

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**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

---

Санкт-Петербург

2016

Работа выполнена в НИК «Нанобиотехнологии», Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

**Научный руководитель:**

**Ходорковский Михаил Алексеевич**

Кандидат физико-математических наук, директор НИК «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «СПбПУ»

**Официальные оппоненты:**

**Касьяненко Нина Анатольевна**

доктор физико-математических наук, профессор кафедры «Молекулярной биофизики и физики полимеров» физического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Хайтлина Софья Юрьевна**

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела клеточных культур, ФГБУН «Институт цитологии» РАН

**Ведущая организация:**

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»

Защита состоится 5 апреля 2016 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО «СПбПУ»), по адресу: 195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29, Гидрокорпус-2, ауд. 109.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 195251, Санкт-Петербург, Политехническая, 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» [www.spbstu.ru](http://www.spbstu.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук:



Линькова Наталья Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Молекула ДНК обладает уникальными физическими и химическими свойствами, что определяет ее способность взаимодействовать с широким спектром веществ. Исследование процессов взаимодействия ДНК с различными лигандами является актуальным как для решения фундаментальных вопросов о механизме действия ДНК-связывающих агентов, так и в прикладных целях, в частности, при поиске потенциальных мишеней для регулирования клеточных процессов, ключевую роль в которых играют ДНК-белковые взаимодействия.

Один из современных подходов в изучении свойств ДНК-связывающих агентов основывается на использовании одномолекулярных методов, которые позволяют наблюдать за индивидуальными молекулами ДНК в растворе, манипулировать ими и проводить измерения их механических свойств в физиологических условиях, а также изучать динамические изменения этих свойств в ходе взаимодействия с различными лигандами. Применение таких методов за последние 20 лет существенно расширило область знаний о таких фундаментальных клеточных процессах, как репликация, транскрипция, хранение генетической информации, репарация ДНК, а также позволило определить влияние различных веществ небелковой природы, таких как флуоресцентные красители и антибактериальные агенты, на свойства ДНК.

Настоящая работа посвящена исследованию процессов взаимодействия индивидуальных молекул ДНК со следующими ДНК-связывающими агентами:

- новым перспективным флуоресцентным красителем GelRed;
- высококонсервативным белком TP49a, являющимся компонентом хроматин-ремоделирующих комплексов в клетках эукариот;
- ключевым ферментом бактериальной рекомбинационной репарации белком RecA бактерии *D. radiodurans*, обладающей особо эффективной системой восстановления повреждений ДНК;
- регуляторным белком RecX (*E. coli*), ингибирующим ДНК-связывающую активность RecA (*E. coli*).

Актуальность выбранного направления исследований обусловлена тем, что механизмы взаимодействия этих объектов с ДНК не установлены, в то время как исследуемые белки играют важную роль в жизнедеятельности клеток человека и бактерий, а ДНК связывающие свойства

красителя GelRed необходимо учитывать при его использовании в исследовательских и диагностических целях.

Для обеспечения проведения одномолекулярных исследований в рамках настоящей работы был реализован современный подход с использованием микрофлюидных устройств и комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии. Для тестирования созданной установки и экспериментальных методик в качестве ДНК-связывающего агента с известным механизмом взаимодействия с ДНК был использован интеркалирующий краситель YOYO-1, широко применяющийся для флуоресцентной визуализации индивидуальных молекул ДНК.

### **Цели и задачи исследования**

**Цель работы:** Исследование на одномолекулярном уровне механизмов взаимодействия ДНК с белками RecA (*E.coli*, *D. radiodurans*), TIR49a и флуоресцентным красителем GelRed.

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

1. Разработка и создание экспериментальной установки и соответствующих методик для исследования механизмов взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами на уровне индивидуальных молекул.
2. Исследование динамики изменения механических свойств молекул ДНК при взаимодействии с красителями YOYO-1 и GelRed.
3. Исследование динамики формирования комплексов белка TIR49a на молекулах ДНК с использованием комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии.
4. Исследование влияния белка RecX (*E.coli*) на механические свойства ДНК-белковых филаментов RecA (*E.coli*).
5. Исследование динамики формирования ДНК-белковых филаментов RecA (*D.radiodurans*) и RecA (*E.coli*).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Создана экспериментальная установка и разработаны методики, обеспечивающие исследование процессов взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами на одномолекулярном уровне.

2. Анализ динамики изменения механических свойств индивидуальных молекул ДНК при взаимодействии с ДНК-связывающими агентами указывает на то, что:
- краситель GelRed является интеркалятором;
  - белок RecX (*E.coli*) стимулирует кооперативный механизм разборки филаментов дндНК-RecA (*E.coli*);
  - RecA (*D.radiodurans*) формирует на дндНК филаменты, обладающие меньшими значениями персистентной и контурной длин по сравнению с RecA (*E.coli*), что соответствует модели, в рамках которой соотношение скоростей нуклеации и элонгации RecA (*D.radiodurans*) на дндНК больше, чем для белка RecA (*E.coli*).
3. Белок TP49a образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

Впервые охарактеризовано влияние нового красителя GelRed на механические свойства ДНК. Понимание механизмов взаимодействия GelRed с ДНК будет способствовать его эффективному использованию в научных исследованиях и диагностике.

Впервые визуализирована динамика взаимодействия TP49a с индивидуальными молекулами ДНК, в результате чего установлено, что TP49a образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК. Новые данные о свойствах этого белка будут способствовать более глубокому пониманию его роли в различных клеточных процессах, включая его функции в составе хроматин-ремоделирующих комплексов.

Впервые исследована динамика разборки ДНК-белковых филаментов RecA в результате взаимодействия с белком-регулятором RecX. Полученные результаты свидетельствуют о кооперативности этого механизма и дополняют представления о регуляции активности RecA в клетках бактерий. Так как RecA является одним из ключевых компонентов системы SOS-ответа бактерий, полученные данные способствуют пониманию выживания бактерий в стрессовых условиях, в частности при воздействии антибиотиков.

Впервые охарактеризованы механические свойства филаментов дндНК-RecA (*D.radiodurans*), а также проведено прямое сравнение со свойствами филаментов дндНК-RecA (*E.coli*). Полученные результаты позволяют сделать вывод о механизме формирования филамента дндНК-RecA (*D.radiodurans*) и дополняют существующие знания о процессе

репарации ДНК в бактерии *D.radiodurans*, обладающей феноменальной устойчивостью к ионизирующему излучению.

Практической ценностью настоящей работы является также то, что созданные в ходе работы экспериментальная установка и методики могут быть использованы для изучения на одномолекулярном уровне механизмов взаимодействия ДНК с различными белками и веществами небелковой природы.

