НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.В. ПАЛЛАДИНА

Лиманский Александр Петрович

УДК 577.2 577.32

МОДИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ЗОНДОВ И СУБСТРАТОВ ДЛЯ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ

03.00.20 – биотехнология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук

Киев – 2007

Диссертацией является рукопись.

Работа выполнена в лаборатории новых и малоизученных инфекционных заболеваний Института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины (г. Харьков).

Научный	доктор медицинских наук, профессор						
консультант –	Волянский Юрий Леонидович,						
	Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова						
	АМН Украины, г. Харьков,						
	директор института.						

Официальные

оппоненты: доктор биологических наук, профессор, чл.-кор. НАН Украины Малюта Станислав Станиславович, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, заведующий отделом молекулярной генетики;

> доктор биологических наук, профессор Стародуб Николай Федорович,

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, главный научный сотрудник;

доктор физико-математических наук, профессор Малюкин Юрий Викторович,

Институт сцинтиляционных материалов НТК "Институт монокристаллов" НАН Украины, заведующий отделом нанокристаллических материалов.

Защита состоится «____» октября 2007 года в 14 часов на заседании специализированного ученого совета Д 26.240.01 в Институте биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины по адресу: 01601, Киев-30, ул. Леонтовича, 9.

С диссертацией можно познакомиться в библиотеке Института биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины (Киев, ул. Леонтовича, 9).

Автореферат разослан _____ сентября 2007 года.

Ученый секретарь специализированного ученого совета кандидат биологических наук

Кирсенко О.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Анализ тенденций развития общества свидетельствует, что прогресс как человечества в целом, так и отдельных стран в настоящее время и в ближайшем будущем в значительной степени будет определяться нанотехнологиями. Поэтому в ведущих научных странах разработаны приоритетные национальные нанотехнологические проекты. При этом считают, что существуют определенные риски вложения средств, но подчеркивают, что значительно большие риски возникают в случае невкладывания средств...

Способность молекул ДНК к регулируемой и высокоорганизованной сборке превращает ее в идеальный материал для нанотехнологии и нанобиотехнологии (области биотехнологии, которая направлена на изучение и создание материалов с улучшенными физическими, химическими и биологическими свойствами на наноуровне, фундаментальные исследования которой базируются на манипулировании биологическими системами с использованием нанотехнологического оборудования). Внимание широкого круга исследователей приковано к ДНК даже через пятьдесят с лишним лет после открытия структуры этой молекулы. Огромный интерес ученых и актуальность таких исследований обусловлены как ролью, которую играет ДНК в важнейших клеточных процессах, так и возможностью получения принципиально новой информации посредством разработки новейших технологий и методов исследования.

Мощным импульсом для развития нанобиотехнологии, структурной нанобиологии, нановирусологии стала разработка многочисленных вариантов сканирующей зондовой микроскопии. Наиболее распространенный из этих методов (атомно-силовая микроскопия, АСМ) открыл беспрецедентные возможности для визуализации, манипулирования и анализа единичных молекул, в том числе при физиологических условиях. "Глазом" атомно-силового микроскопа, или своеобразным биосенсором, является зонд, который присоединен к кантилеверу. Предварительные исследования (Gaub, 1994) показали, что сила разрыва между взаимодействующими поверхностями на уровне единичных пар молекул предоставляет новую и чрезвычайно ценную информацию о природе взаимодействия: возможно отличить специфическое взаимодействие от неспецифического, и даже энергетически равновеликие взаимодействия также могут быть дифференцированы. Ковалентное связывание биополимеров с зондом атомно-силового микроскопа превращает последний в мономолекулярный биосенсор. С его помощью можно изучать, например, тонкие особенности взаимодействия лиганда с рецептором, локализацию специфических рецепторов на поверхности образца.

Создание зондов для изучения поверхностных свойств клеток и локализации белков на поверхности и внутри клеточного ядра, исследования структуры молекул ДНК при иммобилизации на субстратах с разными поверхностными свойствами для фундаментальных и прикладных исследований с помощью сканирующей зондовой микроскопии являются актуальными задачами современной нанобиотехнологии, которая возникла на стыке нанотехнологии, молекулярной биологии, электроники, физики и химии поверхности.

