

Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций

На правах рукописи

Алексеев Александр Андреевич

Исследование процессов регуляции взаимодействия ResA с ДНК

Направление подготовки **03.06.01 Физика и астрономия**

Код и наименование

Направленность **03.06.01_12 «Биофизика»**

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Алексеев А.А.

Научный руководитель: к.ф.-м.н. Ходорковский М.А.

Санкт Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в НИК «Нанобиотехнологии» Института физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор НИК Нанобиотехнологии
СПбПУ:

Ходорковский М.А., к.ф.-м.н.

Научный руководитель:

Ходорковский М.А., к.ф.-м.н.

Рецензент:

*Петухов. М.Г., д.ф.-м.н.,
НИИЦ «Курчатовский институт»
ФГБУ ПИЯФ им. Б.П.
Константинова, Ведущий научный
сотрудник*

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

Содержание

Аннотация	4
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	4
Актуальность работы	4
Цель и задачи исследования	5
Научная новизна	5
Теоретическая и практическая значимость	6
Апробация работы	6
Публикации	6
Представление научного доклада: основные положения	6
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	7
Список литературы	23
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)	26

Аннотация

В данной работе исследуется влияние нуклеотидных кофакторов на свойства нуклеопротеиновых комплексов, формируемых белком RecA на однонитевой ДНК (онДНК). При помощи метода оптической ловушки анализируются конформационные состояния индивидуальных нуклеопротеиновых филаментов RecA, возникающие в ходе гидролиза АТФ. Впервые показано, что существует два неактивных состояния филамента RecA-онДНК обладающих различными механическими свойствами и стабильностью.

Также в работе анализируется динамика конформационных переходов при гидролизе и связывании АТФ, проводится количественная характеристика кооперативности конформационных изменений структуры филамента RecA при связывании нуклеотидных кофакторов.

Ключевые слова: RecA, гомологическая рекомбинация, метод оптической ловушки, лазерный пинцет, конформационные состояния, кооперативность.

In this thesis, the influence of nucleotide cofactors on RecA nucleoprotein complexes formed on single-stranded DNA is investigated. The ATPase induced conformational states of nucleoprotein RecA filament are analyzed by a single molecule approach. For the first time it was demonstrated that inactive form of RecA-ssDNA filament is presented by two states, which vary in mechanical properties and stability. In this work the dynamics of the ATPase induced conformational changes is addressed and cooperativity of conformational transitions induced by binding ATP and ADP is also examined.

Key words: RecA, homologous recombination, single-molecule approach, optical tweezers, conformational states, cooperativity.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Данная работа посвящена изучению влияния нуклеотидных кофакторов на взаимодействие RecA *E. coli* с ДНК. RecA – центральный фермент гомологической рекомбинации в бактериях [1]. Активной формой RecA является филамент на однонитевой ДНК (онДНК), который осуществляет обмен гомологичных нитей ДНК в ходе рекомбинационной репарации ДНК [2-4].

Десятилетия исследований и обширная структурная и функциональная характеристика рекомбиназ и бактериального RecA в частности обеспечили понимание важных аспектов гомологической рекомбинации и ее механизмов, однако роль структурных перестроек внутри рекомбиназных филаментов, индуцируемых гидролизом АТФ, до сих пор полностью не изучена. Считается, что гидролиз АТФ обеспечивает разборку филамента RecA [5, 6]. Однако стоит отметить, что диссоциация RecA от нуклеопротеинового филамента происходит с концов филамента. Гидролиз АТФ внутренними мономерами не приводит к их диссоциации от ДНК [7]. Учитывая тот факт, что в своей активной форме филамент RecA гидролизует значительное

количество АТФ, большинство актов гидролиза должно происходить во внутренней части филамента, а не на его концах. Поскольку связанный в межмономерном интерфейсе нуклеотидный кофактор определяет конформацию комплекса ResA-ДНК [8, 9], гидролиз АТФ может потенциально приводить к локальному появлению в активном филаменте ResA-ДНК участков неактивной формы.

В данной работе при помощи метода оптической ловушки исследуется влияние нуклеотидных кофакторов на механические свойства нуклеопротеиновых филаментов ResA *Escherichia coli*, сформированных на онДНК, и характеризуется динамика структурных переходов в комплексе ResA-онДНК, вызываемых гидролизом АТФ. Также проводится оценка консервативности конформационных переходов на примере ResA *Deinococcus radiodurans*.

Цель и задачи исследования

Цель работы — исследование влияния нуклеотидных кофакторов на взаимодействие ResA с онДНК

Задачи работы:

1. Разработка методики для регистрации конформационных состояний ДНК-белковых филаментов ResA на уровне одиночных молекул.
2. Регистрация конформационных состояний филамента ResA, реализуемых в присутствии АТФ, АДФ и в отсутствие нуклеотидных кофакторов.
3. Измерение кривых растяжения филамента ResA на однострессовой ДНК во всех трёх конформационных состояниях: АТФ, АДФ, Apo (отсутствие нуклеотидных кофакторов).
4. Измерение динамики переходов между тремя конформационными состояниями.
5. Измерение зависимости относительного удлинения филамента ResA на однострессовой ДНК от концентрации АТФ и АДФ.
6. Оценка консервативности конформационных переходов на примере нуклеопротеинового филамента ResA *D. radiodurans*.

Научная новизна

Впервые показано, что неактивная форма филамента ResA-онДНК представлена двумя различными состояниями: АДФ и Apo (отсутствие нуклеотидных кофакторов). На основе анализа кривых растяжений индивидуальных филаментов в этих состояниях, установлено, что они обладают разными механическими свойствами и стабильностью.

Впервые для протяженных (~3000 мономеров) филаментов ResA-онДНК исследована динамика переходов из активного в неактивные состояния и измерены константы скоростей этих переходов. Для обратных переходов из АДФ и Apo состояний в активное АТФ состояние и переходов между неактивными состояниями произведена нижняя оценка значений соответствующих констант скоростей.

Впервые на основании данных о зависимости длины индивидуальных филаментов ResA-онДНК в Аро состоянии от концентрации кофакторов выявлена кооперативность перехода между Аро и АДФ состояниями и Аро и АТФ состояниями и получены численные значения коэффициентов Хилла, характеризующих эти процессы.

Впервые было продемонстрировано, что филамент *D. radiodurans* ResA на онДНК испытывает обратимые конформационные переходы при перемещениях между АТФ-содержащей средой и средой без нуклеотидных кофакторов, что свидетельствует о высокой степени консервативности конформационных состояний нуклеопротеиновых филаментов, образуемых семейством рекомбиназ.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в данной работе результаты о влиянии нуклеотидных кофакторов на свойства филамента ResA-онДНК необходимы для понимания роли локальных конформационных изменений, происходящих в филаменте ResA-онДНК в ходе гидролиза АТФ. Разработанная методика регистрации конформационных состояний индивидуальных филаментов ResA может быть использована для дальнейшего исследования регуляции активности филамента ResA белковыми кофакторами в контексте их взаимодействия с тремя различными конформационными состояниями филамента ResA-онДНК.

Практическая значимость работы обусловлена тем, что ResA непосредственно участвует как в репарации ДНК бактерий, так и в процессах связанных с выработкой и распространением генов устойчивости к антибиотикам. В связи с этим, результаты данной работы могут представлять практическую ценность при разработке антибактериальных препаратов, использующих ResA в качестве мишени.

Апробация работы

Промежуточные результаты работы были представлены автором лично на 6 конференциях, в том числе с международным участием.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах и 8 тезисов докладов.

Представление научного доклада: основные положения

1. Разработана методика, позволяющая проводить исследование конформационных состояний ДНК-белковых филаментов ResA на уровне индивидуальных молекул ДНК.
2. На уровне одиночных молекул продемонстрировано, что неактивная форма филамента ResA-онДНК представлена двумя различными состояниями: АДФ и Аро.
3. При механическом растяжении АДФ формы филамента ResA-онДНК нарушение структуры филамента происходит при меньшей силе, чем при растяжении Аро формы филамента

RecA-онДНК. Повышение прикладываемой к филаменту силы значительно ускоряет диссоциацию ДНК-белкового комплекса в случае, если филамент находится в АДФ форме.

4. Взаимодействие как АТФ, так и АДФ с Аро формой филамента RecA-онДНК приводит к кооперативному переходу филамента в АТФ или АДФ форму. При этом взаимодействие филамента RecA-онДНК с АТФ и АДФ характеризуется схожим коэффициентом Хилла около 3.

5. Филамент RecA *D. radiodurans* на онДНК испытывает обратимые конформационные изменения при гидролизе и связывании АТФ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Бактериальный белок RecA представляет собой фермент, катализирующий обмен нитей в ходе гомологической рекомбинации в бактериях. RecA является одним из важнейших белков клеточного метаболизма, так как задействован сразу в нескольких ключевых для бактерий процессах, таких как рекомбинационная репарация ДНК [1], индукция SOS-ответа и горизонтальный перенос генов [10, 11].

