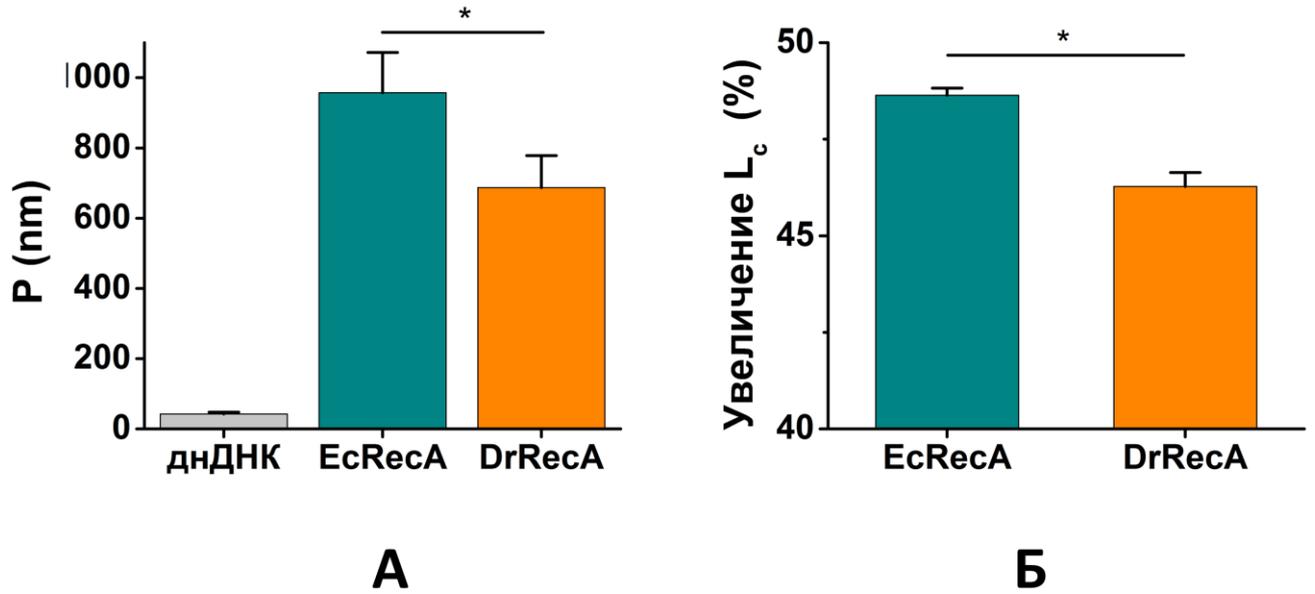


Рис. 4.11. Сравнение персистентных и контурных длин ДНК-белковых комплексов EcRecA и DrRecA, полученных при анализе зависимостей длины ДНК-белковых комплексов от силы растяжения.

Заключение

1. В работе показано, что созданная экспериментальная установка и разработанные протоколы позволяют проводить экспериментальные исследования процессов взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами на одномолекулярном уровне.
2. Установлено, что взаимодействие GelRed с ДНК приводит к увеличению ее длины, что свидетельствует об интеркалирующих свойствах красителя.
3. При помощи флуоресцентной микроскопии в комбинации с методом оптического захвата показано, что белок TIR49a образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК.
4. Анализ динамики разборки филамента днДНК-RecA (*E.coli*) в присутствии RecX (*E.coli*) показал кооперативность данного процесса.
5. Анализ данных о персистентной и контурной длинах филаментов днДНК-RecA (*D.radiodurans*) показал согласие с моделью, в рамках которой RecA (*D.radiodurans*) взаимодействует с днДНК путем формирования более частых и менее протяженных филаментов по сравнению с RecA (*E.coli*).

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных журналах:

1. G. Pobegalov, G. Cherevatenko, A. Alekseev, A. Sabantsev, O. Kovaleva, A. Vedyaykin, N. Morozova, D. Baitin, M. Khodorkovskii. Deinococcus radiodurans RecA nucleoprotein filaments characterized at the single-molecule level with optical tweezers // Biochemical and Biophysical Research Communications. -- 2015. -- Oct 23. -- Т. 466, № 3. -- С. 426-430.
2. Г.Е. Побегалов, А.Н. Арсениев, А.Д. Ведяйкин, М.Л. Соколова, Я.В. Федорова, А.В. Сабанцев. Изменение механических свойств молекулы ДНК при взаимодействии с интеркалириующим красителем YOYO-1 // Научно-технические ведомости СПбГПУ. -- 2013. № 1. -- С. 136-143.

Публикации в сборниках тезисов конференций:

1. Г.Е. Побегалов, А.В. Сабанцев, Я.В. Федорова, М.Л. Соколова, А.С. Мельников, М.А.Ходорковский. Одномолекулярные исследования ДНК-белковых взаимодействий методом оптической ловушки, 22-я международная конференция “Лазеры. Измерения. Информация”, 5-7 июня 2012, Санкт-Петербург, Россия.
2. G. Pobegalov, A. Sabantsev, A. Arsenyev, Y. Fedorova, M. Sokolova, A. Melnikov, M. Petukhov, E. Käs, M. Grigoriev and M. Khodorkovskiy. Pontin and Reptin: DNA-protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers. 1st International Workshop on Pontin and Reptin, 17-19 October 2012, Bordeaux, France.
3. А.Н. Арсениев, Г.Е. Побегалов, А.В. Сабанцев, Я.В. Федорова, М.Л. Соколова, А.С. Мельников, М.А. Ходорковский. Применение оптических ловушек для одномолекулярных исследований взаимодействий ДНК с белками и различными агентами. Международная конференция молодых ученых Экспериментальная и теоретическая биофизика '12, 22-24 октября 2012, Пущино, Россия.