Определяющая роль в получении высококачественных изображений биополимеров с помощью АСМ отводится процедуре модификации субстрата для иммобилизации молекул. Ранее было развито несколько методов подготовки образца ДНК. которые сейчас используют во многих лабораториях ввиду простоты процедуры. Для предварительной обработки слюды, субстрата для АСМ, с целью повышения ее афинности к ДНК применяли ди- и тривалентные катионы (Hansma et al., 1994; Bustamante et al., 1997), природные и синтетические полиамины (Okada et al., 1998; Jovin et al., 2001; Langowski et al., 2003). Для визуализации ДНК также были использованы субстраты с напылением золота, на поверхности которого образованы самоассоциированные монослои тиогрупп (Hegner, 1993). Наряду с указанными методами, ввиду наличия у них "узких мест", были разработаны другие подходы к модификации слюды – путем обработки производными аминосиланов в растворе и в газовой фазе (Любченко, 1992). Однако остались нерешенными вопросы относительно структуры линейных молекул ДНК, механизма компактизации суперспиральных ДНК, иммобилизованных на поверхности слюды. Целесообразность проведения таких исследований обусловлена возможностью получения дополнительной фундаментальной информации, которая может приблизить к пониманию особенностей компактизации ДНК в ядрах эукариот, нуклеоидах бактерий и при иммобилизации на субстрате.

Несмотря на известные методы модификации зондов и иммобилизации ДНК на слюде, технология создания модифицированных зондов и субстратов с заданными свойствами (а именно регулируемой поверхностной плотностью заряда и гидрофобностью) для фундаментальных и прикладных исследований в области нанобиотехнологии не была реализована к моменту начала данных исследований.

Диссертация посвящена решению научных проблем нанобиотехнологии, связанных с манипулированием биополимерами – созданию субстратов с регулируемыми поверхностными свойствами, разработке модифицированных зондов (как универсальных компонентов биосенсоров) и зондов, функционализованных биомакромолекулами, для силовой микроскопии узнавания единичных молекул, молекулярным механизмам компактизации и структуре линейных и суперспиральных ДНК, иммобилизованных на субстрате, визуализации комплексов, образованных РНКполимеразой (РНКП) бактериофага Т7 с ДНК-матрицей при элонгации транскрипции.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа связана с плановыми темами лаборатории новых и малоизученных инфекционных заболеваний Института микробиологии и иммунологии им. Мечникова АМН Украины: АМН 40/2001 "Разработка молекулярно-генетических тестсистем для раннего выявления возбудителей туберкулеза и генотипирования микобактерий", № госрегистрации 0101U001328; АМН 47/2002 "Изучение геномной организации *Bacillus anthracis* и разработка молекулярно-генетических тест-систем для детекции и типирования возбудителя сибирской язвы", № госрегистрации 0102U001570; АМН 59/2004 "Изучение геномной организации и разработка молекулярно-генетических тест-систем для детекции и типирования коронавируса человека, сцепленного с тяжелым острым респираторным синдромом", № госрегистрации 0104U002959, в рамках которых автор был ответственным исполнителем.

Цель и задачи исследования. Целью исследования была разработка нанобиологических подходов к визуализации и манипулированию единичными молекулами и клетками и определение путей и молекулярных механизмов компактизации молекул суперспиральной ДНК при иммобилизации на субстрате.

Объектом исследования являются модифицированные и функционализированные биополимерами зонды и субстраты для атомно-силовой микроскопии, процессы иммобилизации ДНК и белков на их поверхностях.

Предметом исследования являются процессы модификации и функционализации биополимерами зондов и субстратов для атомно-силовой микроскопии, структура молекул ДНК, иммобилизованных на поверхности аминослюды. Для достижения указанной цели, учитывая существующее состояние проблемы, в работе были поставлены и решены следующие задачи:

1. Разработать технологию наноманипулирования (вытягивания, сжатия) линейными и суперспиральными молекулами ДНК при иммобилизации на аминослюде.