RecA - чрезвычайно распространенный белок. Функциональные гомологи RecA известны почти во всех живых организмах, включая RadA у архей, Rad51 и DMC1 у эукариот [12, 13].

Для осуществления своих функций RecA в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} формирует правозакрученный спиральный филамент на однонитевой ДНК [4], который осуществляет поиск гомологичной последовательности и обмен нитей в случае достаточной гомологии [14].

На один оборот филамента приходится около шести мономеров RecA. При этом один мономер RecA связывает три нуклеотида ДНК, расположенной внутри филамента вдоль его оси. Место связывания иницирующей ДНК с филаментом упоминается как первичный сайт ДНК-связывания - сайт I. Сайт I образован остатками R169, R176, R196, K198 и K216 [15]. ДНК связанная в сайте I удлинена на 50% относительно длины В формы ДНК [16]. Считается, что помимо сайта I, с которым связана иницирующая онДНК, пресинаптический филамент RecA обладает вторым сайтом связывания ДНК - сайтом II, в состав которого входят остатки R226, R227, R243, K245 [16, 17]. В ходе проверки гомологии с сайтом II связывается днДНК. В результате обмена нитей с сайтом I оказывается связанной днДНК, а с сайтом II онДНК.

Известно, что филамент RecA на однонитевой ДНК может находиться в одном из двух состояний в зависимости от нуклеотидного кофактора в межмономерном интерфейсе [4, 8, 9, 18, 19]. Филамент RecA, сформированный в присутствии АТФ или негидролизующих аналогов, упоминается в литературе как активная форма филамента (активный филамент), в то время как филамент, сформированный в присутствии АДФ или в отсутствии нуклеотидных кофакторов, упоминается как неактивная форма филамента. В работах [19, 20] было показано, что две формы филамента RecA-онДНК могут напрямую переходить друг в друга без диссоциации RecA от ДНК. Два состояния филамента RecA отличаются механическими параметрами, в частности

межвитковым расстоянием. При помощи методов электронной микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов было определено, что межвитковое расстояние составляет от 70 до 76 Å для неактивной формы филамента RecA-онДНК [8, 9, 21-24], и от 89 до 95 Å для активной [9, 22, 23, 25]. Согласно разрешенной кристаллической структуре межвитковое расстояние активного филамента RecA составляет 93,96 Å, при этом на один оборот спирали филамента приходится 6,16 мономеров RecA [16].

Мономеры RecA в составе филамента на онДНК осуществляют непрерывный гидролиз АТФ. АТФазная активность необходима для обратного переноса нити ДНК в случае неполной гомологии [26], формирования протяженного целостного филамента без гэпов [18, 19], диссоциации RecA с гетеродуплексной ДНК в постсинаптической стадии [6, 7]. Филамент RecA-онДНК, сформированный в присутствии негидролизующих аналогов АТФ, способен частично осуществлять обмен нитей ДНК [27, 28]. Однако наличие АТФазной активности необходимо для прохождения гетерологичных участков [29], а также приводит к однонаправленности и относительно медленной скорости реакции обмена нитей [30]. В случае пресинаптического филамента роль непрерывного гидролиза АТФ не является до конца ясной. В случае филамента RecA-онДНК гидролиз АТФ может приводить к диссоциации только концевых мономеров [7]. В случае мономера, находящегося внутри филамента, после гидролиза связанной АТФ происходит «перезарядка» новой молекулы АТФ без диссоциации мономера от ДНК [31].

В данной работе при помощи метода оптической ловушки исследуется влияние нуклеотидных кофакторов на свойства филамента RecA (*E. coli*) на онДНК и характеризуются конформационные изменения филамента, вызываемые гидролизом АТФ. Также проводится оценка консервативности конформационных состояний нуклеопротеиновых комплексов, образуемых рекомбиназами, на примере филамента RecA *D. radiodurans*.

Экстремофильная бактерия *Deinococcus radiodurans* обладает чрезвычайно высокой устойчивостью к действию ионизирующего излучения. Механизмы рекомбинационной репарации ДНК в *D. radiodurans* значительно отличаются от *E. coli*, в частности для RecA данной бактерии, всего лишь на 51% идентичного по последовательности RecA *E. coli*, была установлена возможность проведения реакции обратного переноса нитей [32, 33]. В связи с этим белок RecA *D. radiodurans* (RecADr) представляет интерес с точки зрения оценки консервативности конформационных состояний нуклеопротеиновых комплексов семейства RecA.

На первом этапе выполнения ВКР была разработана методика, позволяющая проводить исследование различных конформационных состояний ДНК-белковых филаментов RecA на уровне одиночных молекул. Для реализации данной методики были разработаны протоколы проведения экспериментов на базе установки УНУ «Лазерный пинцет», позволяющей манипулировать микроскопическими диэлектрическими объектами при помощи метода оптического захвата. Центральным объектом исследования данной методики является филамент RecA, сформированный на молекуле однострессовой ДНК.

Описание экспериментальной установки.

Экспериментальная установка включает в себя УНУ «Лазерный пинцет» и микрофлюидную систему u-Flux (LUMICKS B.V.). Установка «Лазерный пинцет» позволяет создавать две независимые оптические ловушки за счет фокусировки двух лазерных пучков ортогональной поляризации (Лазер Nd:YVO4 1064 нм, 5 Вт, Spectra Physics BL-106C) при помощи объектива высокой численной апертуры (LOMO 100X, NA=1,25). Положение одной из ловушек контролировали с нанометровой точностью при помощи зеркала, установленного на пьезоплатформе (S-330.80L, Physik Instrumente).

Манипуляцию одиночной молекулой ДНК проводили при помощи двух полистироловых микросфер (2,1 мкм, Spherotech), закрепленных на концах ДНК (Рисунок 1). Для этого осуществляли оптический захват микросфер и контролировали их положение за счет анализа изображений, получаемых при помощи EMCCD камеры (Andor Technology, iXon Ultra 897). Управление положением микросфер и анализ изображений кросс-корреляционным методом [34] проводили в режиме реального времени с частотой 30 Гц при помощи специально разработанного программного обеспечения в среде LabView.

Калибровку жесткости оптической ловушки проводили методом силы вязкого трения (drag-force calibration [35]).

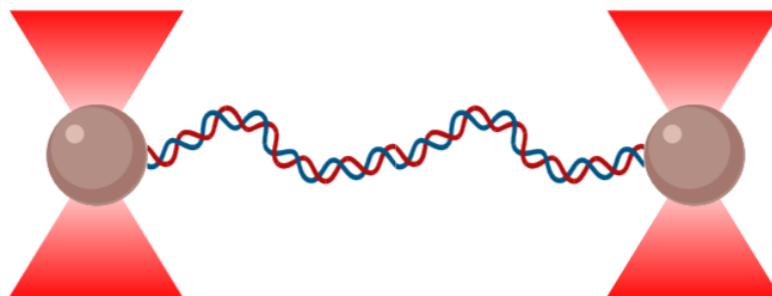


Рисунок 1. Манипуляция одиночной молекулой ДНК при помощи двух оптических ловушек.

Протокол приготовления ДНК-субстрата.

Однонитевые молекулы ДНК получали методом силового плавления из линейного двунитевого ДНК субстрата, длиной около 11 тыс. пар оснований. Процедура подготовки используемой ДНК-конструкции заключалась в рестрикции плазмидного вектора p1574 со вставкой гена *groC* (общая длина 11344 п.о.) по сайтам *XbaI* и *SacI* и последующем лигировании к продукту двойной рестрикции биотинилированных олигонуклеотидов 5'-XXXXXCAGTCCAGCT-3' и 5'-CTAGCGAGTGXXXXX-3' (X – биотиновая метка, прикрепляемая к сахарофосфатному остову олигомера, «Алкор Био»). Все олигонуклеотиды добавлялись в пятидесятикратном

молярном избытке по отношению к рестрицированному вектору. Лигирование проводилось при 22 °С в течение двух часов, после чего реакцию термически инактивировали при 65 °С в течение 20 минут. Итоговую ДНК-конструкцию очищали от избытка олигонуклеотидов при помощи хроматографической спин-колонки Micro Bio-Spin 30 (Bio-Rad).

Описание экспериментальных процедур.

Манипуляции с ДНК проводились внутри промываемой камеры микрофлюидной системы (u-Flux, LUMICKS B.V.). Данная система позволяет формировать внутри камеры до пяти каналов, представляющих собой ламинарные потоки с различным содержанием, не имеющих при этом физических границ между друг другом. Совмещение метода оптического захвата с пятиканальной микрофлюидной системой позволяет переносить захваченные объекты между каналами камеры, тем самым меняя состав раствора вокруг исследуемого субстрата.