4. A. Arseniev, G. Pobegalov, A. Sabantsev, Y. Fedorova, M. Sokolova, A. Melnikov, M. Petukhov, E. Käs, M. Grigoriev and M. Khodorkovskiy. DNA-protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers, 5th International Symposium on Optical Tweezers in Life Sciences, June 18, 2013, Umspannwerk Ost, Berlin, Germany, Abstract booklet, p. 34.
5. G. Pobegalov, A. Arseniev, A. Sabantsev, Y. Fedorova, M. Sokolova, A. Melnikov, M. Petukhov, E. Käs, M. Grigoriev and M. Khodorkovskiy. Single-molecule studies of dsDNA properties using optical tweezers. FEBS Congress, July 6 – 11, 2013, St. Petersburg, Russia. Wiley-Blackwell. p 61.
6. G. Pobegalov, A. Sabantsev, A. Arseniev, Y. Fedorova, M. Sokolova, A. Melnikov, M. Petukhov, E. Käs, M. Khodorkovskiy and M. Grigoriev. TIP49a/dsDNA transactions at the single-molecule level visualized in real time using optical tweezers. EMBO Conference - Helicases and nucleic acid translocases, Cambridge, August 4-8, 2013.
7. A. Alekseev, A. Arseniev, A. Sabantsev, G. Pobegalov, A. Melnikov, M. Khodorkovskiy. Dynamics of GelRed intercalation into double-stranded DNA at the single-molecule level. 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, St. Petersburg, Russia, March 25 – 27, 2014, Books of Abstract, pp. 138-139.
8. G. Pobegalov, A. Arseniev, Y. Fedorova, M. Sokolova, M. Petukhov, E. Käs, M. Khodorkovskiy, M. Grigoriev. Single-molecule studies of DNA-binding ATPase Pontin using optical tweezers. 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, St. Petersburg, Russia, March 25 – 27, 2014, Books of Abstract, pp. 157-158.
9. G. Pobegalov, A. Sabantsev, M. Grigoriev, M. Khodorkovskiy. Single molecule studies of DNA-protein interactions. 22nd International Symposium Nanostructures: Physics and Technology, St. Petersburg, 23-27 June, 2014.
10. G. Pobegalov, A. Alekseev, A. Sabantsev, M. Petukhov, M. Khodorkovskiy, M. Grigoriev. DNA binding by Pontin visualized at the single-molecule level using the

Dendra2-Pontin fusion protein. 2nd International Workshop on Pontin/RUVBL1 & Reptin/RUVBL2, Oeiras, Portugal, 10-12 October, 2014, Workshop booklet, p. 18.

11. G. Pobegalov, A. Alekseev, A. Sabantsev, A. Melnikov, M. Khodorkovskiy, D. Baitin. Real-time RecA filament disassembly in the presence of RecX monitored using single-molecule manipulation by optical tweezers. *Biophysical Journal* Volume 108, Issue 2, Supplement 1, p69a, 27 January 2015.

Список литературы

1. <https://biotium.com/technology/gelred-gelgreen-nucleic-acid-gel-stains>.
2. Ammelburg M., Frickey T., Lupas A.N. Classification of AAA+ proteins // *J Struct Biol.* - 2006. - Vol. 156. - P. 2-11.
3. Amundsen S.K., Smith G.R. Interchangeable parts of the Escherichia coli recombination machinery // *Cell.* - 2003. - Vol. 112. - P. 741-744.
4. Ashkin A. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure // *Phys Rev Lett.* - 1970. - Vol. 24. - P. 156-159.
5. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime // *Biophys J.* - 1992. - Vol. 61. - P. 569-582.
6. Ashkin A., Dziedzic J.M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria // *Science.* - 1987. - Vol. 235. - P. 1517-1520.
7. Ashkin A., Dziedzic J.M., Bjorkholm J.E., Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles // *Opt Lett.* - 1986. - Vol. 11. - P. 288.
8. Ashkin A., Dziedzic J.M., Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams // *Nature.* - 1987. - Vol. 330. - P. 769-771.
9. Bauer A., Huber O., Kemler R. Pontin⁵², an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1998. - Vol. 95. - P. 14787-14792.
10. Bell C.E. Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase // *Mol Microbiol.* - 2005. - Vol. 58. - P. 358-366.
11. Bell J.C., Plank J.L., Dombrowski C.C., Kowalczykowski S.C. Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA // *Nature.* - 2012. - Vol. 491. - P. 274-278.
12. Bellosta P., Hulf T., Balla Diop S., Usseglio F., Pradel J., Aragnol D., Gallant P. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during Drosophila development // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. - Vol. 102. - P. 11799-11804.

13. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution // *Science*. - 2006. - Vol. 313. - P. 1642-1645.
14. Boer D.R., Canals A., Coll M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes // *Dalton Trans.* - 2009. - Vol. - P. 399-414.
15. Bouchiat C., Wang M.D., Allemand J., Strick T., Block S.M., Croquette V. Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements // *Biophys J.* - 1999. - Vol. 76. - P. 409-413.
16. Brana M.F., Cacho M., Gradillas A., de Pascual-Teresa B., Ramos A. Intercalators as anticancer drugs // *Curr Pharm Des.* - 2001. - Vol. 7. - P. 1745-1780.
17. Brewer L.R., Bianco P.R. Laminar flow cells for single-molecule studies of DNA-protein interactions // *Nat Methods.* - 2008. - Vol. 5. - P. 517-525.
18. Brutzer H., Luzzietti N., Klaue D., Seidel R. Energetics at the DNA supercoiling transition // *Biophys J.* - 2010. - Vol. 98. - P. 1267-1276.
19. Bryant Z., Stone M.D., Gore J., Smith S.B., Cozzarelli N.R., Bustamante C. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA // *Nature*. - 2003. - Vol. 424. - P. 338-341.
20. Cadigan K.M., Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development // *Genes Dev.* - 1997. - Vol. 11. - P. 3286-3305.
21. Candelli A., Holthausen J.T., Depken M., Brouwer I., Franker M.A., Marchetti M., Heller I., Bernard S., Garcin E.B., Modesti M., Wyman C., Wuite G.J., Peterman E.J. Visualization and quantification of nascent RAD51 filament formation at single-monomer resolution // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2014. - Vol. 111. - P. 15090-15095.
22. Chabbert M., Cazenave C., Helene C. Kinetic studies of recA protein binding to a fluorescent single-stranded polynucleotide // *Biochemistry*. - 1987. - Vol. 26. - P. 2218-2225.
23. Chan T.F., Ha C., Phong A., Cai D., Wan E., Leung L., Kwok P.Y., Xiao M. A simple DNA stretching method for fluorescence imaging of single DNA molecules // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - P. e113.