### **Личный вклад автора**

Создание экспериментальной установки, проведение всех экспериментальных процедур и обработка результатов выполнены автором лично. Все исследования проводились на оборудовании НИК «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «СПбПУ». Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

### **Апробация работы**

По результатам исследований опубликовано 12 работ (в том числе 2 статьи в рецензируемых научных журналах).

Основные результаты работы были представлены на 1-й и 2-й международных конференциях по белкам Pontin и Reptin (Бордо, Франция, октябрь 2012; Оэйраш, Португалия, октябрь 2014), Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12» (Пушино, Россия, октябрь 2012), 23-й международной конференции «Лазеры. Измерения. Информация.» (Санкт-Петербург, Россия, июнь 2013), 38-м международном конгрессе Федерации Европейского Биохимического Общества, FEBS (Санкт-Петербург, Россия, июнь 2013), международной конференции по геликазам и транслоказам Европейской Организации Молекулярной Биологии, ЕМВО (Кембридж, Великобритания, август 2013), 1-й Международной конференции по Оптоэлектронике, Фотонике, Технике и Наноструктурам (Санкт-Петербург, Россия, март 2014), 22-м международном симпозиуме Наноструктуры: Физика и Технологии (Санкт-Петербург, Россия, июнь 2014), 59-м ежегодном съезде Биофизического Сообщества (Балтимор, США, февраль 2015).

### **Структура и объем диссертации**

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

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проведения исследований на уровне индивидуальных молекул ДНК в работе был использован метод оптического захвата, в основе которого лежит эффект удержания микроскопических диэлектрических объектов, например кварцевых и полистироловых микросфер, при помощи сфокусированного лазерного пучка. Манипулирование молекулами ДНК осуществлялось за счет их специфического прикрепления к полистироловым микросферам, которые выступали в роли «ручек» для удержания ДНК. Перемещение микросфер при помощи лазерного пучка позволяло растягивать ДНК с силой, значение которой определялось по смещению микросферы из центра оптической ловушки.

В ходе работы была создана экспериментальная установка на базе установки «Лазерный пинцет» (НИК «Нанобиотехнологии» ФГАОУ ВО «СПбПУ»), основным недостатком которой являлось отсутствие возможности создания нескольких оптических ловушек, а также низкое значение жесткости генерируемой оптической ловушки, что не позволяло прикладывать силы к манипулируемым объектам выше 10 пН. В тоже время при проведении одномолекулярных исследований ДНК наиболее универсальной является схема с использованием двух оптических ловушек. Кроме того, зачастую такие исследования требуют приложения сил в диапазоне от единиц до десятков пиконьютонов. В связи с этим, создание экспериментальной установки включало в себя модернизацию оптической схемы установки «Лазерный пинцет» с целью реализации двух оптических ловушек и повышения их жесткости, разработку и создание конструкции микрофлюидной камеры и системы подачи жидкостей, а также разработку программного обеспечения для проведения одномолекулярных экспериментов, получения и обработки экспериментальных данных.

### Экспериментальная установка

Установка «Лазерный пинцет» построена на базе неинвертированного флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss AxioImager.Z1. Для создания оптической ловушки используется твердотельный Nd:YVO<sub>4</sub> лазер (Spectra Physics BL-106C), работающий в непрерывном режиме, с диодной накачкой, длиной волны 1064 нм и максимальной мощностью излучения 5 Вт. Оптическая ловушка формируется при фокусировании лазерного пучка с помощью объектива с высокой численной апертурой. В работе использовали объективы с масляной иммерсией, NA=1,45 (Carl Zeiss Plan-Apochromat Oil DIC, 100X) или NA=1,25 (LOMO, 100X).

Для формирования двух оптических ловушек в оптическом пути были установлены поляризационные светоделительные кубы, которые обеспечивают разделение пучка света на две

составляющие, соответствующие двум ортогональным поляризациям. Вертикально поляризованную составляющую лазерного пучка использовали для создания стационарной оптической ловушки, а горизонтально поляризованную составляющую - для создания перемещаемой оптической ловушки. Независимое перемещение одной из оптических ловушек осуществляли за счет поворота пьезо-зеркала, на который попадает соответствующий лазерный пучок. Для этого в оптической схеме было реализовано оптическое сопряжение плоскости пьезо-зеркала и задней фокальной плоскости объектива микроскопа. Для реализации комбинации методов оптического захвата и флуоресцентной микроскопии использовали функции регистрации флуоресценции микроскопа Carl Zeiss AxioImager.Z1.

Для поддержания и регулировки температуры при проведении одномолекулярных экспериментов часть экспериментальной установки помещали 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 термопары, 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.

В экспериментах по исследованию одиночных молекул ДНК манипуляцию ДНК осуществляли путем оптического захвата двух микросфер, покрытых стрептавидином, на которых фиксировали молекулу ДНК, содержащую на концах несколько биотинилированных нуклеотидов. Определение положения микросфер, удерживаемых в оптических ловушках, осуществляли путем регистрации изображений микросфер при помощи ПЗС камеры и последующей обработки изображений с целью вычисления положения центра каждой из микросфер. При исследовании взаимодействия ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed обработку изображений проводили после окончания экспериментов в программном пакете ImageJ, где была создана программа, позволяющая вычислять центр масс изображения микросферы с точностью не хуже 20 нм. При проведении других исследований, представленных в данной работе, осуществляли потоковую обработку изображений микросфер с помощью программы, разработанной в среде LabView, позволяющей определять центр изображения микросферы с точностью не хуже 20 нм с частотой 100 Гц.

Для проведения одномолекулярных экспериментов была разработана конструкция четырехканальной микрофлюидной камеры, которая представляет собой микрофлюидное



устройство с 4-мя входными каналами шириной 1 мм, сходящимися в общий канал шириной 4 мм. Каналы формировали в слое двухстороннего скотча толщиной 110 мкм, заключенном между предметным и покровным микроскопными стеклами. Входы и выход камеры герметично соединяли с полиэтиленовыми трубками, по которым осуществлялась подача и вывод жидкостей из микрофлюидной камеры. Подачу жидкостей в камеру осуществляли при помощи шприцевого насоса Harvard Apparatus Pump 11 Pico Plus, модернизированного для крепления четырех шприцов.

### **ДНК субстрат, красители, белки**

В качестве ДНК субстрата при проведении одномолекулярных экспериментов использовали двунитевую ДНК бактериофага  $\lambda$  (48502 пары оснований), длина которой составляет порядка 16 мкм. Модифицирование концов ДНК осуществляли в ходе полимеразной реакции с использованием фрагмента Кленова ДНК полимеразы I и биотинилированных нуклеотидов biotin-11-dGTP.