В ходе эксперимента одонитевой ДНК-субстрат получали методом силового плавления из двунитевых молекул ДНК, содержащих модификацию биотином на 5'- и 3'- концах одной и той же нити [36]. Метод силового плавления заключается в растяжении двунитевой молекулы ДНК с силой более 80 пН, в результате чего происходит разрыв водородных связей между комплементарными нитями. Ввиду модификации биотином 5'- и 3'- концов одной и той же нити двунитевой молекулы, плавление ДНК приводит к тому, что между микросферами в итоге остаётся только одна нить ДНК, комплементарная ей нить уносится за счёт диффузии и потока (Рисунок 2).

Для исследования конформационных состояний филамента RecA в каналы микрофлюидной камеры подавались следующие растворы: в 1-ый канал - 0.01%-ый раствор полистироловых, покрытых стрептавидином микросфер диаметром 2.1 мкм, во 2-ой – 30 пМ раствор двунитевой ДНК (~11000 п.о.), в 3-ий – буфер, в 4-ый – раствор с нуклеотидным кофактором (АТФ или АДФ, 1 мМ), в 5-ый – 1 мкМ RecA, 1 мМ АТФ, 10 ед/мл пируват киназы, 0.1 мМ фосфоенолпирувата. Компоненты АТФ-регенерирующей системы, пируват киназа и фосфоенолпируват, добавлялись для поддержания постоянного и максимального уровня АТФ в канале с белком в течение всего времени проведения эксперимента. В качестве буферного раствора во всех каналах использовался 25 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Первые три канала микрофлюидной камеры (Рисунок 3) использовались для захвата микросфер, прикрепления к ним одиночной молекулы ДНК и перевода ДНК в одонитевую форму методом силового плавления. Далее одонитевую ДНК перемещали в канал, содержащий 1 мкМ RecA и 1 мМ АТФ, и осуществляли сборку активного филамента RecA на ДНК. Приложение к ДНК постоянной силы натяжения 12 пН устраняло вторичные структуры формируемые онДНК и тем самым способствовало связыванию RecA с ДНК. Полимеризация RecA на ДНК в условиях постоянной силы натяжения приводила к увеличению регистрируемой длины ДНК. По достижении максимальной длины около 5,5 мкм, формирование филамента RecA на ДНК считалось завершённым. Для последующих манипуляций прикладываемую к филаменту силу

натяжения снижали до 2 пН. Проведение наблюдений при данной силе удобно тем, что длина не связанной с белком онДНК пренебрежимо меньше длины филамента при этой силе [19, 37].

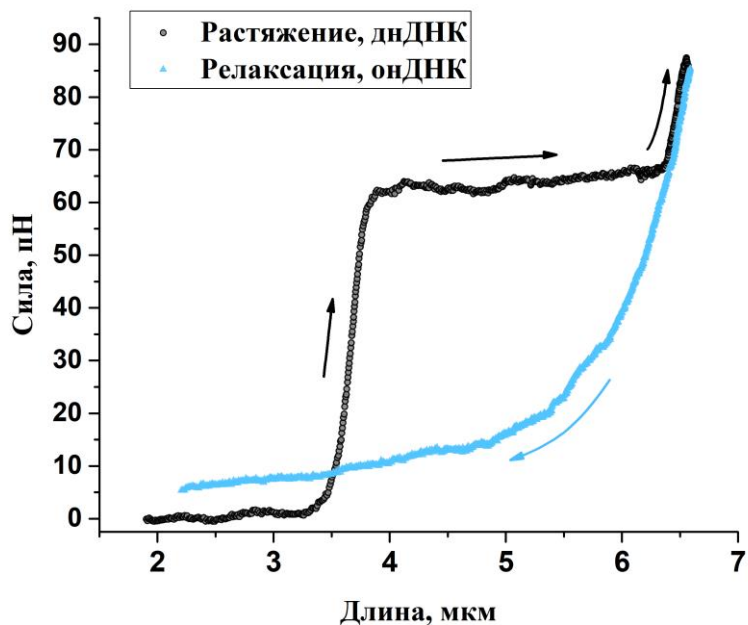


Рисунок 2. Формирование одноститовой ДНК из двунитевой формы методом силового плавления.

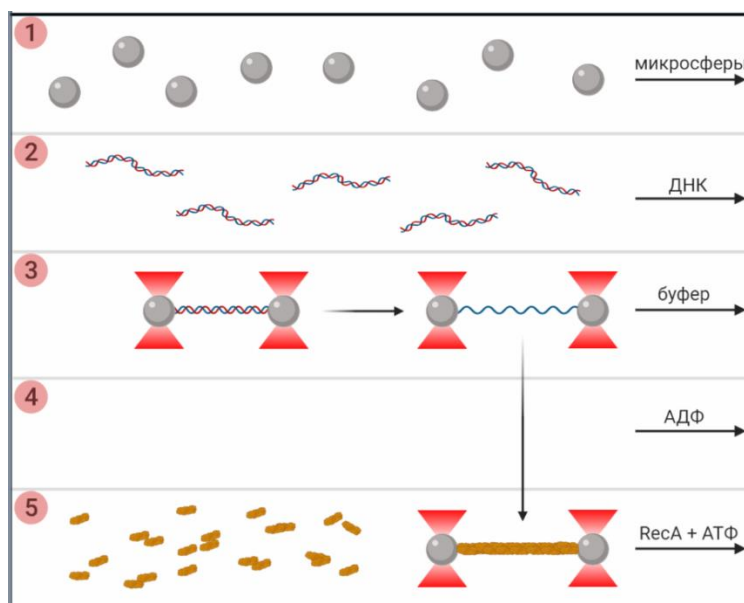


Рисунок 3. Последовательность манипуляций с ДНК внутри микрофлюидной камеры.

Для получения неактивной формы филамента ResA, активный филамент ResA, собранный в присутствии ResA и АТФ, перемещали в канал, содержащий только буфер или буфер с 1 мМ АДФ. При переносе к филаменту прикладывали постоянную силу натяжения 2 пН и регистрировали его длину. Характерное время переноса между каналами составляло 5 секунд. Регистрация динамики изменения длины филамента ResA в ходе инкубации в канале с АДФ или буфере без нуклеотидных кофакторов при постоянной силе натяжения 2 пН использовалась для оценки скорости разборки филамента в АДФ и Apo состояниях.

Для исследования механических свойств филамента ResA в АТФ, АДФ и Apo состояниях измеряли зависимость длины филамента от приложенной силы. Для этого соответствующую конформацию филамента получали описанным выше способом, после чего увеличивали расстояние между удерживаемыми микросферами со скоростью 0,3 мкм/с и одновременно измеряли силу, прикладываемую к филаменту. Полученные зависимости состояли из двух фаз: фазы растяжения, при которой расстояние между микросферами увеличивали и последующей фазы релаксации, в ходе которой микросферы сводили друг к другу. Сравнение значений длины при силе 2 пН в фазе растяжения и релаксации использовалось для оценки влияния силы на стабильность филамента.

Для измерения скорости конформационных перестроек филамента ResA было минимизировано время переноса филамента между каналами камеры. Для этого оптические ловушки использовались в режиме повышенной жесткости, что позволяло максимально быстро переместить удерживаемые микросферы из одного канала в другой. При переносе микросферы находились в сведенном положении. Сразу по завершении переноса микросфер, одну из ловушек выключали, в результате чего филамент вытягивался за счет действующей на освободившуюся микросферу силы вязкого трения со стороны потока (Рисунок 4). Скорость движения потока в камере регулировалась таким образом, чтобы на микросферу диаметром 2,1 мкм действовала сила около 2 пН. Применение данной методики обеспечивало снижение времени переноса филамента между каналами до величины порядка 100 мс, что позволяло регистрировать динамику изменения длины филамента ResA в ходе конформационных перестроек.

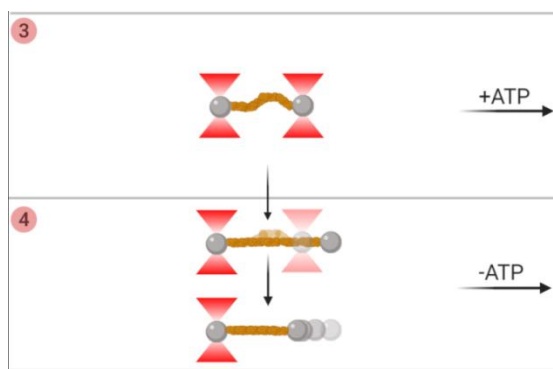


Рисунок 4. Последовательность действий при исследовании динамики компрессии филаментов ResA в процессе перехода из активного состояния в неактивное.

Результаты и их обсуждение

Влияние нуклеотидных кофакторов на длину филамента ResA

Исследование влияния нуклеотидных кофакторов на длину филаментов проводилось с использованием методики описанной в предыдущем разделе. Для этого сначала был сформирован активный филамент ResA, построение которого осуществляли в канале микрофлюидной камеры, содержащем 1 мкМ ResA и 1 мМ АТФ при поддержании постоянной силы натяжения ДНК в 12 пН. Связывание ResA отражалось в увеличении длины ДНК и регистрировалось в режиме реального времени (Рисунок 5).