24. Chen Z., Yang H., Pavletich N.P. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures // *Nature*. - 2008. - Vol. 453. - P. 489-484.
25. Choi J., Heo K., An W. Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A // *Nucleic Acids Res*. - 2009. - Vol. 37. - P. 5993-6007.
26. Chu S. Laser manipulation of atoms and particles // *Science*. - 1991. - Vol. 253. - P. 861-866.
27. Cnossen J.P., Dulin D., Dekker N.H. An optimized software framework for real-time, high-throughput tracking of spherical beads // *Rev Sci Instrum*. - 2014. - Vol. 85. - P. 103712.
28. Collins B.E., Ye L.F., Duzdevich D., Greene E.C. DNA curtains: novel tools for imaging protein-nucleic acid interactions at the single-molecule level // *Methods Cell Biol*. - 2014. - Vol. 123. - P. 217-234.
29. Cox M.M. Motoring along with the bacterial RecA protein // *Nat Rev Mol Cell Biol*. - 2007. - Vol. 8. - P. 127-138.
30. Cox M.M., Battista J.R. *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor // *Nat Rev Microbiol*. - 2005. - Vol. 3. - P. 882-892.
31. Cox M.M., Lehman I.R. recA protein-promoted DNA strand exchange. Stable complexes of recA protein and single-stranded DNA formed in the presence of ATP and single-stranded DNA binding protein // *J Biol Chem*. - 1982. - Vol. 257. - P. 8523-8532.
32. Crisafuli F.A., Ramos E.B., Rocha M.S. Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain // *Eur Biophys J*. - 2015. - Vol. 44. - P. 1-7.
33. Cromie G.A., Connelly J.C., Leach D.R. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans // *Mol Cell*. - 2001. - Vol. 8. - P. 1163-1174.
34. Davey M.J., Indiani C., O'Donnell M. Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture // *J Biol Chem*. - 2003. - Vol. 278. - P. 4491-4499.
35. Davis A.J., Chen D.J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining // *Transl Cancer Res*. - 2013. - Vol. 2. - P. 130-143.

36. De Vlaminck I., van Loenhout M.T., Zweifel L., den Blanken J., Hooning K., Hage S., Kerssemakers J., Dekker C. Mechanism of homology recognition in DNA recombination from dual-molecule experiments // *Mol Cell*. - 2012. - Vol. 46. - P. 616-624.
37. Dickman M.J., Ingleston S.M., Sedelnikova S.E., Rafferty J.B., Lloyd R.G., Grasby J.A., Hornby D.P. The RuvABC resolvase // *Eur J Biochem*. - 2002. - Vol. 269. - P. 5492-5501.
38. Donaldson J.R., Courcelle C.T., Courcelle J. RuvABC is required to resolve holliday junctions that accumulate following replication on damaged templates in *Escherichia coli* // *J Biol Chem*. - 2006. - Vol. 281. - P. 28811-28821.
39. Drees J.C., Lusetti S.L., Chitteni-Pattu S., Inman R.B., Cox M.M. A RecA filament capping mechanism for RecX protein // *Mol Cell*. - 2004. - Vol. 15. - P. 789-798.
40. Driessen R.P., Sitters G., Laurens N., Moolenaar G.F., Wuite G.J., Goosen N., Dame R.T. Effect of temperature on the intrinsic flexibility of DNA and its interaction with architectural proteins // *Biochemistry*. - 2014. - Vol. 53. - P. 6430-6438.
41. Ducat D., Kawaguchi S., Liu H., Yates J.R., 3rd, Zheng Y. Regulation of microtubule assembly and organization in mitosis by the AAA+ ATPase Pontin // *Mol Biol Cell*. - 2008. - Vol. 19. - P. 3097-3110.
42. Egelman E.H., Stasiak A. Structure of helical RecA-DNA complexes. Complexes formed in the presence of ATP-gamma-S or ATP // *J Mol Biol*. - 1986. - Vol. 191. - P. 677-697.
43. Egelman E.H., Yu X. The location of DNA in RecA-DNA helical filaments // *Science*. - 1989. - Vol. 245. - P. 404-407.
44. Erzberger J.P., Berger J.M. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins // *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. - 2006. - Vol. 35. - P. 93-114.
45. Etard C., Gradl D., Kunz M., Eilers M., Wedlich D. Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1 // *Mech Dev*. - 2005. - Vol. 122. - P. 545-556.
46. Fallman E., Axner O. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers // *Appl Opt*. - 1997. - Vol. 36. - P. 2107-2113.

47. Fan H.F., Cox M.M., Li H.W. Developing single-molecule TPM experiments for direct observation of successful RecA-mediated strand exchange reaction // *PLoS One*. - 2011. - Vol. 6. - P. e21359.
48. Farge G., Laurens N., Broekmans O.D., van den Wildenberg S.M., Dekker L.C., Gaspari M., Gustafsson C.M., Peterman E.J., Falkenberg M., Wuite G.J. Protein sliding and DNA denaturation are essential for DNA organization by human mitochondrial transcription factor A // *Nat Commun*. - 2012. - Vol. 3. - P. 1013.
49. Flors C. Photoswitching of monomeric and dimeric DNA-intercalating cyanine dyes for super-resolution microscopy applications // *Photochem Photobiol Sci*. - 2010. - Vol. 9. - P. 643-648.
50. Forget A.L., Dombrowski C.C., Amitani I., Kowalczykowski S.C. Exploring protein-DNA interactions in 3D using in situ construction, manipulation and visualization of individual DNA dumbbells with optical traps, microfluidics and fluorescence microscopy // *Nat Protoc*. - 2013. - Vol. 8. - P. 525-538.
51. Forget A.L., Kowalczykowski S.C. Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search // *Nature*. - 2012. - Vol. 482. - P. 423-427.
52. Fu H., Le S., Muniyappa K., Yan J. Dynamics and Regulation of RecA Polymerization and De-Polymerization on Double-Stranded DNA // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8. - P. e66712.
53. Galletto R., Amitani I., Baskin R.J., Kowalczykowski S.C. Direct observation of individual RecA filaments assembling on single DNA molecules // *Nature*. - 2006. - Vol. 443. - P. 875-878.
54. Gao Q., Williams L.D., Egli M., Rabinovich D., Chen S.L., Quigley G.J., Rich A. Drug-induced DNA repair: X-ray structure of a DNA-ditercalinium complex // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1991. - Vol. 88. - P. 2422-2426.
55. Gartner W., Rossbacher J., Zierhut B., Daneva T., Base W., Weissel M., Waldhausl W., Pasternack M.S., Wagner L. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis // *Cell Motil Cytoskeleton*. - 2003. - Vol. 56. - P. 79-93.