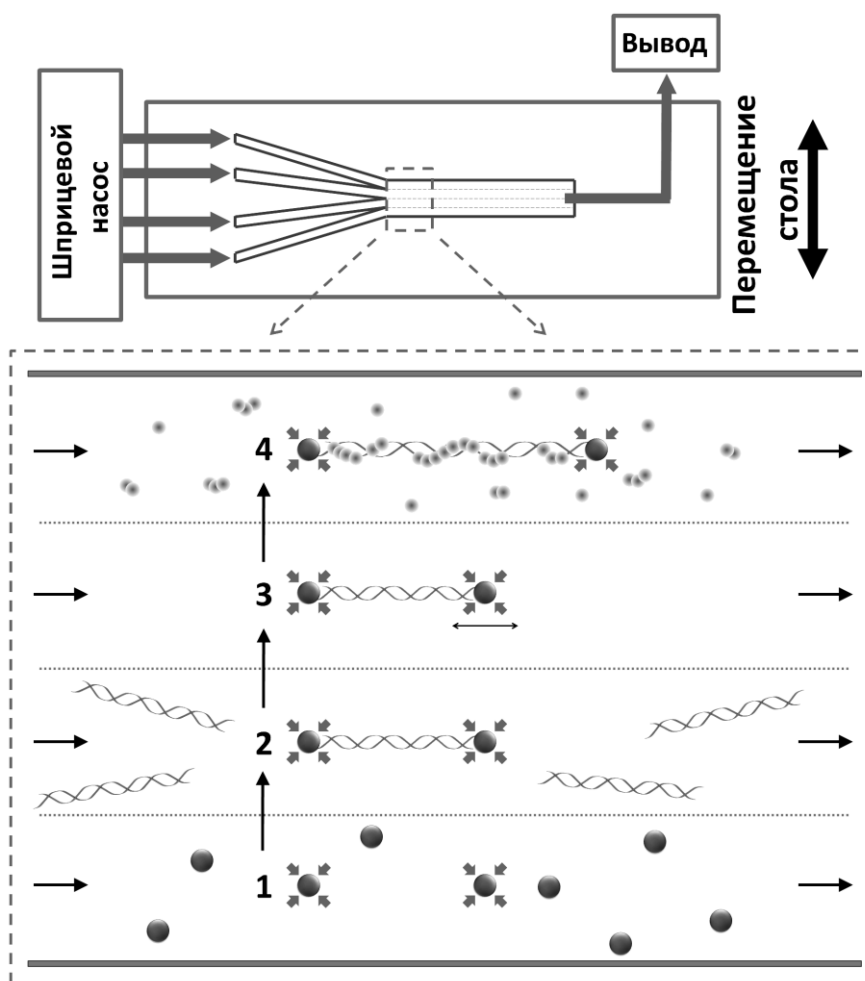
Красители YOYO-1 (раствор в ДМСО концентрации 1 мМ, Invitrogen, США) и GelRed (водный раствор концентрации 10 мг/мл, Biotium, США) были приобретены коммерчески.

Для изучения взаимодействия ДНК с белком TIP49a использовали белок слияния TIP49a-Dendra2 (His-tag-Dendra2-TIP49a, Dendra2 - флуоресцентный белок из *Dendronephthya sp.*), который был клонирован в плазмиду pET3a под Lac промотором и экспрессирован в клетках *E.coli* (штамм Rosetta) с индукцией IPTG. Очистку белка проводили методом аффинной хроматографии с использованием колонки GE Healthcare HisTrap HP (1мл). Степень очистки полученного белка слияния составила не менее 80%.

Белки RecA (*E.coli*), RecA (*D.radiodurans*) и RecX (*E.coli*) предоставил Дмитрий Байтин (Петербургский институт ядерной физики, Гатчина, Россия). Данные белки были экспрессированы в клетках *E.coli* без N- или C- концевых тагов и очищены в соответствии с ранее опубликованными протоколами. Чистота RecA (*E.coli*) и RecA (*D.radiodurans*) составила не менее 95%, RecX (*E.coli*) – не менее 93%. Для оценки активности белков RecA (*E.coli*) и RecA (*D.radiodurans*) была измерена АТФзная активность в присутствии одонитевой ДНК. Каталитическая константа скорости гидролиза АТФ составила 30 мкМ/мин для RecA (*E.coli*) и 21 мкМ/мин для RecA (*D.radiodurans*), что соответствует литературным данным об активности этих белков.

## Методика проведения одномолекулярных экспериментов

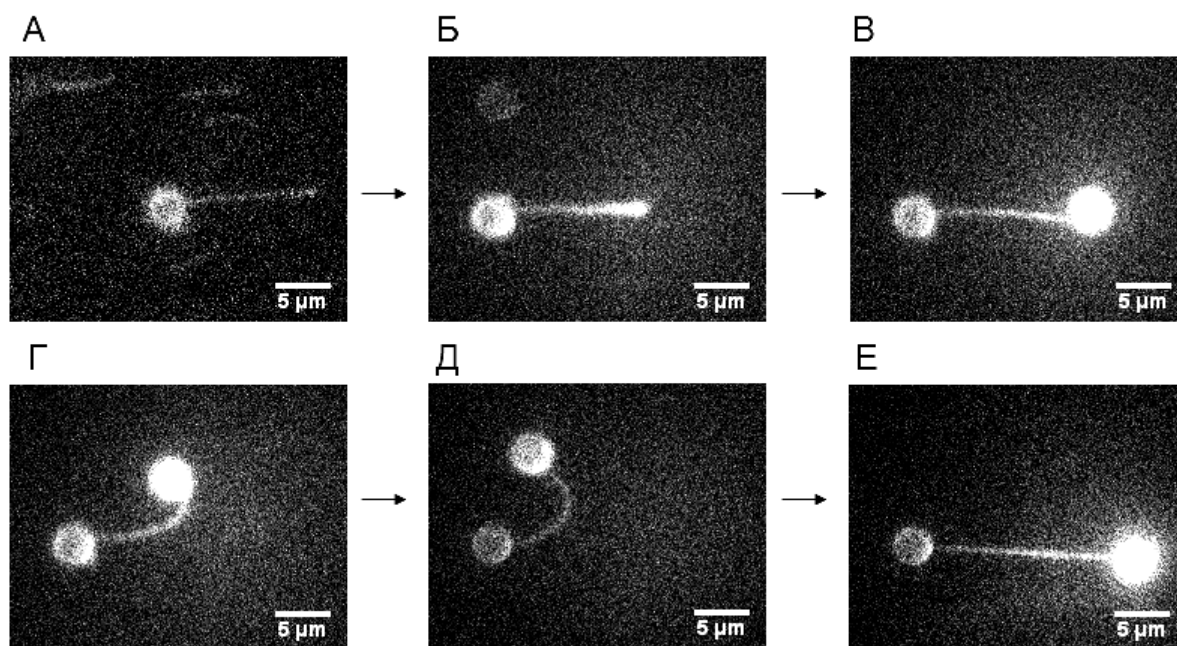
При одновременной подаче растворов в каналы микрофлюидной камеры обеспечивалось условие ламинарности потоков, в результате чего при объединении прокачиваемых растворов в общем канале микрофлюидной камеры смешивание между соседними потоками было обусловлено только процессом диффузии в ограниченной области на их границе. В каналы камеры подавали следующие растворы (рис.1): 1 канал - раствор микросфер, покрытых стрептавидином (диаметром 3 мкм, 5 мкм или 2,1 мкм); 2 канал - раствор биотинилированных молекул ДНК; 3 канал - буферный раствор; 4 канал - раствор исследуемого ДНК-связывающего агента.