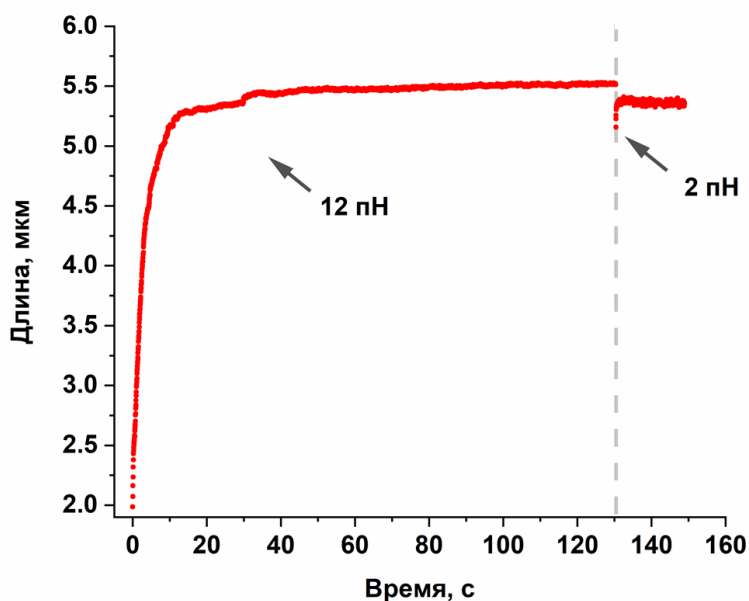


Рисунок 5. Динамика изменения длины ДНК в ходе формирования активного филамента ResA на онДНК при постоянной приложенной силе натяжения 12 пН. После завершения формирования филамента натяжение снижали до 2 пН.

После формирования филамента, прикладываемое к исследуемой молекуле натяжение снижали до 2 пН. Длина филамента при данной силе натяжения существенно превосходит длину однонитевой ДНК, что облегчает интерпретацию результатов.

Переход филамента ResA из АТФ- в АДФ-состояние

Предварительно сформированный активный филамент ResA перемещали в канал, содержащий буферный раствор с 1 мМ АДФ (АДФ-канал). При этом наблюдалось существенное сокращение длины филамента (Рисунок 6). Последующее перемещение филамента обратно в среду, содержащую 1 мМ АТФ (АТФ-канал), приводило к увеличению его длины до значения, близкого к исходной длине активного филамента. При повторном перемещении филамента из

АТФ- в АДФ-канал наблюдалась аналогичная динамика изменения длины филамента. Так как при проведении данного эксперимента в АТФ- и АДФ- каналах отсутствовал свободный ResA, наблюдаемые динамические изменения длины филамента отражают конформационный переход из активного АТФ-состояния в неактивное АДФ-состояние в результате гидролиза АТФ. Последующее связывание АТФ стимулирует обратный переход филамента в активную форму, демонстрируя возможность обратимого перехода филамента между этими состояниями.

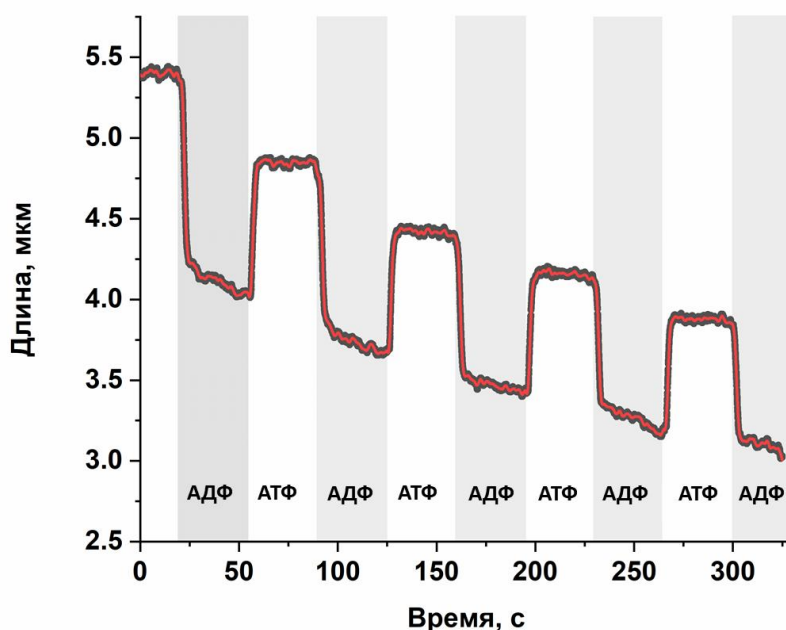


Рисунок 6. Динамика изменения длины филамента ResA-онДНК при перемещениях между каналом, содержащим АТФ (белые секции), и каналом с АДФ (серые секции).

Переход филамента ResA из АТФ- в Аро-состояние

Было проведено аналогичное исследование, в котором вместо АДФ-содержащего буфера использовали буферный раствор без нуклеотидных кофакторов. В этом случае филамент ResA также претерпевал компрессию в отсутствие АТФ и восстанавливал активную форму при возвращении его в АТФ-канал (Рисунок 7). Однако были установлены характерные различия в поведении филамента при переходе активной формы в АДФ- и Аро-состояния. Во первых, величина компрессии филамента при переходе АТФ-Аро составила на ~3% больше аналогичной величины, измеренной для перехода АТФ-АДФ. Во вторых, длина компрессированного филамента в АДФ-канале постепенно уменьшалась, свидетельствуя о диссоциации ResA, в то время как длина филамента в канале, не содержащем нуклеотиды, оставалась относительно стабильной. Данные различия указывают на существование двух различных форм неактивного филамента ResA, зависящих от наличия АДФ в среде.

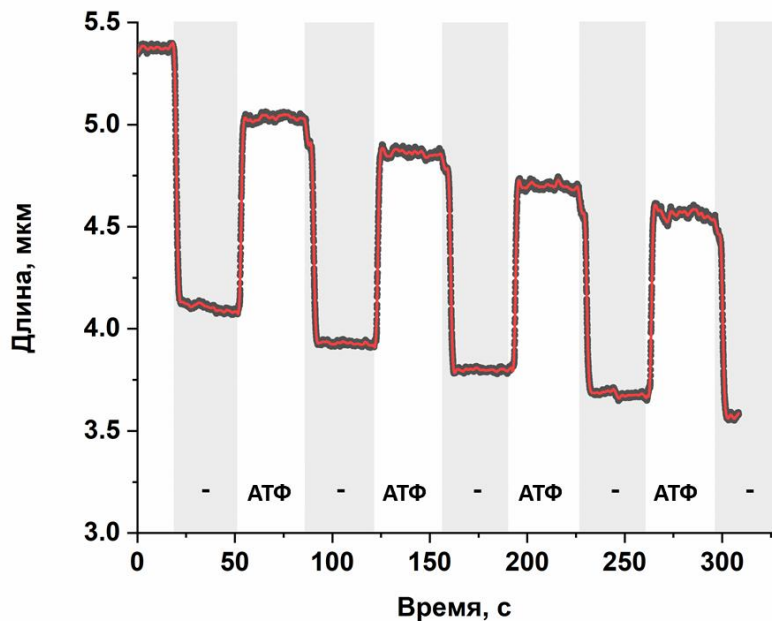


Рисунок 7. Динамика изменения длины филамента ResA-онДНК при перемещении между каналом, содержащим АТФ (белые секции), и каналом без нуклеотидов (серые секции).

Последовательные переходы филамента ResA между АТФ-, АДФ- и Аро-состояниями

Для получения дополнительных данных о свойствах неактивных форм филамента ResA, были проведены следующие эксперименты. Активный филамент из канала, содержащего АТФ и ResA, перемещали при постоянном натяжении в 2 пН в АДФ-канал, затем в канал, не содержащий нуклеотиды, и после кратковременной инкубации возвращали в АДФ-канал (Рисунок 8). Было установлено, что перемещение АДФ-формы филамента в среду без нуклеотидов приводит к уменьшению длины филамента на ~3%. При последующем возвращении филамента в АДФ-канал его длина восстанавливается. Процесс обратимого сокращения и удлинения филамента в Аро- и АДФ-каналах соответственно можно было наблюдать на одной и той же молекуле многократно. Это свидетельствует о том, что АДФ- и Аро-состояния филамента различны и взаимно обратимы.

Проведенные измерения позволили оценить среднюю скорость диссоциации ResA от ДНК для АДФ- и Аро-состояния филамента. Для этого участки динамики изменения длины филамента в соответствующем канале аппроксимировали линейной зависимостью $L=V*t+a$, где L - это длина исследуемой молекулы, t - время и V - скорость изменения длины. Средняя скорость диссоциации ResA составила $2,2 \pm 1,0$ нм/с для АДФ- и $0,2 \pm 0,2$ нм/с для Аро-состояния филамента.