56. Gibb B., Ye L.F., Kwon Y., Niu H., Sung P., Greene E.C. Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules // *Nat Struct Mol Biol.* - 2014. - Vol. 21. - P. 893-900.
57. Gilmore J.L., Suzuki Y., Tamulaitis G., Siksnys V., Takeyasu K., Lyubchenko Y.L. Single-molecule dynamics of the DNA-EcoRII protein complexes revealed with high-speed atomic force microscopy // *Biochemistry.* - 2009. - Vol. 48. - P. 10492-10498.
58. Gore J., Bryant Z., Stone M.D., Nollmann M., Cozzarelli N.R., Bustamante C. Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking // *Nature.* - 2006. - Vol. 439. - P. 100-104.
59. Gosse C., Croquette V. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level // *Biophys J.* - 2002. - Vol. 82. - P. 3314-3329.
60. Gribun A., Cheung K.L., Huen J., Ortega J., Houry W.A. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex // *J Mol Biol.* - 2008. - Vol. 376. - P. 1320-1333.
61. Grigoletto A., Lestienne P., Rosenbaum J. The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer // *Biochim Biophys Acta.* - 2011. - Vol. 1815. - P. 147-157.
62. Hamon L., Pastre D., Dupaigne P., Le Breton C., Le Cam E., Pietrement O. High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein--DNA complexes // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - Vol. 35. - P. e58.
63. Handa N., Morimatsu K., Lovett S.T., Kowalczykowski S.C. Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli* // *Genes Dev.* - 2009. - Vol. 23. - P. 1234-1245.
64. Hansen L.F., Jensen L.K., Jacobsen J.P. Bis-intercalation of a homodimeric thiazole orange dye in DNA in symmetrical pyrimidine-pyrimidine-purine-purine oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* - 1996. - Vol. 24. - P. 859-867.
65. Hanson P.I., Whiteheart S.W. AAA+ proteins: have engine, will work // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2005. - Vol. 6. - P. 519-529.
66. Harmon F.G., Kowalczykowski S.C. RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination // *Genes Dev.* - 1998. - Vol. 12. - P.

1134-1144.

67. Hegner M., Smith S.B., Bustamante C. Polymerization and mechanical properties of single RecA-DNA filaments // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1999. - Vol. 96. - P. 10109-10114.
68. Hell S.W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy // *Opt Lett.* - 1994. - Vol. 19. - P. 780-782.
69. Heller I., Sitters G., Broekmans O.D., Farge G., Menges C., Wende W., Hell S.W., Peterman E.J., Wuite G.J. STED nanoscopy combined with optical tweezers reveals protein dynamics on densely covered DNA // *Nat Methods.* - 2013. - Vol. 10. - P. 910-916.
70. Herzyk P., Neidle S., Goodfellow J.M. Conformation and dynamics of drug-DNA intercalation // *J Biomol Struct Dyn.* - 1992. - Vol. 10. - P. 97-139.
71. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes // *Annu Rev Genet.* - 2010. - Vol. 44. - P. 113-139.
72. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // *Nature.* - 2001. - Vol. 411. - P. 366-374.
73. Holman G.G., Zewail-Foote M., Smith A.R., Johnson K.A., Iverson B.L. A sequence-specific threading tetra-intercalator with an extremely slow dissociation rate constant // *Nat Chem.* - 2011. - Vol. 3. - P. 875-881.
74. Holzmann K., Gerner C., Korosec T., Poltl A., Grimm R., Sauer mann G. Identification and characterization of the ubiquitously occurring nuclear matrix protein NMP 238 // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1998. - Vol. 252. - P. 39-45.
75. Howard-Flanders P., West S.C., Stasiak A. Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination // *Nature.* - 1984. - Vol. 309. - P. 215-219.
76. Hsu H.F., Ngo K.V., Chitteni-Pattu S., Cox M.M., Li H.W. Investigating *Deinococcus radiodurans* RecA protein filament formation on double-stranded DNA by a real-time single-molecule approach // *Biochemistry.* - 2011. - Vol. 50. - P. 8270-8280.
77. Huang Q., Baum L., Fu W.L. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis // *Clin Lab.* - 2010. - Vol. 56. - P. 149-152.

78. Huhle A., Klaue D., Brutzer H., Daldrop P., Joo S., Otto O., Keyser U.F., Seidel R. Camera-based three-dimensional real-time particle tracking at kHz rates and Angstrom accuracy // *Nat Commun.* - 2015. - Vol. 6. - P. 5885.
79. Hurley L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy // *Nature Reviews Cancer.* - 2002. - Vol. 2. - P. 188-200.
80. Ihmels H., Faulhaber K., Vedaldi D., Dall'Acqua F., Viola G. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA. Part 2: the annelated quinolizinium ion as a structural motif in DNA intercalators // *Photochem Photobiol.* - 2005. - Vol. 81. - P. 1107-1115.
81. Indiani C., Patel M., Goodman M.F., O'Donnell M.E. RecA acts as a switch to regulate polymerase occupancy in a moving replication fork // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013. - Vol. 110. - P. 5410-5415.
82. Inoue K., Lupski J.R. Molecular mechanisms for genomic disorders // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* - 2002. - Vol. 3. - P. 199-242.
83. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases // *J Struct Biol.* - 2004. - Vol. 146. - P. 11-31.
84. Jha S., Dutta A. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology // *Mol Cell.* - 2009. - Vol. 34. - P. 521-533.
85. Johnson A., O'Donnell M. Ordered ATP hydrolysis in the gamma complex clamp loader AAA+ machine // *J Biol Chem.* - 2003. - Vol. 278. - P. 14406-14413.
86. Jonsson Z.O., Jha S., Wohlschlegel J.A., Dutta A. Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex // *Mol Cell.* - 2004. - Vol. 16. - P. 465-477.
87. Kanemaki M., Kurokawa Y., Matsu-ura T., Makino Y., Masani A., Okazaki K., Morishita T., Tamura T.A. TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a // *J Biol Chem.* - 1999. - Vol. 274. - P. 22437-22444.
88. Kanemaki M., Makino Y., Yoshida T., Kishimoto T., Koga A., Yamamoto K., Yamamoto M., Moncollin V., Egly J.M., Muramatsu M., Tamura T. Molecular cloning of a rat 49-kDa TBP-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the