**Рис. 1.** Схема проведения эксперимента по исследованию взаимодействия ДНК с белками и красителями. В первом канале (1) микрофлюидной камеры осуществляется оптический захват двух микросфер. Затем путем перемещения микрофлюидной камеры относительно объектива микроскопа микросферы переводятся во второй канал (2), содержащий раствор биотинилированных молекул ДНК, где происходит прикрепление конца ДНК к одной из микросфер. Далее, в третьем канале (3), содержащем буферный раствор, свободный конец ДНК

прикрепляется ко второй микросфере. После проверки того, что между микросферами закреплена только одна молекула ДНК, полученная конструкция переводится в четвертый канал (4), содержащий исследуемый ДНК-связывающий агент.

В первых трех каналах микрофлюидной камеры проводили захват микросфер и прикрепление к ним молекулы ДНК, после чего к ДНК прикладывали постоянную силу натяжения и переносили в четвертый канал, где наблюдали за изменением длины ДНК при взаимодействии с исследуемым агентом по изменению расстояния между микросферами. На рисунке 2 представлены флуоресцентные изображения, полученные в ходе прикрепления к микросферам, удерживаемым в оптических ловушках, молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1. При исследовании взаимодействия ДНК с красителями GelRed и YOYO-1 постоянную силу растяжения ДНК обеспечивали за счет выключения одной из оптических ловушек. В данном случае ДНК была растянута за счет силы вязкого трения, действующей на отпущенную микросферу со стороны потока жидкости, значение которой составляло несколько пиконьютонов.



**Рис. 2.** Серия флуоресцентных изображений, полученных в ходе прикрепления к микросферам молекулы ДНК, окрашенной YOYO-1. **А.** Прикрепление ДНК к одной из микросфер во втором канале проточной камеры, выпрямление ДНК в потоке. **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

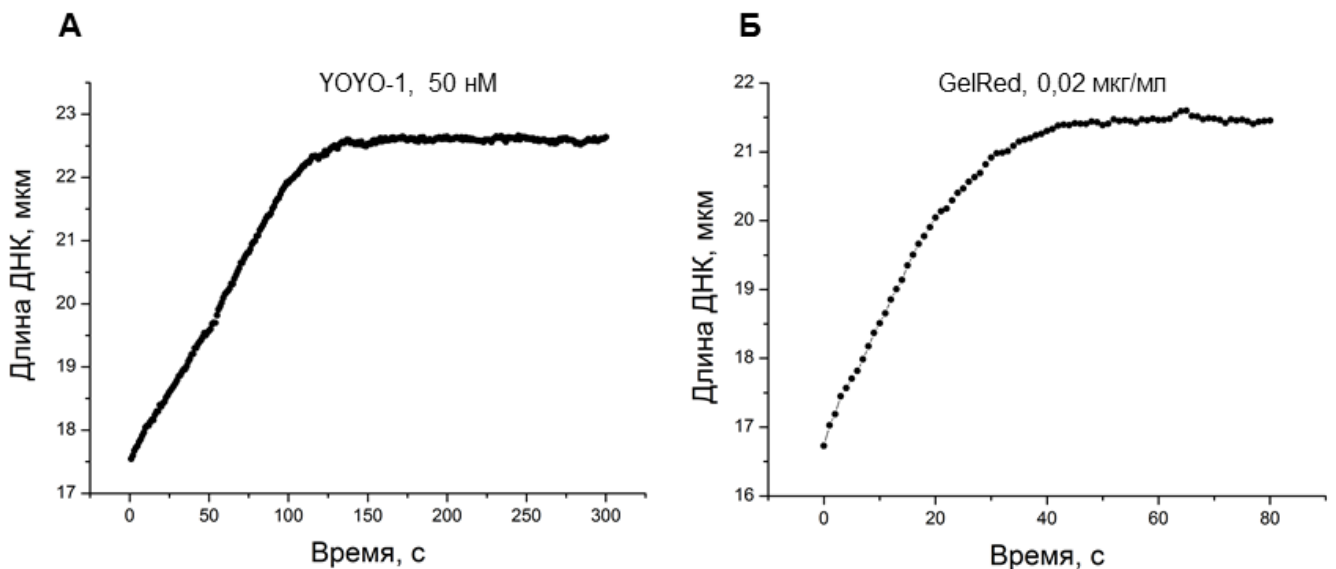
ловушек: молекула ДНК выпрямлена под действием силы, действующей на микросферу со стороны потока.

При исследовании взаимодействия ДНК с белками RecA (*E.coli*) и RecA (*D.radiodurans*) постоянную силу натяжения ДНК поддерживали за счет специально разработанной программы в среде LabView, которая позволяла с частотой 100 Гц измерять силу натяжения ДНК по смещению микросферы из центра стационарной оптической ловушки и регулировать данную силу за счет изменения расстояния между микросферами при помощи перемещаемой ловушки. При исследовании взаимодействия ДНК с белком TIR49a после инкубации в четвертом канале, содержащем раствор флуоресцентно меченного TIR49a, ДНК переводили в третий канал для регистрации флуоресцентных изображений TIR49a, связавшегося с ДНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Взаимодействие ДНК с красителями YOYO-1 и GelRed

В качестве буферного раствора при исследовании YOYO-1 во всех каналах камеры использовали следующий раствор: Tris-HCl 50 мМ (pH 8,2), MgCl<sub>2</sub> 1 мМ, 2-меркаптоэтиламин 100 мМ, 15% сахарозы, вода двойной степени очистки (MilliQ). Эксперименты проводили при комнатной температуре. В ходе исследования взаимодействия ДНК с YOYO-1 была охарактеризована динамика изменения длины ДНК при взаимодействии с YOYO-1 при постоянной силе растяжения ДНК (Рис.3, А). Контурная длина молекулы ДНК бактериофага  $\lambda$  составляет около 16,4 мкм (48502 пар оснований). При инкубации в 50 нМ растворе YOYO-1 длина ДНК увеличилась и составила  $22,61 \pm 0,04$  мкм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность), что на 37% больше контурной длины неокрашенной ДНК. Данное значение находится в согласии с литературными данными об удлинении ДНК в результате интеркаляции YOYO-1.