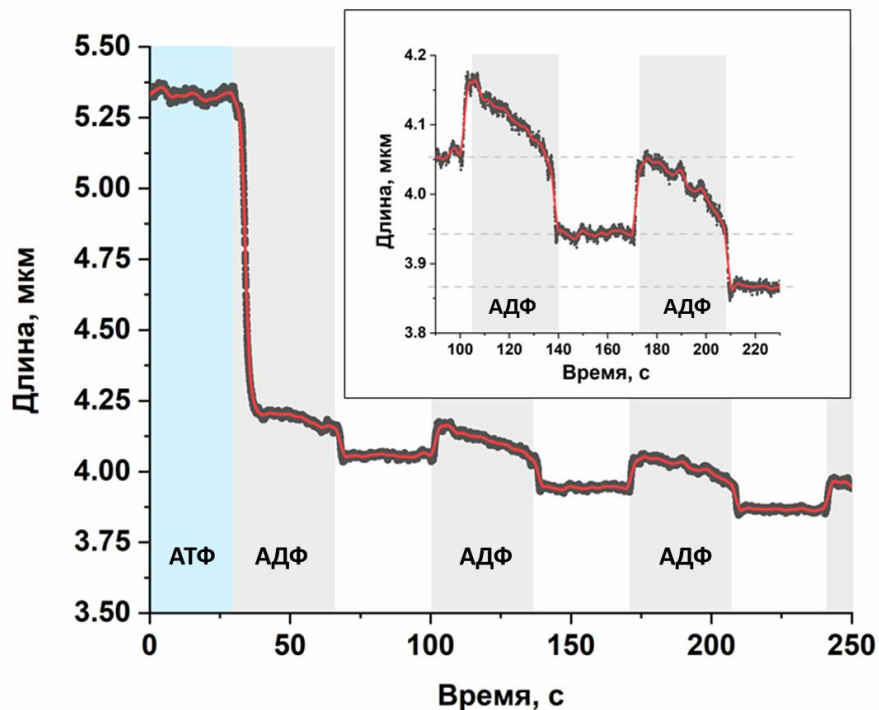


Рисунок 8. Динамика изменения длины филамента ResA-онДНК при перемещении между каналами, содержащими АТФ, АДФ (серые секции) и каналом без нуклеотидов (белые секции).

Исследование механических свойств филамента ResA в АТФ, АДФ и Аро состоянии

С целью более детальной характеристики различных форм филамента ResA были проведены измерения их механических свойств. Для этого исследуемые молекулы подвергались последовательному растяжению и релаксации за счет изменения расстояния между микросферами со скоростью 0,3 мкм/с. В ходе этих экспериментов одновременно регистрировались значения силы натяжения молекулы и её длины, определяемой как расстояние между микросферами. В результате были получены зависимости силы натяжения от длины филамента для активного АТФ-состояния (Рисунок 9) и неактивных АДФ- и Аро-форм (Рисунок 10).

Характер данной зависимости для неактивных форм значительно отличается от активной формы филамента. При натяжении в несколько пиконьютонов неактивные формы филамента, как и активная форма, обладают относительно жесткой структурой, что отражается в резком росте силы натяжения при достижении контурной длины филамента. При этом АДФ- и Аро-формы характеризуются существенно меньшей длиной по сравнению с АТФ-формой. Это согласуется с данными, полученными в ходе исследования изменений длины филамента при переходе между различными состояниями, полученными при силе натяжения 2 пН.

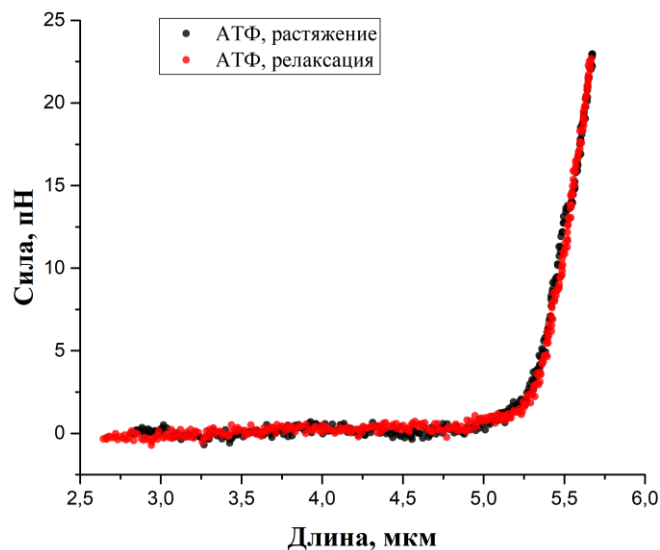


Рисунок 9. Зависимость длины от приложенной силы для филамента RecA-онДНК в АТФ-состоянии.

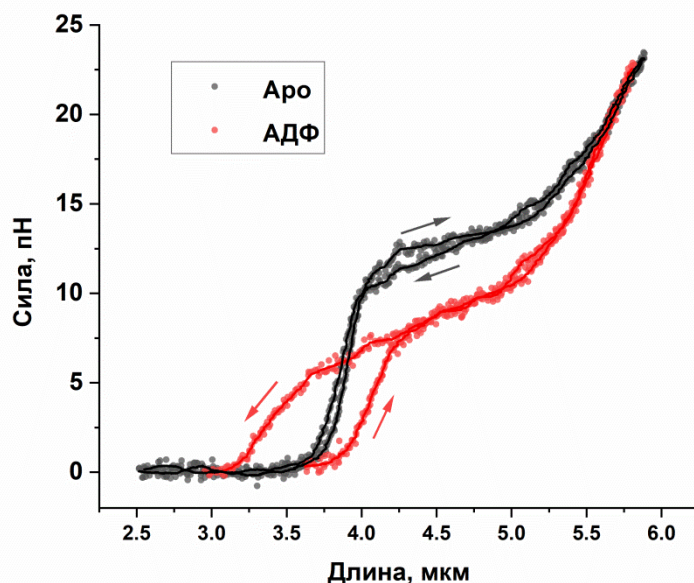


Рисунок 10. Зависимость длины от приложенной силы для филамента RecA-онДНК в АДФ- и Аро-состоянии.

Однако при достижении пороговой силы натяжения в случае обоих неактивных форм филамента RecA было зарегистрировано значительное увеличение длины филамента и уменьшение жесткости, качественно схожее с поведением онДНК (Рисунок 2). Это свидетельствует о нарушении структуры филамента, при силе натяжения, превышающем пороговое значение. Зависимости для Аро-формы филамента, полученные в ходе растяжения и

последующей релаксации, имеют практически идентичный характер. Это указывает на то, что процесс нарушения структуры филамента в данном случае обратим, и в ходе измерения значительная часть RecA остается связанной с онДНК. Пороговое значение силы, натяжение выше которой приводит к изменению структуры Аро-формы филамента, составило $11,6 \pm 0,6$ пН.

Анализ зависимостей, полученных в ходе растяжения АДФ-формы, показал качественно схожее поведение с Аро-формой филамента. Однако пороговое значение силы в этом случае оказалось меньше и составило $8,4 \pm 1,3$ пН. Также, существенное различие в механических свойствах АДФ- и Аро-форм филамента было выявлено при анализе кривых релаксации. Для АДФ-формы восстановление структуры филамента после растяжения происходит при существенно меньшем значении длины, что указывает на уменьшение покрытия ДНК белком. Это свидетельствует о том, что в отличие от филамента в Аро-форме, приложение силы, растягивающей филамент, стимулирует диссоциацию RecA в случае АДФ-формы.

Динамика конформационных переходов филамента RecA

Для количественной характеристики динамики конформационных переходов филамента RecA, возникающих в ходе гидролиза АТФ, была проведена оценка констант скорости соответствующих конформационных изменений. В ходе экспериментов филамент быстро перемещали между соответствующими каналами при нулевой силе натяжения, после чего регистрировали динамику изменения длины филамента при силе натяжения порядка 2 пН (Рисунок 11). Время задержки, определяемое как промежуток времени между внесением исследуемой молекулы в соответствующий канал и началом измерения ее длины, было оценено в ~ 100 мс.

Были измерены временные зависимости сокращения длины филамента RecA при переходе из активного АТФ-состояния в неактивные Аро- и АДФ-состояния (Рисунки 11, 12). Было установлено, что данные зависимости носят схожий экспоненциальный характер. Это позволило оценить константы скорости компрессии филамента при соответствующих конформационных переходах путем аппроксимации измеренных зависимостей функцией, описывающей экспоненциальное затухание: $L = \Delta L * \exp(-k * t) + L_0$, где L - регистрируемая длина, ΔL - разница длины между активным филаментом и неактивным, k - константа скорости компрессии, t - время, L_0 - длина неактивного филамента. Так как в случае перехода в АДФ-форму быстрая компрессия филамента сопровождалась последующим медленным сокращением длины, вызванным диссоциацией RecA, аппроксимацию проводили по первоначальным 3-секундным интервалам измеренных временных зависимостей. В результате были получены оценки констант скорости компрессии активного филамента RecA, которые составили $1,18 \pm 0,12$ с⁻¹ для перехода АТФ-АДФ и $1,30 \pm 0,10$ с⁻¹ для перехода АТФ-Аро.