- bacterial RuvB // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1997. - Vol. 235. - P. 64-68.
89. Karata K., Inagawa T., Wilkinson A.J., Tatsuta T., Ogura T. Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH // *J Biol Chem.* - 1999. - Vol. 274. - P. 26225-26232.
90. Kasajima I., Ohtsubo N., Sasaki K. Faster, safer, and better DNA purification by ultracentrifugation using GelRed stain and development of mismatch oligo DNA for genome walking // *Biosci Biotechnol Biochem.* - 2014. - Vol. 78. - P. 1902-1905.
91. Kasevich M., Chu S. Laser cooling below a photon recoil with three-level atoms // *Phys Rev Lett.* - 1992. - Vol. 69. - P. 1741-1744.
92. Kasukurti A., Potcoava M., Desai S.A., Eggleton C., Marr D.W.M. Single-cell isolation using a DVD optical pickup // *Optics Express.* - 2011. - Vol. 19. - P. 10377-10386.
93. Kellermayer M.S., Smith S.B., Granzier H.L., Bustamante C. Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers // *Science.* - 1997. - Vol. 276. - P. 1112-1116.
94. Kim J.I., Cox M.M. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2002. - Vol. 99. - P. 7917-7921.
95. King T.H., Decatur W.A., Bertrand E., Maxwell E.S., Fournier M.J. A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins // *Mol Cell Biol.* - 2001. - Vol. 21. - P. 7731-7746.
96. Koster D.A., Palle K., Bot E.S.M., Bjornsti M.A., Dekker N.H. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I // *Nature.* - 2007. - Vol. 448. - P. 213-217.
97. Krautbauer R., Pope L.H., Schrader T.E., Allen S., Gaub H.E. Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy // *FEBS Lett.* - 2002. - Vol. 510. - P. 154-158.
98. Kuzuya A., Sakai Y., Yamazaki T., Xu Y., Komiyama M. Nanomechanical DNA origami 'single-molecule beacons' directly imaged by atomic force microscopy // *Nat*

Commun. - 2011. - Vol. 2. - P. 449.

99. Laurens N., Bellamy S.R., Harms A.F., Kovacheva Y.S., Halford S.E., Wuite G.J. Dissecting protein-induced DNA looping dynamics in real time // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - Vol. 37. - P. 5454-5464.

100. Laurens N., Rusling D.A., Pernstich C., Brouwer I., Halford S.E., Wuite G.J. DNA looping by FokI: the impact of twisting and bending rigidity on protein-induced looping dynamics // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - Vol. 40. - P. 4988-4997.

101. Lauscher J.C., Elezkurtaj S., Dullat S., Lipka S., Grone J., Buhr H.J., Huber O., Kruschewski M. Increased Pontin expression is a potential predictor for outcome in sporadic colorectal carcinoma // *Oncol Rep.* - 2012. - Vol. 28. - P. 1619-1624.

102. Lauscher J.C., Loddenkemper C., Kosel L., Grone J., Buhr H.J., Huber O. Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue // *Hum Pathol.* - 2007. - Vol. 38. - P. 978-985.

103. Lee J.Y., Terakawa T., Qi Z., Steinfeld J.B., Redding S., Kwon Y., Gaines W.A., Zhao W., Sung P., Greene E.C. DNA RECOMBINATION. Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases // *Science.* - 2015. - Vol. 349. - P. 977-981.

104. Lee M., Lipfert J., Sanchez H., Wyman C., Dekker N.H. Structural and torsional properties of the RAD51-dsDNA nucleoprotein filament // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - Vol. 41. - P. 7023-7030.

105. Lee W.M., Reece P.J., Marchington R.F., Metzger N.K., Dholakia K. Construction and calibration of an optical trap on a fluorescence optical microscope // *Nat Protoc.* - 2007. - Vol. 2. - P. 3226-3238.

106. Leger J.F., Robert J., Bourdieu L., Chatenay D., Marko J.F. RecA binding to a single double-stranded DNA molecule: a possible role of DNA conformational fluctuations // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1998. - Vol. 95. - P. 12295-12299.

107. Leng F., Priebe W., Chaires J.B. Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic // *Biochemistry.* - 1998. - Vol. 37. - P. 1743-1753.

108. Li X., Heyer W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance // *Cell Res.* - 2008. - Vol. 18. - P. 99-113.

109. Liu S., Wang Y. Application of AFM in microbiology: a review // *Scanning.* - 2010.

- Vol. 32. - P. 61-73.

110. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1997. - Vol. 94. - P. 496-501.

111. Mahamdeh M., Campos C.P., Schaffer E. Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers // *Opt Express.* - 2011. - Vol. 19. - P. 11759-11768.

112. Masson J.Y., West S.C. The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship // *Trends Biochem Sci.* - 2001. - Vol. 26. - P. 131-136.

113. Matias P.M., Gorynia S., Donner P., Carrondo M.A. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1 // *J Biol Chem.* - 2006. - Vol. 281. - P. 38918-38929.

114. Mazin A.V., Kowalczykowski S.C. The specificity of the secondary DNA binding site of RecA protein defines its role in DNA strand exchange // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1996. - Vol. 93. - P. 10673-10678.