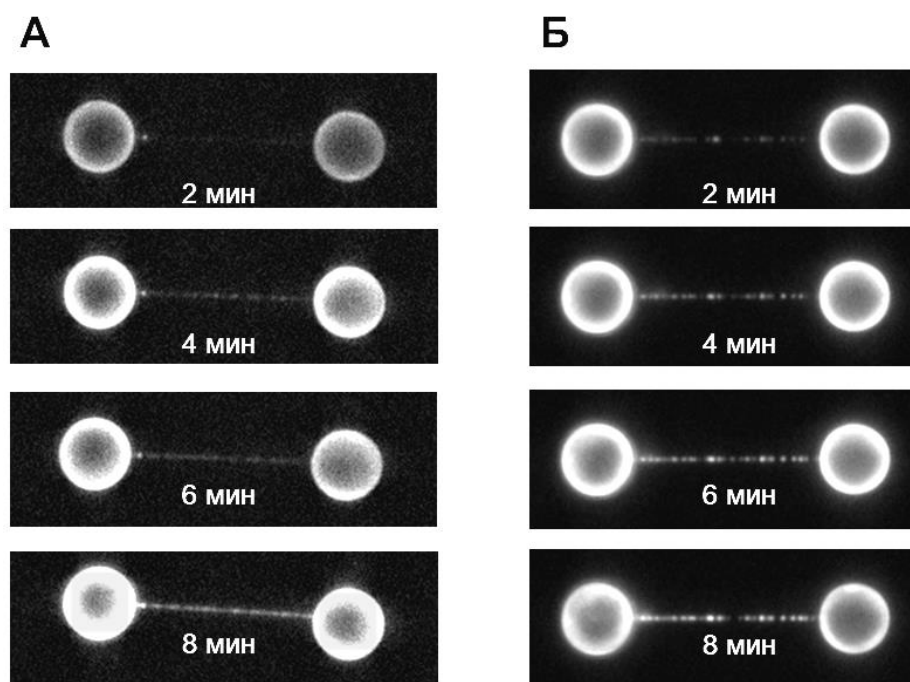
**Рис. 3.** Динамика изменения длины ДНК. А. В присутствии 50 нМ YOYO-1. Б. В присутствии 0,02 мкг/мл GelRed.

В начальный момент регистрации молекула ДНК уже является удлинённой. 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  $44 \pm 4$  нм/сек.

В качестве буферного раствора при исследовании GelRed во всех каналах камеры использовали следующий раствор: Tris 50 мМ (рН 7,5), глицерин 10%, вода двойной степени очистки (MilliQ). Эксперименты проводили при комнатной температуре. В ходе исследования взаимодействия ДНК с GelRed было установлено, что, как и в случае YOYO-1, встраивание GelRed приводит к увеличению длины ДНК (рис.3, Б). Длина ДНК до инкубации с GelRed составила  $15,77 \pm 0,06$  мкм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность). После инкубации с 0,02 мкг/мл GelRed длина ДНК увеличилась и составила  $21,47 \pm 0,12$  мкм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность). Линейная регрессия первого участка зависимости позволила определить скорость удлинения молекулы ДНК за счёт встраивания GelRed, которая составила  $159 \pm 2$  нм/сек.

### Взаимодействие ДНК с белком TIR49a

В качестве буферного раствора при исследовании TIR49a во всех каналах камеры использовали следующий раствор: Tris 50 мМ (рН 7,5), глицерин 10%, вода двойной степени очистки (MilliQ). Эксперименты проводили при комнатной температуре. В ходе проведения экспериментов по изучению взаимодействия ДНК с TIR49a были получены флуоресцентные изображения одиночных молекул ДНК после инкубации в растворе, содержащем 300 нМ флуоресцентно меченого белка TIR49a. С увеличением времени инкубации ДНК в растворе с TIR49a наблюдается усиление флуоресцентного сигнала белка, связанного с ДНК (рис.4). При этом наблюдается постепенное увеличение степени покрытия ДНК белком TIR49a. Это наблюдение свидетельствует о способности белка TIR49a взаимодействовать с ДНК в данных экспериментальных условиях. Распределение TIR49a по ДНК представляется в значительной степени гомогенным, что позволяет сделать предположение о том, что TIR49a образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК (рис.4, А). Также равномерность распределения TIR49a позволяет сделать предположение о том, что взаимодействие данного белка с ДНК преимущественно происходит за счет связывания мономеров или близких по размеру олигомеров.



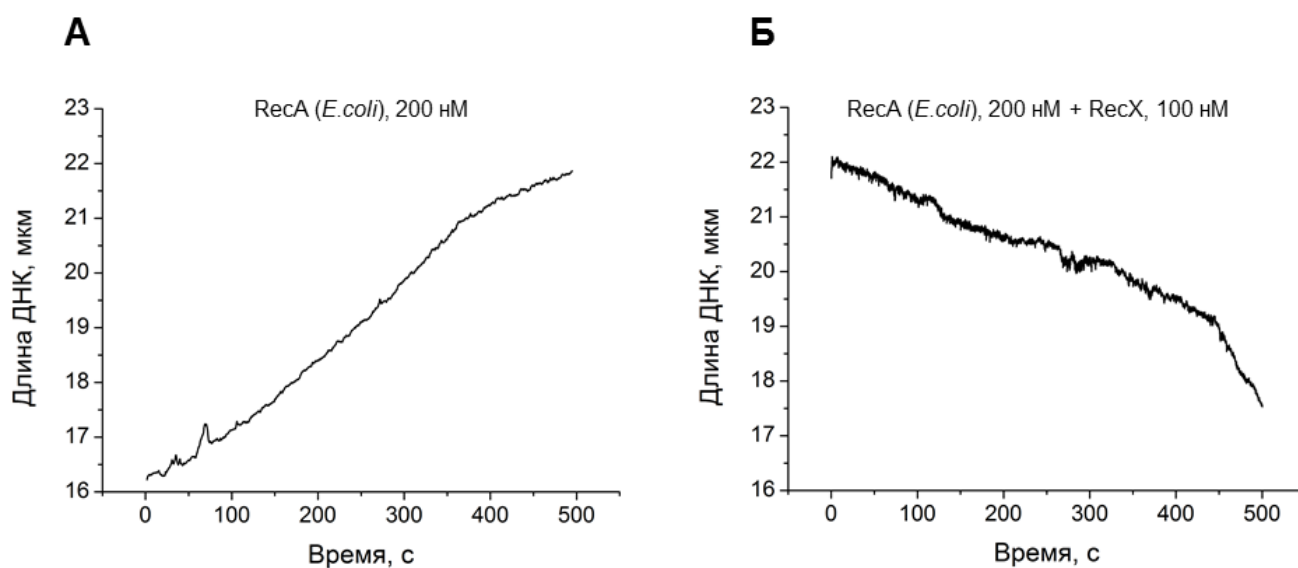
**Рис. 4. Флуоресцентные изображения одиночных молекул ДНК после инкубации в растворе с флуоресцентно-меченым белком TIR49a. А. Пример равномерного распределения TIR49a по ДНК. Б. Пример наблюдения ярких флуоресцентных объектов, связавшихся с ДНК, вероятно соответствующих олигомерным формам TIR49a с большой молекулярной массой.**