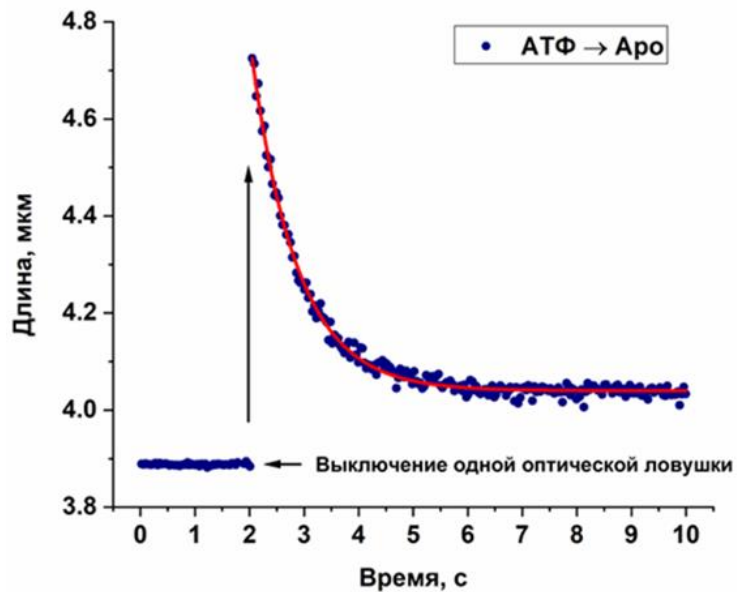


Рисунок 11. Пример динамики компрессии филамента.

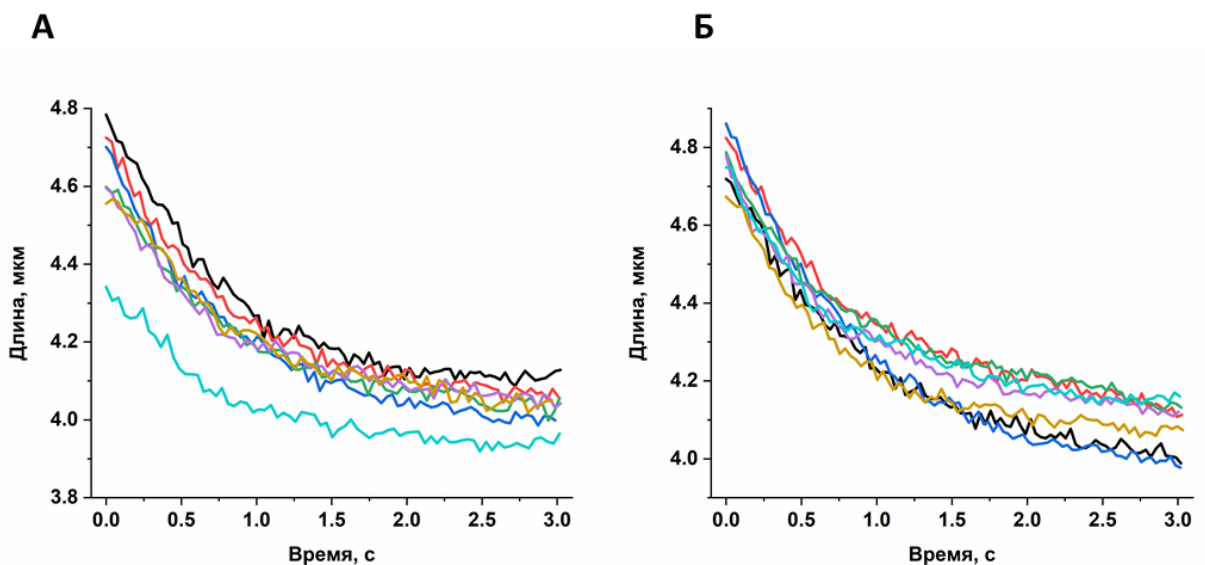


Рисунок 12. Динамика компрессии филамента ResA-онДНК при переходе из АТФ в Аро-состояние (А) и в АДФ-состояние (Б). На графиках представлены примеры первых 3 секунд соответствующих измерений для 7 молекул, экспоненциальная аппроксимация которых позволила провести оценку констант скоростей.

Были проведены аналогичные эксперименты с целью оценки констант скорости переходов АДФ-Аро и Аро-АТФ, в которых регистрировалась динамика изменения длины филамента при быстром перемещении между соответствующими каналами. Однако в обоих случаях было

установлено, что данные конформационные переходы происходят быстрее, чем время задержки, оценка которого составила ~ 100 мс. Несмотря на невозможность проведения точной оценки данных констант скорости, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что переход из АДФ- в Аро-состояние, как и переход из Аро- в активное АТФ-состояние, происходят существенно быстрее перехода АТФ-Аро и характеризуются константой скорости, нижнюю границу которой можно оценить в 10 с^{-1} .

Исследование кооперативности конформационных переходов филамента ResA

В ходе эксперимента предварительно сформированный активный филамент ResA помещали в канал без нуклеотидов, где происходил переход в неактивное Аро-состояние, и регистрировалась длина филамента. После этого исследуемый комплекс перемещали в канал содержащий буферный раствор с АТФ различной концентрации в диапазоне от 10 до 1000 мкМ и регистрировали длину филамента, установившуюся в результате наступления равновесия между процессами образования активной формы в части филамента, связывающей АТФ, и образования неактивных форм в результате гидролиза АТФ. Увеличение концентрации АТФ приводило к смещению равновесия в сторону образования активной формы и соответствующему увеличению длины исследуемой молекулы. Измерение длины филамента проводили при постоянной силе натяжения в 2 пН. В результате была получена зависимость относительного удлинения филамента ResA от концентрации АТФ. Данная зависимость имеет сигмоидный характер (Рисунок 13) и хорошо аппроксимируется уравнением Хилла с положительной кооперативностью, оцениваемой коэффициентом Хилла $n_{\text{АТФ}} = 2,9 \pm 0,3$. При этом константа полунасыщения – концентрация АТФ, при которой половина филамента находится в активной АТФ форме, составила 15 ± 1 мкМ АТФ.

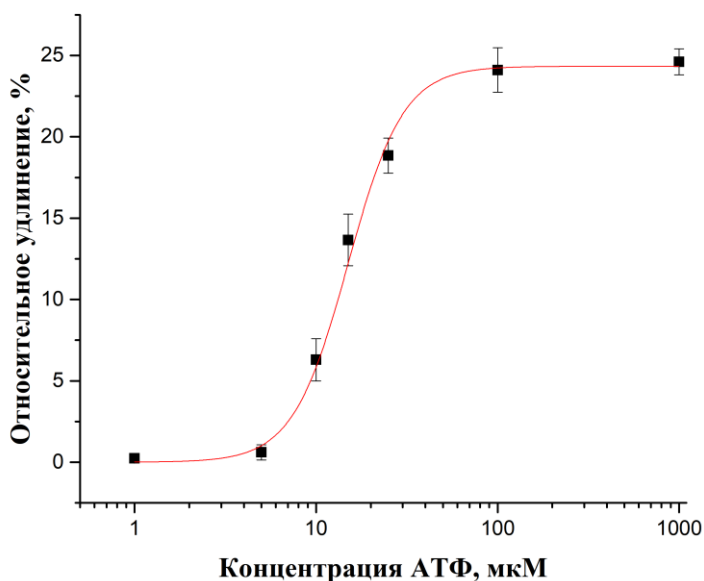


Рисунок 13. Относительное удлинение филамента при перемещении из канала без нуклеотидов в канал, содержащий различные концентрации АТФ.

Так как в ходе выполнения ВКР было установлено существование двух компрессированных состояний филамента RecA (Аро- и АДФ-), характеризующихся различной длиной, были проведены эксперименты по изучению кооперативности конформационных переходов, вызванных взаимодействием с АДФ. Для этого был применен аналогичный экспериментальный подход, в рамках которого регистрировали удлинение филамента при его перемещении из канала, не содержащего нуклеотиды, в канал с буферным раствором, содержащим различные концентрации АДФ. Так как в данном случае длина филамента обусловлена наступлением равновесия между процессами связывания и диссоциации АДФ, увеличение концентрации АДФ приводит к увеличению доли АДФ состояний в филаменте и соответствующему увеличению его длины. Таким образом, была получена зависимость относительного удлинения филамента RecA от концентрации АДФ (Рисунок 14), обладающая схожим сигмоидным характером, как и в случае взаимодействия Аро-формы филамента с АТФ. В результате аппроксимации полученной зависимости уравнением Хилла было установлено, что конформационный переход филамента, вызванный связыванием АДФ, характеризуется положительной кооперативностью с коэффициентом Хилла $n_{\text{АДФ}} = 3,2 \pm 0,2$ и концентрацией полунасыщения 30 ± 1 мкМ АДФ.