115. Mazin A.V., Kowalczykowski S.C. The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange // *EMBO J.* - 1998. - Vol. 17. - P. 1161-1168.

116. McIlwraith M.J., Hall D.R., Stasiak A.Z., Stasiak A., Wigley D.B., West S.C. RadA protein from *Archaeoglobus fulgidus* forms rings, nucleoprotein filaments and catalyses homologous recombination // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - Vol. 29. - P. 4509-4517.

117. Minton K.W. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* // *Mutat Res.* - 1996. - Vol. 363. - P. 1-7.

118. Miyagi A., Ando T., Lyubchenko Y.L. Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high-speed atomic force microscopy // *Biochemistry.* - 2011. - Vol. 50. - P. 7901-7908.

119. Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.H., Sen S., Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex // *Science.* - 2004. - Vol. 303. - P. 343-348.

120. Moffitt J.R., Chemla Y.R., Izhaky D., Bustamante C. Differential detection of dual traps improves the spatial resolution of optical tweezers // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -

2006. - Vol. 103. - P. 9006-9011.

121. Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair // *Mol Cell*. - 2003. - Vol. 11. - P. 1337-1347.

122. Morimatsu K., Kowalczykowski S.C. RecQ helicase and RecJ nuclease provide complementary functions to resect DNA for homologous recombination // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2014. - Vol. 111. - P. E5133-5142.

123. Morita R., Nakane S., Shimada A., Inoue M., Iino H., Wakamatsu T., Fukui K., Nakagawa N., Masui R., Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems // *J Nucleic Acids*. - 2010. - Vol. 2010. - P. 179594.

124. Nano N., Houry W.A. Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. - 2013. - Vol. 368. - P. 20110399.

125. Neuman K.C., Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy // *Nat Methods*. - 2008. - Vol. 5. - P. 491-505.

126. Newman D.R., Kuhn J.F., Shanab G.M., Maxwell E.S. Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription // *RNA*. - 2000. - Vol. 6. - P. 861-879.

127. Nguyen V.Q., Ranjan A., Stengel F., Wei D., Aebersold R., Wu C., Leschziner A.E. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1 // *Cell*. - 2013. - Vol. 154. - P. 1220-1231.

128. Nyberg L.K., Persson F., Berg J., Bergstrom J., Fransson E., Olsson L., Persson M., Stalnacke A., Wiggenius J., Tegenfeldt J.O., Westerlund F. A single-step competitive binding assay for mapping of single DNA molecules // *Biochem Biophys Res Commun*. - 2012. - Vol. 417. - P. 404-408.

129. Ohdate H., Lim C.R., Kokubo T., Matsubara K., Kimata Y., Kohno K. Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth // *J Biol*

Chem. - 2003. - Vol. 278. - P. 14647-14656.

130. Pages V., Koffel-Schwartz N., Fuchs R.P. recX, a new SOS gene that is co-transcribed with the recA gene in *Escherichia coli* // DNA Repair (Amst). - 2003. - Vol. 2. - P. 273-284.

131. Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. The Ino80 chromatin-remodeling enzyme regulates replisome function and stability // Nat Struct Mol Biol. - 2008. - Vol. 15. - P. 338-345.

132. Papin C., Humbert O., Kalashnikova A., Eckert K., Morera S., Kas E., Grigoriev M. 3'- to 5' DNA unwinding by TIP49b proteins // FEBS J. - 2010. - Vol. 277. - P. 2705-2714.

133. Paramanathan T., Vladescu I., McCauley M.J., Rouzina I., Williams M.C. Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D // Nucleic Acids Res. - 2012. - Vol. 40. - P. 4925-4932.

134. Perkins T.T. Angstrom-precision optical traps and applications // Annu Rev Biophys. - 2014. - Vol. 43. - P. 279-302.

135. Persson F., Bingen P., Staudt T., Engelhardt J., Tegenfeldt J.O., Hell S.W. Fluorescence nanoscopy of single DNA molecules by using stimulated emission depletion (STED) // Angew Chem Int Ed Engl. - 2011. - Vol. 50. - P. 5581-5583.

136. Persson F., Tegenfeldt J.O. DNA in nanochannels--directly visualizing genomic information // Chem Soc Rev. - 2010. - Vol. 39. - P. 985-999.

137. Petukhov M., Dagkessamanskaja A., Bommer M., Barrett T., Tsaneva I., Yakimov A., Queval R., Shvetsov A., Khodorkovskiy M., Kas E., Grigoriev M. Large-scale conformational flexibility determines the properties of AAA+ TIP49 ATPases // Structure. - 2012. - Vol. 20. - P. 1321-1331.

138. Phizicky E.M., Roberts J.W. Induction of SOS functions: regulation of proteolytic activity of *E. coli* RecA protein by interaction with DNA and nucleoside triphosphate // Cell. - 1981. - Vol. 25. - P. 259-267.

139. Piechura J.R., Tseng T.L., Hsu H.F., Byrne R.T., Windgassen T.A., Chitteni-Pattu S., Battista J.R., Li H.W., Cox M.M. Biochemical characterization of RecA variants that contribute to extreme resistance to ionizing radiation // DNA Repair (Amst). - 2015. -

Vol. 26. - P. 30-43.

140. Priest D.G., Kumar S., Yan Y., Dunlap D.D., Dodd I.B., Shearwin K.E. Quantitation of interactions between two DNA loops demonstrates loop domain insulation in *E. coli* cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2014. - Vol. 111. - P. E4449-4457.

141. Qiu X.B., Lin Y.L., Thome K.C., Pian P., Schlegel B.P., Weremowicz S., Parvin J.D., Dutta A. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth // *J Biol Chem.* - 1998. - Vol. 273. - P. 27786-27793.

142. Rajan R., Bell C.E. Crystal structure of RecA from *Deinococcus radiodurans*: insights into the structural basis of extreme radioresistance // *J Mol Biol.* - 2004. - Vol. 344. - P. 951-963.

143. Rao S.N., Kollman P.A. Molecular mechanical simulations on double intercalation of 9-amino acridine into d(CGCGCGC) X d(GCGCGCG): analysis of the physical basis for the neighbor-exclusion principle // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1987. - Vol. 84. - P. 5735-5739.