В ряде случаев наблюдалось связывание с ДНК объектов, интенсивность флуоресценции которых превышала среднюю интенсивность регистрируемой флуоресценции (рис.4, Б), что указывает на то, что с ДНК могут также связываться белковые комплексы TIR49a с заметно отличающимися размерами.

### Влияние RecX (*E.coli*) на стабильность филаментов днднк-RecA (*E.coli*)

При исследовании влияния RecX на стабильность филаментов днднк-RecA (*E.coli*) в третий канал микрофлюидной камеры подавали раствор, содержащий 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ, а в четвертый канал помимо 200 нМ RecA и 1 мМ АТФ добавляли 100 нМ RecX. Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, глицерин 10%. Эксперименты проводили при температуре 37°C. В данных условиях полимеризация RecA (*E.coli*) на двунитевой ДНК затруднена, в связи с чем, при построении филамента RecA ДНК растягивали с силой 45 pN для преодоления высокого энергетического барьера нуклеации RecA на днднк.

В данных экспериментальных условиях процесс построения филамента RecA (*E.coli*) на двунитевой ДНК происходил достаточно медленно (рис.5, А). Низкая скорость построения филамента связана, в первую очередь, с низкой скоростью нуклеации RecA (*E.coli*) на двунитевой ДНК. На временной зависимости увеличения длины ДНК наблюдаются преимущественно линейный рост, соответствующий постоянной скорости роста филамента, что свидетельствует о кооперативности данного процесса.



**Рис. 5.** Динамика изменения длины ДНК. **А.** В ходе формирования филаментов RecA (*E.coli*) в присутствии 200 нМ RecA (*E.coli*) и 1 мМ АТФ. **Б.** В ходе разборки филаментов RecA (*E.coli*) в присутствии 200 нМ RecA (*E.coli*), 1 мМ АТФ и 100 нМ RecX (*E.coli*).

Взаимодействие RecA с ДНК состоит из двух стадий – нуклеации, процесса, в ходе которого происходит первичное формирование стабильного комплекса RecA-ДНК, состоящего из нескольких мономеров RecA, и элонгации филамента RecA в 5'-3' направлении ДНК за счет присоединения последующих молекул белка к уже существующему ДНК-белковому комплексу. В данном случае под кооперативным понимается процесс, в рамках которого скорость элонгации филамента RecA существенно превышает скорость нуклеации. В таком случае, увеличение длины ДНК происходит в основном за счет элонгации существующих филаментов и характеризуется линейным ростом, соответствующим построению одного или нескольких филаментов RecA, а также резкими изменениями скорости роста длины ДНК при формировании новой точки нуклеации RecA или завершении построения одного из филаментов.

После инкубации в третьем канале 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.5, Б). При проведении контрольных экспериментов без добавления RecX в четвертый канал, уменьшения длины ДНК не наблюдали.

Существуют различные модели ингибирования ДНК-связывающей активности RecA белком RecX, однако, на данный момент экспериментальные данные, подтверждающие ту или иную модель, отсутствуют. Известно, что элонгация и разборка филаментов RecA происходит однонаправленно (в 5'-3' направлении ДНК), при этом скорость элонгации существенно превышает скорость разборки филамента, что суммарно обеспечивает рост филамента RecA. Одной из моделей ингибирования RecX является так называемый «кэппинг» (capping) механизм, в рамках которого RecX связывается с растущим концом филамента RecA и тем самым блокирует элонгацию, что в итоге приводит к постепенной разборке филамента RecA в 5'-3' направлении ДНК в результате гидролиза АТФ. Такое действие RecX должно приводить к кооперативной диссоциации RecA от ДНК.

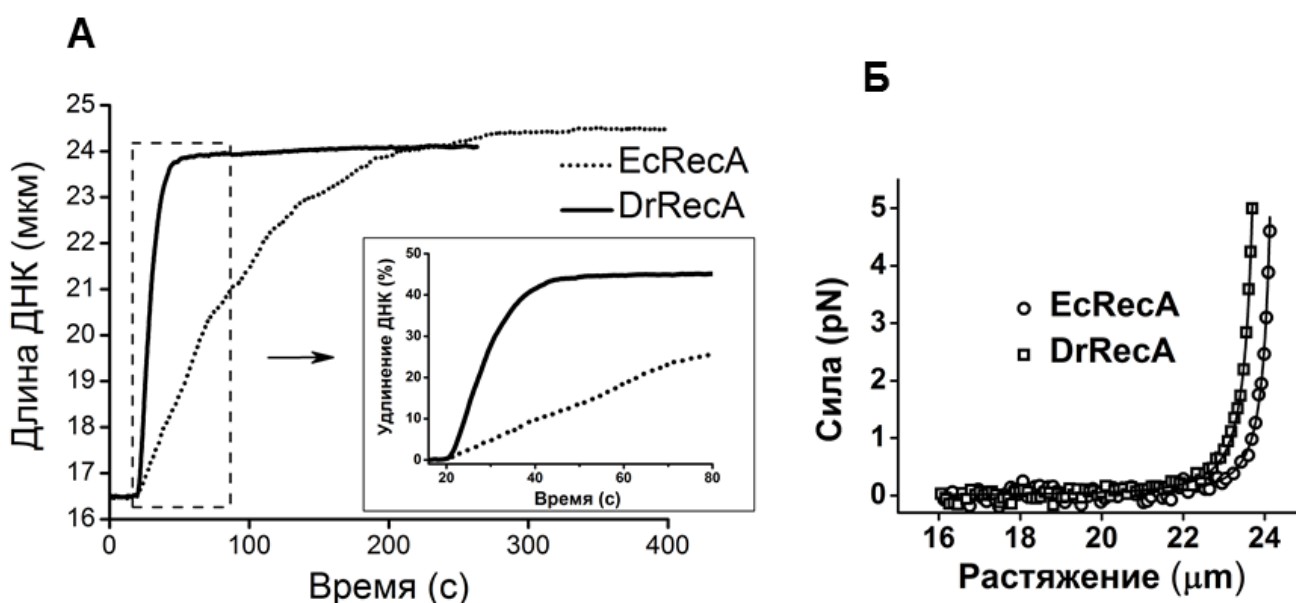
На временных зависимостях разборки филаментов RecA в присутствии RecX наблюдаются резкие изменения скорости укорочения ДНК, что свидетельствует об изменении количества разбираемых непрерывных филаментов RecA. Наличие линейных участков, соответствующих постоянной скорости разборки филаментов, свидетельствует о кооперативности данного процесса. Наблюдение кооперативной диссоциации RecA от ДНК в присутствии RecX подтверждает модель «кэппинг»-механизма действия данного белка.