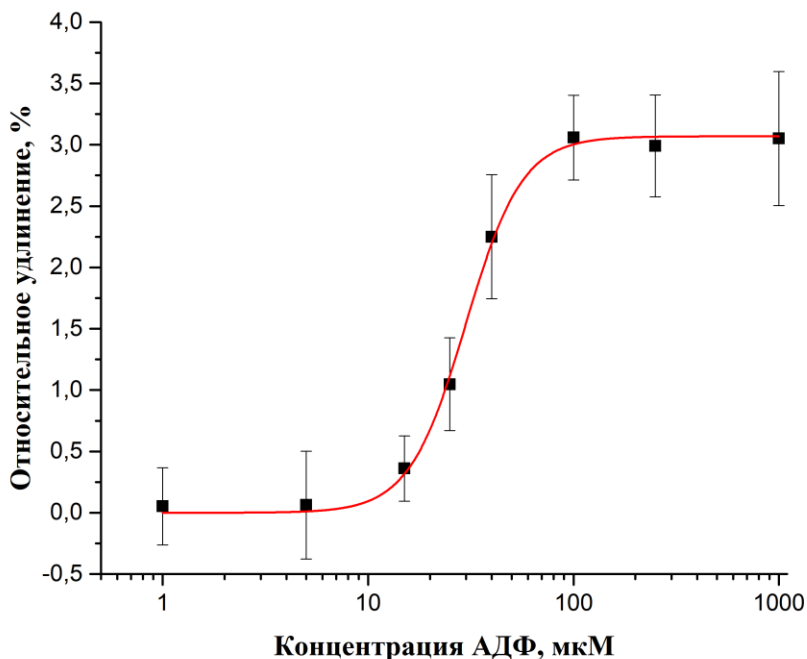


Рисунок 14. Относительное удлинение филамента при перемещении из канала без нуклеотидов в канал, содержащий различные концентрации АДФ.

Переход филамента ResADr из АТФ в Аро-состояние

В данной работе впервые показано, что филамент ResADr на односторонней ДНК способен переключаться между активным и неактивным (Аро) состояниями при смене нуклеотидного кофактора в растворе. Динамика длины филамента ResADr при перемещениях между каналами камеры с АТФ и с буфером без нуклеотидного кофактора (Рисунок 15) была аналогична ResA *E. coli*. При переходе в среду без АТФ происходило сокращение длины филамента ResADr. При возвращении филамента в канал с АТФ длина филамента восстанавливалась. Циклы сокращения и восстановления длины были воспроизводимы и наблюдались в отсутствие ResADr в растворе.

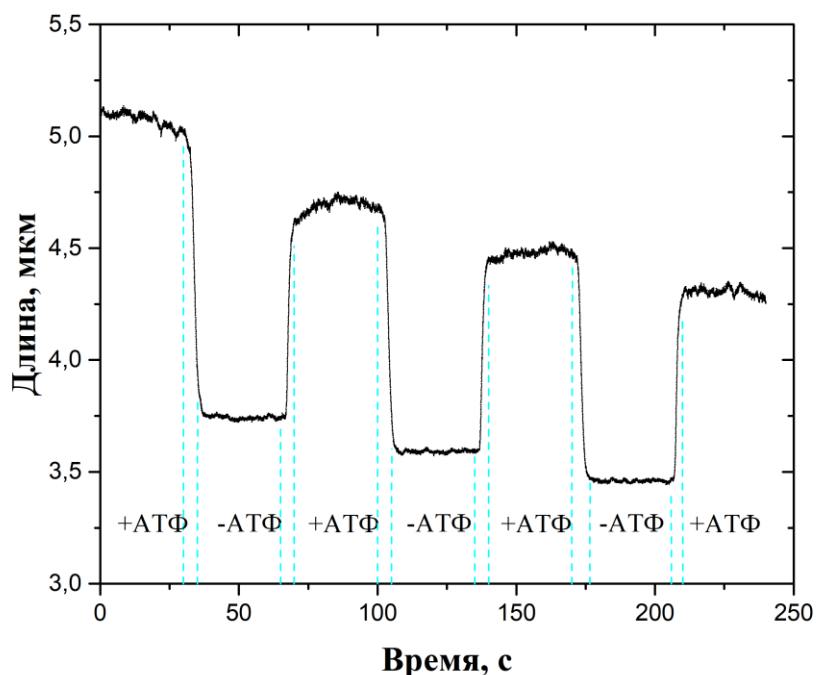


Рисунок 15. Динамика изменения длины филамента ResADr-онДНК в ходе последовательных перемещений между каналом с АТФ и каналом без нуклеотидных кофакторов при постоянной силе натяжения 2 пН.

Заключение

В рамках данной работы при помощи метода оптической ловушки было продемонстрировано существование двух различных неактивных форм нуклеопротеинового филамента ResA-онДНК, - АДФ и Аро состояний. Продемонстрировано отличие АДФ и Аро состояний в плане механических свойств и стабильности. Ввиду АТФазной активности филамента ResA-онДНК представляется логичным локальное присутствие АДФ и Аро состояний в пресинаптическом филаменте наряду с активным АТФ состоянием. В данном исследовании получены сведения о скорости переходов между тремя состояниями, что может в дальнейшем быть

использовано для моделирования активности филамента RecA с учётом локальных конформационных изменений, вызываемых гидролизом АТФ. Примечательно, что связывание как АДФ так и АТФ вызывает кооперативные изменения в структуре филамента. Механизмы этих изменений, по-видимому, схожи между собой.

Идея о биологической роли неактивной конформации не является абсолютно новой. Недавно было показано, что одновременное существование участков активной и неактивной конформации в филаменте RecA-онДНК потенциально важно в процессе обмена нитей [38].

В рамках настоящей работы также обнаружено переключение между неактивной и активной конформациями при гидролизе и связывании АТФ для филамента, формируемого на онДНК белком RecA *D. radiodurans*. Данный факт также даёт основание полагать, что локальные конформационные перестройки нуклеопротеиновых филаментов, формируемых рекомбиназами, выполняют важные, на данный момент не до конца понятые, функции внутри клетки. Дальнейшие исследования в этой области представляют интерес.

Список литературы

1. Kowalczykowski S. C., Eggleston A. K. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins // Annual review of biochemistry. – 1994. – Т. 63, № 1. – С. 991-1043.
2. Kaniecki K., De Tullio L., Greene E. C. A change of view: homologous recombination at single-molecule resolution // Nature Reviews Genetics. – 2018. – Т. 19, № 4. – С. 191.
3. Bell J. C., Kowalczykowski S. C. RecA: regulation and mechanism of a molecular search engine // Trends in biochemical sciences. – 2016. – Т. 41, № 6. – С. 491-507.
4. Hegner M., Smith S. B., Bustamante C. Polymerization and mechanical properties of single RecA–DNA filaments // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – Т. 96, № 18. – С. 10109-10114.
5. Brenner S., Mitchell R., Morrical S., Neuendorf S., Schutte B., Cox M. recA protein-promoted ATP hydrolysis occurs throughout recA nucleoprotein filaments // Journal of Biological Chemistry. – 1987. – Т. 262, № 9. – С. 4011-4016.
6. Menetski J. P., Kowalczykowski S. C. Interaction of recA protein with single-stranded DNA: quantitative aspects of binding affinity modulation by nucleotide cofactors // Journal of molecular biology. – 1985. – Т. 181, № 2. – С. 281-295.
7. Cox J. M., Tsodikov O. V., Cox M. M. Organized unidirectional waves of ATP hydrolysis within a RecA filament // PLoS biology. – 2005. – Т. 3, № 2. – С. e52.
8. Ruigrok R., Bohrmann B., Hewat E., Engel A., Kellenberger E., DiCapua E. The inactive form of recA protein: the ‘compact’ structure // The EMBO journal. – 1993. – Т. 12, № 1. – С. 9-16.