144. Ren J., Jenkins T.C., Chaires J.B. Energetics of DNA intercalation reactions // *Biochemistry.* - 2000. - Vol. 39. - P. 8439-8447.

145. Reuter M., Dryden D.T. The kinetics of YOYO-1 intercalation into single molecules of double-stranded DNA // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2010. - Vol. 403. - P. 225-229.

146. Rohrbach A. Switching and measuring a force of 25 femtoNewtons with an optical trap // *Opt Express.* - 2005. - Vol. 13. - P. 9695-9701.

147. Rombel I., Peters-Wendisch P., Mesecar A., Thorgeirsson T., Shin Y.K., Kustu S. MgATP binding and hydrolysis determinants of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein // *J Bacteriol.* - 1999. - Vol. 181. - P. 4628-4638.

148. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) // *Nat Methods.* - 2006. - Vol. 3. - P. 793-795.

149. Rye H.S., Yue S., Wemmer D.E., Quesada M.A., Haugland R.P., Mathies R.A., Glazer A.N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications // *Nucleic Acids Res.*

- 1992. - Vol. 20. - P. 2803-2812.

150. Salzer U., Kubicek M., Prohaska R. Isolation, molecular characterization, and tissue-specific expression of ECP-51 and ECP-54 (TIP49), two homologous, interacting erythroid cytosolic proteins // *Biochim Biophys Acta*. - 1999. - Vol. 1446. - P. 365-370.

151. Sattin B.D., Goh M.C. Direct observation of the assembly of RecA/DNA complexes by atomic force microscopy // *Biophys J*. - 2004. - Vol. 87. - P. 3430-3436.

152. Seitz E.M., Brockman J.P., Sandler S.J., Clark A.J., Kowalczykowski S.C. RadA protein is an archaeal RecA protein homolog that catalyzes DNA strand exchange // *Genes Dev*. - 1998. - Vol. 12. - P. 1248-1253.

153. Shaevitz J.W., Abbondanzieri E.A., Landick R., Block S.M. Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution // *Nature*. - 2003. - Vol. 426. - P. 684-687.

154. Sharples G.J., Ingleston S.M., Lloyd R.G. Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA // *J Bacteriol*. - 1999. - Vol. 181. - P. 5543-5550.

155. Shimada K., Oma Y., Schleker T., Kugou K., Ohta K., Harata M., Gasser S.M. Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks // *Curr Biol*. - 2008. - Vol. 18. - P. 566-575.

156. Shivashankar G.V., Feingold M., Krichevsky O., Libchaber A. RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: the role of ATP hydrolysis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1999. - Vol. 96. - P. 7916-7921.

157. Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Chervyakova D.B., Bakhlanova I.V., Yung I.A., Radulescu A., Kuklin A.I., Baitin D.M., Isaev-Ivanov V.V. Structure of RecX protein complex with the presynaptic RecA filament: Molecular dynamics simulations and small angle neutron scattering // *FEBS Lett*. - 2014. - Vol. 588. - P. 948-955.

158. Sigala B., Edwards M., Puri T., Tsaneva I.R. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis // *Exp Cell Res*. - 2005. - Vol. 310. - P. 357-369.

159. Singleton M.R., Dillingham M.S., Gaudier M., Kowalczykowski S.C., Wigley D.B. Crystal structure of RecBCD enzyme reveals a machine for processing DNA breaks // *Nature*. - 2004. - Vol. 432. - P. 187-193.

160. Sitters G., Kamsma D., Thalhammer G., Ritsch-Marte M., Peterman E.J., Wuite G.J. Acoustic force spectroscopy // *Nat Methods*. - 2015. - Vol. 12. - P. 47-50.
161. Slade D., Lindner A.B., Paul G., Radman M. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans* // *Cell*. - 2009. - Vol. 136. - P. 1044-1055.
162. Smith G.R. How RecBCD enzyme and Chi promote DNA break repair and recombination: a molecular biologist's view // *Microbiol Mol Biol Rev*. - 2012. - Vol. 76. - P. 217-228.
163. Smith S.B., Finzi L., Bustamante C. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads // *Science*. - 1992. - Vol. 258. - P. 1122-1126.
164. Sternberg S.H., Redding S., Jinek M., Greene E.C., Doudna J.A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9 // *Nature*. - 2014. - Vol. 507. - P. 62-67.
165. Stohl E.A., Brockman J.P., Burkle K.L., Morimatsu K., Kowalczykowski S.C., Seifert H.S. *Escherichia coli* RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo // *J Biol Chem*. - 2003. - Vol. 278. - P. 2278-2285.
166. Stracy M., Lesterlin C., Garza de Leon F., Uphoff S., Zawadzki P., Kapanidis A.N. Live-cell superresolution microscopy reveals the organization of RNA polymerase in the bacterial nucleoid // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2015. - Vol. 112. - P. E4390-4399.
167. Stracy M., Uphoff S., Garza de Leon F., Kapanidis A.N. In vivo single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair // *FEBS Lett*. - 2014. - Vol. 588. - P. 3585-3594.
168. Strick T.R., Allemand J.F., Bensimon D., Croquette V. Behavior of supercoiled DNA // *Biophys J*. - 1998. - Vol. 74. - P. 2016-2028.
169. Strick T.R., Croquette V., Bensimon D. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase // *Nature*. - 2000. - Vol. 404. - P. 901-904.
170. Takahashi M., Daune M., Schnarr M. Fluorescence study of the RecA-dependent proteolysis of LexA, the repressor of the SOS system in *Escherichia coli* // *FEBS Lett*. - 1986. - Vol. 196. - P. 215-218.