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

Было проведено сравнительное исследование взаимодействия ДНК с RecA (*D.radiodurans*) и RecA (*E.coli*), в ходе которого наблюдали формирование филаментов RecA из *E.coli* (далее EcRecA) и *D.radiodurans* (далее DrRecA) при идентичных условиях: нейтральном pH, силе натяжения ДНК 40 pN, концентрации RecA 1 мкМ и в присутствии негидролизуемого аналога АТФ, АТФ $\gamma$ S, который использовали с целью предотвращения диссоциации RecA от ДНК. Во всех каналах в качестве буферного раствора использовали 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, глицерин 10%. Эксперименты проводили при температуре 37°C.

Результаты экспериментов выявили значительные отличия в процессах взаимодействия ДНК с DrRecA и EcRecA (рис.6, А). 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 насыщение процесса связывания DrRecA с ДНК требовался значительно меньший промежуток времени по сравнению с EcRecA. В случае DrRecA увеличение длины ДНК на 25% происходило в пять раз быстрее, а увеличение длины ДНК достигало максимального значения в 1,5 раза быстрее, нежели в случае EcRecA.



**Рис. 6. А.** Динамика увеличения длины ДНК при формировании филаментов RecA (*E.coli*) и RecA (*D.radiodurans*) в идентичных условиях. **Б.** Зависимости силы растяжения ДНК-белковых комплексов от длины, полученные по окончании формирования филаментов RecA (*E.coli*) и RecA (*D.radiodurans*).

Кроме того, величина окончательного удлинения ДНК в случае DrRecA оказалась воспроизводимо меньшей по сравнению с EcRecA - соответственно  $45,8 \pm 0,3\%$  (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность) для DrRecA и  $48 \pm 1\%$  (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность) для EcRecA (проведение t-теста выявило значение  $p$  меньше 0,001). Для характеристики механических свойств филаментов DrRecA и их сравнения с EcRecA после окончания полимеризации RecA были получены зависимости силы растяжения ДНК-белковых комплексов от длины (рис.6, Б).

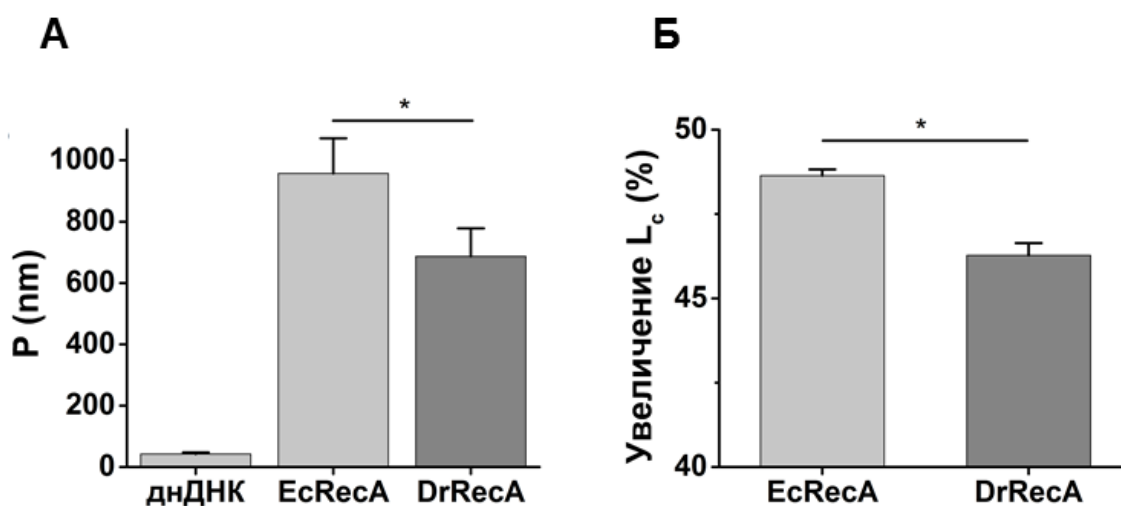
Полученные зависимости аппроксимировали при помощи модели описания полимерных цепей Worm-like chain (WLC), в рамках которой основными параметрами полимера являются контурная длина и персистентная длина (мера гибкости полимера). Для получения данных о механических параметрах ДНК и ДНК-белковых комплексов использовали модель WLC, скорректированную для проведения экспериментов по растяжению одиночных молекул ДНК:

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

где  $F$  – сила растяжения ДНК,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура,  $L_p$  – персистентная длина ДНК,  $z$  – измеренная длина ДНК,  $L_0$  – контурная длина ДНК,  $\alpha_2 = 0,5164228$ ,  $\alpha_3 = 2,737418$ ,  $\alpha_4 = 16,07497$ ,  $\alpha_5 = 38,87607$ ,  $\alpha_6 = 39,49944$ ,  $\alpha_7 = 14,17718$ .

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 силы растяжения ДНК от длины были получены следующие значения:  $L_c$  (контурная длина) =  $16,51 \pm 0,08$  мкм и  $P$  (персистентная длина) =  $43 \pm 3$  нм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность). Полученные данные находятся в согласии с ожидаемым значением контурной длины ДНК бактериофага  $\lambda$  ( $48502$  пар оснований  $\times 0,34$  нм =  $16,49$  мкм), а также с опубликованными данными о персистентной длине двунитевой ДНК при температуре  $37^\circ\text{C}$ . В случае ДНК-белковых комплексов EcRecA полученные значения персистентной длины,  $P = 960 \pm 80$  нм, и контурной длины,  $L_c = 24,54 \pm 0,02$  мкм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность), также находятся в согласии с ранее опубликованными данными для филаментов днДНК-EcRecA. В связи с этим, был сделан вывод о том, что данный способ определения персистентной и контурной длин является достоверным.