9. Yu X., Egelman E. Structural data suggest that the active and inactive forms of the RecA filament are not simply interconvertible // *Journal of molecular biology*. – 1992. – T. 227, № 1. – C. 334-346.
10. Babić A., Lindner A. B., Vulić M., Stewart E. J., Radman M. Direct visualization of horizontal gene transfer // *Science*. – 2008. – T. 319, № 5869. – C. 1533-1536.
11. Simmons L. A., Foti J. J., Cohen S. E., Walker G. C. The SOS Regulatory Network // *EcoSal Plus*. – 2008. – T. 2008.
12. Bianco P. R., Tracy R. B., Kowalczykowski S. C. DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison // *Front Biosci*. – 1998. – T. 3. – C. D570-603.
13. Ogawa T., Yu X., Shinohara A., Egelman E. H. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament // *Science*. – 1993. – T. 259, № 5103. – C. 1896-1899.
14. Bazemore L. R., Folta-Stogniew E., Takahashi M., Radding C. M. RecA tests homology at both pairing and strand exchange // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – T. 94, № 22. – C. 11863-11868.
15. Prentiss M., Prévost C., Danilowicz C. Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2015. – T. 50, № 6. – C. 453-476.
16. Chen Z., Yang H., Pavletich N. P. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures // *Nature*. – 2008. – T. 453, № 7194. – C. 489-494.
17. Kurumizaka H., Ikawa S., Sarai A., Shibata T. The mutant RecA proteins, RecAR243Q and RecAK245N, exhibit defective DNA binding in homologous pairing // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1999. – T. 365, № 1. – C. 83-91.
18. Kim S. H., Ahn T., Cui T. J., Chauhan S., Sung J., Joo C., Kim D. RecA filament maintains structural integrity using ATP-driven internal dynamics // *Science advances*. – 2017. – T. 3, № 9. – C. e1700676.
19. van Loenhout M. T., van der Heijden T., Kanaar R., Wyman C., Dekker C. Dynamics of RecA filaments on single-stranded DNA // *Nucleic acids research*. – 2009. – T. 37, № 12. – C. 4089-4099.
20. Nishinaka T., Doi Y., Hara R., Yashima E. Elastic behavior of RecA-DNA helical filaments // *Journal of molecular biology*. – 2007. – T. 370, № 5. – C. 837-845.
21. Chang C.-F., Rankert D. A., Jeng T.-W., Morgan D. G., Schmid M. F., Chiu W. Cryo electron microscopy of unstained, unfixed RecA-ssDNA complexes // *Journal of ultrastructure and molecular structure research*. – 1988. – T. 100, № 2. – C. 166-172.
22. Ellouze C., Takahashi M., Wittung P., Mortensen K., Schnarr M., Nordén B. Evidence for Elongation of the Helical Pitch of the RecA Filament Upon ATP and ADP Binding Using Small-Angle Neutron Scattering // *European journal of biochemistry*. – 1995. – T. 233, № 2. – C. 579-583.
23. Lebedev D., Baitin D., Islamov A. K., Kuklin A., Shalguev V. K., Lanzov V., Isaev-Ivanov V. Analytical model for determination of parameters of helical structures in solution by small angle scattering: comparison of RecA structures by SANS // *FEBS letters*. – 2003. – T. 537, № 1-3. – C. 182-186.

24. DiCapua E., Schnarr M., Ruigrok R. W., Lindner P., Timmins P. A. Complexes of reca protein in solution: a study by small angle neutron scattering // *Journal of molecular biology*. – 1990. – T. 214, № 2. – C. 557-570.
25. Stasiak A., Egelman E. H., Howard-Flanders P. Structure of helical RecA-DNA complexes: III. The structural polarity of RecA filaments and functional polarity in the RecA-mediated strand exchange reaction // *Journal of molecular biology*. – 1988. – T. 202, № 3. – C. 659-662.
26. Danilowicz C., Hermans L., Coljee V., Prévost C., Prentiss M. ATP hydrolysis provides functions that promote rejection of pairings between different copies of long repeated sequences // *Nucleic acids research*. – 2017. – T. 45, № 14. – C. 8448-8462.
27. Menetski J. P., Bear D. G., Kowalczykowski S. C. Stable DNA heteroduplex formation catalyzed by the *Escherichia coli* RecA protein in the absence of ATP hydrolysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1990. – T. 87, № 1. – C. 21-25.
28. Rosselli W., Stasiak A. Energetics of RecA-mediated recombination reactions: without ATP hydrolysis RecA can mediate polar strand exchange but is unable to recycle // *Journal of molecular biology*. – 1990. – T. 216, № 2. – C. 335-352.
29. Kim J.-I., Cox M., Inman R. On the role of ATP hydrolysis in RecA protein-mediated DNA strand exchange. I. Bypassing a short heterologous insert in one DNA substrate // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – T. 267, № 23. – C. 16438-16443.
30. Jain S. K., Cox M. M., Inman R. B. On the role of ATP hydrolysis in RecA protein-mediated DNA strand exchange. III. Unidirectional branch migration and extensive hybrid DNA formation // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – T. 269, № 32. – C. 20653-20661.
31. Kim S. H., Raguathan K., Park J., Joo C., Kim D., Ha T. Cooperative conformational transitions keep RecA filament active during ATPase cycle // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – T. 136, № 42. – C. 14796-14800.
32. Gutman P. D., Carroll J. D., Ian Masters C., Minton K. W. Sequencing, targeted mutagenesis and expression of a *recA* gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans* // *Gene*. – 1994. – T. 141, № 1. – C. 31-37.
33. Kim J.-I., Cox M. M. The RecA proteins of *Deinococcus radiodurans* and *Escherichia coli* promote DNA strand exchange via inverse pathways // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99, № 12. – C. 7917-7921.
34. van Loenhout M. T., Kerssemakers J. W., De Vlaminck I., Dekker C. Non-bias-limited tracking of spherical particles, enabling nanometer resolution at low magnification // *Biophysical journal*. – 2012. – T. 102, № 10. – C. 2362-2371.
35. Svoboda K., Block S. M. Biological applications of optical forces // *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. – 1994. – T. 23. – C. 247-85.

36. Candelli A., Hoekstra T. P., Farge G., Gross P., Peterman E. J., Wuite G. J. A toolbox for generating single-stranded DNA in optical tweezers experiments // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 2013. – Т. 99, № 9. – С. 611-620.
37. Bosco A., Camunas-Soler J., Ritort F. Elastic properties and secondary structure formation of single-stranded DNA at monovalent and divalent salt conditions // *Nucleic acids research*. – 2014. – Т. 42, № 3. – С. 2064-2074.
38. Boyer B., Danilowicz C., Prentiss M., Prévost C. Weaving DNA strands: structural insight on ATP hydrolysis in RecA-induced homologous recombination // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47, № 15. – С. 7798-7808.

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК:

1. Alekseev A., Serdakov M., Pobegalov G., Yakimov A., Bakhlanova I., Baitin D., Khodorkovskii M. Single-molecule analysis reveals two distinct states of the compressed RecA filament on single-stranded DNA // *FEBS Letters* – 2020.
2. Алексеев А.А., Побегалов Г.Е., Байтин Д.М., Ходорковский М.А., Механические свойства неактивного филамента RecA на однострессовой ДНК // *Гены и Клетки*. – 2019. – Т. 14. – №. 3. – С. 61-61
3. 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. – Т. 466, № 3. – С. 426-430.
4. 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*. – 2015. – Т. 108, № 2. – С. 69a.

Публикации в других изданиях:

1. Алексеев А.А., Сердаков М.Д., Побегалов Г.Е., Бахланова И.В., Байтин Д.М., Ходорковский М.А., Конформационные переходы филамента RecA *Deinococcus Radiodurans* в ходе гидролиза АТФ // XXI Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии – 2020 – Т. 2. – С. 5-6
2. Алексеев А.А., Череватенко Г.А., Побегалов Г.Е., Байтин Д.М., Ходорковский М.А., Влияние силы на динамику филаментов RecA-ДНК в присутствии АДФ // Неделя науки СПбПУ : материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. – 2018 - С. 3-5

3. Алексеев А.А., Череватенко Г.А., Побегалов Г.Е., Байтин Д.М., Ходорковский М.А., Исследование конформационных переходов филамента RecA на однострессовой ДНК в ходе гидролиза АТФ // Тезисы докладов международной конференции Физика.СПб 22–24 октября 2019 года – 2019 - С. 99-100
4. G Pobegalov, A Alekseev, G Cherevatenko, M Khodorkovskii, D Baitin, Single-molecule insights into dissociation of RecA filaments from duplex DNA by RecX // “Saint Petersburg OPEN 2016” 3rd International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures – 2016 - С. 197-198
5. Алексеев А.А., Побегалов Г.Е., Череватенко Г.А., Арсениев А.Н., Ходорковский М.А., Байтин Д.М., Исследование влияния RecX на стабильность филаментов RecA-днк на одномолекулярном уровне // Неделя науки СПбПУ : материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. - 2015 – С. 290-292
6. Алексеев А.А., Макулова А.А., Арсениев А.Н., Байтин Д.М., Ходорковский М.А., Побегалов Г.Е. Изучение динамики изменения длины ДНК на одномолекулярном уровне методом оптического захвата // Научный форум с международным участием «Неделя науки СПбПУ» : материалы научно-практической конференции. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбПУ – 2015 - С. 231-234