171. Tosi A., Haas C., Herzog F., Gilmozzi A., Berninghausen O., Ungewickell C., Gerhold C.B., Lakomek K., Aebersold R., Beckmann R., Hopfner K.P. Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex // *Cell*. - 2013. - Vol. 154. - P. 1207-1219.
172. Uchihashi T., Iino R., Ando T., Noji H. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F(1)-ATPase // *Science*. - 2011. - Vol. 333. - P. 755-758.
173. Ughetto G., Wang A.H., Quigley G.J., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A. A comparison of the structure of echinomycin and triostin A complexed to a DNA fragment // *Nucleic Acids Res.* - 1985. - Vol. 13. - P. 2305-2323.
174. Umezu K., Chi N.W., Kolodner R.D. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 1993. - Vol. 90. - P. 3875-3879.
175. van den Broek B., Noom M.C., Wuite G.J. DNA-tension dependence of restriction enzyme activity reveals mechanochemical properties of the reaction pathway // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - Vol. 33. - P. 2676-2684.
176. van der Heijden T., Dekker C. Monte carlo simulations of protein assembly, disassembly, and linear motion on DNA // *Biophys J*. - 2008. - Vol. 95. - P. 4560-4569.
177. van der Heijden T., Seidel R., Modesti M., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. Real-time assembly and disassembly of human RAD51 filaments on individual DNA molecules // *Nucleic Acids Res.* - 2007. - Vol. 35. - P. 5646-5657.
178. van Loenhout M.T., Kerssemakers J.W., De Vlaminc I., Dekker C. Non-bias-limited tracking of spherical particles, enabling nanometer resolution at low magnification // *Biophys J*. - 2012. - Vol. 102. - P. 2362-2371.
179. van Loenhout M.T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA // *Nucleic Acids Res.* - 2009. - Vol. 37. - P. 4089-4099.
180. van Mameren J., Modesti M., Kanaar R., Wyman C., Peterman E.J., Wuite G.J. Counting RAD51 proteins disassembling from nucleoprotein filaments under tension // *Nature*. - 2009. - Vol. 457. - P. 745-748.

181. van Mameren J., Wuite G.J., Heller I. Introduction to optical tweezers: background, system designs, and commercial solutions // *Methods Mol Biol.* - 2011. - Vol. 783. - P. 1-20.
182. VanLoock M.S., Yu X., Yang S., Galkin V.E., Huang H., Rajan S.S., Anderson W.F., Stohl E.A., Seifert H.S., Egelman E.H. Complexes of RecA with LexA and RecX differentiate between active and inactive RecA nucleoprotein filaments // *J Mol Biol.* - 2003. - Vol. 333. - P. 345-354.
183. Vanzi F., Broggio C., Sacconi L., Pavone F.S. Lac repressor hinge flexibility and DNA looping: single molecule kinetics by tethered particle motion // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - P. 3409-3420.
184. Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D., Artandi S.E. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly // *Cell.* - 2008. - Vol. 132. - P. 945-957.
185. Vermeulen K.C., Wuite G.J., Stienen G.J., Schmidt C.F. Optical trap stiffness in the presence and absence of spherical aberrations // *Appl Opt.* - 2006. - Vol. 45. - P. 1812-1819.
186. Vierling S., Weber T., Wohlleben W., Muth G. Transcriptional and mutational analyses of the *Streptomyces lividans* recX gene and its interference with RecA activity // *J Bacteriol.* - 2000. - Vol. 182. - P. 4005-4011.
187. Vincent J.A., Kwong T.J., Tsukiyama T. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape // *Nat Struct Mol Biol.* - 2008. - Vol. 15. - P. 477-484.
188. Vladescu I.D., McCauley M.J., Nunez M.E., Rouzina I., Williams M.C. Quantifying force-dependent and zero-force DNA intercalation by single-molecule stretching // *Nat Methods.* - 2007. - Vol. 4. - P. 517-522.
189. Voigt N.V., Topping T., Rotaru A., Jacobsen M.F., Ravnsbaek J.B., Subramani R., Mamdouh W., Kjems J., Mokhir A., Besenbacher F., Gothelf K.V. Single-molecule chemical reactions on DNA origami // *Nat Nanotechnol.* - 2010. - Vol. 5. - P. 200-203.
190. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring

enzymes and a common nucleotide binding fold // *EMBO J.* - 1982. - Vol. 1. - P. 945-951.

191. Wang A.H., Ughetto G., Quigley G.J., Rich A. Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution // *Biochemistry.* - 1987. - Vol. 26. - P. 1152-1163.

192. Wang F., Redding S., Finkelstein I.J., Gorman J., Reichman D.R., Greene E.C. The promoter-search mechanism of *Escherichia coli* RNA polymerase is dominated by three-dimensional diffusion // *Nat Struct Mol Biol.* - 2013. - Vol. 20. - P. 174-181.

193. Watanabe S., Tan D., Lakshminarasimhan M., Washburn M.P., Hong E.J., Walz T., Peterson C.L. Structural analyses of the chromatin remodelling enzymes INO80-C and SWR-C // *Nat Commun.* - 2015. - Vol. 6. - P. 7108.

194. Watkins N.J., Dickmanns A., Luhrmann R. Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP // *Mol Cell Biol.* - 2002. - Vol. 22. - P. 8342-8352.

195. Watkins N.J., Lemm I., Ingelfinger D., Schneider C., Hossbach M., Urlaub H., Luhrmann R. Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex // *Mol Cell.* - 2004. - Vol. 16. - P. 789-798.

196. Wigley D.B. Bacterial DNA repair: recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB // *Nat Rev Microbiol.* - 2013. - Vol. 11. - P. 9-13.

197. Wong M., Kong S., Dragowska W.H., Bally M.B. Oxazole yellow homodimer YOYO-1-labeled DNA: a fluorescent complex that can be used to assess structural changes in DNA following formation and cellular delivery of cationic lipid DNA complexes // *Biochim Biophys Acta.* - 2001. - Vol. 1527. - P. 61-72.

198. Wood M.A., McMahon S.B., Cole M.D. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc // *Mol Cell.* - 2000. - Vol. 5. - P. 321-330.

199. Wyman C. Mechanistic insight from chaos: how RecA mediates DNA strand exchange // *Structure.* - 2011. - Vol. 19. - P. 1031-1032.

200. Wyman C., Kanaar R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well // *Annu Rev Genet.* - 2006. - Vol. 40. - P. 363-383.
201. Yang M.K., Chou M.E., Yang Y.C. Molecular characterization and expression of the *recX* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* // *Curr Microbiol.* - 2001. - Vol. 42. - P. 257-263.