Анализ данных, полученных для ДНК-белковых комплексов DrRecA-ДНК, выявил существенно меньшее значение персистентной длины,  $P = 690 \pm 60$  нм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность), 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  $L_c = 24,15 \pm 0,04$  мкм (среднее значение  $\pm$  абсолютная погрешность), 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.7). 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.



**Рис. 7. Результаты анализа зависимостей силы растяжения ДНК и ДНК-белковых комплексов от длины. А.** Значения персистентной длины днДНК и ДНК-белковых комплексов RecA (*E.coli* и *D.radiodurans*). **Б.** Значения увеличения контурной длины днДНК при взаимодействии с RecA (*E.coli* и *D.radiodurans*). (\* результат t-теста:  $p < 0,001$ ).

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 более частые филаменты меньшей длины,

что потенциально обеспечивает более эффективное использование белка RecA при репарации ДНК.

## ВЫВОДЫ

1. Созданная установка и разработанные протоколы обеспечивают проведение исследований взаимодействия ДНК с ДНК-связывающими агентами на одномолекулярном уровне, что подтверждено тестовыми экспериментами с использованием красителя YOYO-1.
2. В ходе исследования динамики изменения механических свойств индивидуальных молекул ДНК при взаимодействии с ДНК-связывающими агентами установлено:
  - взаимодействие GelRed с ДНК приводит к увеличению длины ДНК, что свидетельствует об интеркалирующих свойствах этого красителя;
  - в присутствии белка RecX (*E.coli*) происходит кооперативная разборка ДНК-белковых филаментов RecA (*E.coli*);
  - RecA (*D.radiodurans*) формирует ДНК-белковые филаменты значительно быстрее, чем RecA (*E.coli*), при этом ДНК-белковые филаменты RecA (*D.radiodurans*) характеризуются меньшими значениями персистентной и контурной длин, что соответствует модели, в рамках которой RecA (*D.radiodurans*) обладает большим соотношением скоростей нуклеации и элонгации по сравнению с RecA (*E.coli*).
3. При помощи флуоресцентной микроскопии в комбинации с методом оптического захвата показано, что белок TP49a образует ДНК-белковые комплексы неспецифично относительно последовательности ДНК.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Pobegalov G.**, Cherevatenko G., Alekseev A., Sabantsev A., Kovaleva O., Vedyaykin A., Morozova N., Baitin D., Khodorkovskii M.. Deinococcus radiodurans RecA nucleoprotein filaments characterized at the single-molecule level with optical tweezers // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015. Vol. 466, No. 3. P. 426-430.
2. **Побегалов Г.Е.**, Арсениев А.Н., Ведяйкин А.Д., Соколова М.Л., Федорова Я.В., Сабанцев А.В. Изменение механических свойств молекулы ДНК при взаимодействии с интеркалирирующим красителем YOYO-1 // Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2013. № 1. С. 136-143.
3. **Pobegalov G.**, Sabantsev A., Arsenyev A., Fedorova Y., Sokolova M., Melnikov A., Petukhov M., Käs E., Grigoriev M., Khodorkovskiy M. Pontin and Reptin: DNA-protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers // 1st International Workshop on Pontin and Reptin. Workshop booklet. Bordeaux, France: 2012. P.42.

4. Арсениев А.Н., **Побегалов Г.Е.**, Сабанцев А.В., Федорова Я.В., Соколова М.Л., Мельников А.С., Ходорковский М.А. Применение оптических ловушек для одномолекулярных исследований взаимодействий ДНК с белками и различными агентами // Международная конференция молодых ученых Экспериментальная и теоретическая биофизика '12. Сборник трудов. Пущино, Россия: 2012. С. 195.
5. Arseniev A., **Pobegalov G.**, Sabantsev A., Fedorova Y., Sokolova M., Melnikov A., Petukhov M., Käs E., Grigoriev M., Khodorkovskiy M. DNA-protein interactions at the single-molecule level using optical tweezers // 5th International Symposium on Optical Tweezers in Life Sciences. Abstract booklet. Berlin, Germany: 2013. P. 34.
6. Арсениев А.Н., **Побегалов Г.Е.**, Сабанцев А.В., Федорова Я.В., Соколова М.Л., Мельников А.С., Ходорковский М.А. Применение лазерного пинцета для перерастяжения молекулы ДНК в одномолекулярных исследованиях // 23-я международная конференция «Лазеры. Измерения. Информация». Сборник трудов. Санкт-Петербург, Россия: 2013. С.128-129.
7. **Pobegalov G.**, Arseniev A., Sabantsev A., Fedorova Y., Sokolova M., Melnikov A., Petukhov M., Käs E., Grigoriev M., Khodorkovskiy M. Single-molecule studies of dsDNA properties using optical tweezers // FEBS Journal. Vol. 280. Saint-Petersburg, Russia: 2013. P. 61.
8. **Pobegalov G.**, Sabantsev A., Arseniev A., Fedorova Y., Sokolova M., Melnikov A., Petukhov M., Käs E., Khodorkovskiy M., Grigoriev M. TIP49a/dsDNA transactions at the single-molecule level visualized in real time using optical tweezers // EMBO Conference - Helicases and nucleic acid translocases. Book of Abstract. Cambridge, UK: 2013. P. 36.
9. Alekseev A., Arseniev A., Sabantsev A., **Pobegalov G.**, Melnikov A., Khodorkovskiy M. Dynamics of GelRed intercalation into double-stranded DNA at the singlemolecule level // 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures. Book of Abstract. Saint-Petersburg, Russia: 2014. P. 138-139.
10. **Pobegalov G.**, Arseniev A., Fedorova Y., Sokolova M., Petukhov M., Käs E., Khodorkovskiy M., Grigoriev M. Single-molecule studies of DNA-binding ATPase Pontin using optical tweezers // 1st International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures. Book of Abstract. Saint-Petersburg, Russia: 2014. P. 157-158.
11. **Pobegalov G.**, Alekseev A., Sabantsev A., Petukhov M., Khodorkovskiy M., Grigoriev M. DNA binding by Pontin visualized at the single-molecule level using the Dendra2-Pontin fusion protein // 2nd International Workshop on Pontin/RUVBL1 & Reptin/RUVBL2. Workshop booklet. Oeiras, Portugal: 2014. P. 18.
12. **Pobegalov G.**, Alekseev A., Sabantsev A., Melnikov A., Khodorkovskiy M., Baitin D. Real-time RecA filament disassembly in the presence of RecX monitored using single-molecule manipulation by optical tweezers // Biophysical Journal. Vol. 108. Baltimore, USA: 2015. P. 69a.