2. Изучить изменения конформации линейных и суперспиральных ДНК в зависимости от поверхностных свойств слюды, на которой иммобилизованы молекулы ДНК.

3. Создать технологию аминомодификации зондов для атомно-силовой микроскопии в газовой фазе с возможностью их последующей функционализации биополимерами.

4. Разработать схемы функционализации ACM-зондов биополимерами на основе аминозондов с присоединенными молекулами аминореакционных линкеров, бычьего сывороточного альбумина и ДНК.

5. Охарактеризовать поверхностные свойства аминомодифицированных и функционализованных биополимерами зондов при разных ионных условиях с помощью атомно-силовой микроскопии в режиме силовых измерений.

6. Изучить комплексы, образованные РНК-полимеразой бактериофага Т7 с ДНКматрицей в процессе транскрипции.

7. Разработать методические подходы для АСМ-визуализации интактных клеток непосредственно в буферном растворе.

Методы исследования. Для визуализации биополимеров в воздухе и интактных клеток непосредственно в водной среде использовали атомно-силовую микроскопию. Измерения силы адгезии для разных пар поверхностей зонд-субстрат проводили с помощью атомно-силовой микроскопии в режиме силовых измерений. Компьютерный анализ применяли для поиска неканонических структур в геноме микроорганизмов, а стандартную полимеразную цепную реакцию – для получения ампликонов, которые использовали в качестве ДНК-матрицы при проведении транскрипции.

Научная новизна полученных результатов. Впервые показано, что молекулы ДНК, в отличие от известной их особенности – вытягивания под воздействием приложенной силы, – могут быть также сжаты. Такие сжатые суперспиральные молекулы ДНК, которые характеризуются расстоянием между нуклеотидами вдоль оси спирали 1,94 Å < H < 2,19 Å, были отнесены к новой форме – S-ДНК, модель которой построена.

Визуализация сжатых молекул суперспиральной ДНК стала возможной благодаря созданию методики получения модифицированной аминослюды с повышенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда в отличие от ранее используемой стандартной аминослюды. Кроме того, впервые показано, что при иммобилизации на модифицированной аминослюде длина оси суперспирали молекул ДНК уменьшается при повышении уровня суперспирализации молекул в отличие от ранее установленного факта неизменности длины оси суперспирали при указанных условиях. Впервые продемонстрировано, что суперспиральные молекулы ДНК компактизуются складыванием вдвое и вчетверо с образованием осей суперспирали второго и третьего порядка соответственно.

Впервые визуализированы высококомпактизованные структуры, образованные единичными суперспиральными ДНК, – полусфероиды, сфероиды и тороиды, в отличие от ранее исследованных мультимолекулярных агрегатов ДНК. На основе анализа полученных АСМ-изображений предложена модель конформационных переходов молекул суперспиральной ДНК при повышении плотности супервитков и уровня компактизации.

Впервые получены и охарактеризованы аминомодифицированные зонды для атомно-силовой микроскопии посредством их модификации в парах производного аминосилана. В отличие от известных модифицированных зондов, получаемых модификацией в растворе и которые характеризуются наличием на поверхности самоассоциированных монослоев молекул, полученные в данной работе аминозонды имеют существенно меньшую поверхностную плотность реакционных аминогрупп благодаря разработанной технологии модификации зондов в газовой фазе. Это особенно важно для последующей функционализации зондов биополимерами с целью уменьшения их количества на поверхности зонда при изучении взаимодействия пар единичных молекул, иммобилизованных на поверхностях зонда и субстрата.

Впервые детально охарактеризованы термодинамически стабильные инвертированные повторы для штаммов патогенных микобактерий туберкулеза H37Rv и CDC1551 с полностью секвенированным геномом, которые характеризуются разной вирулентностью.

Впервые показано, что объем молекулы ДНК, иммобилизованной на ACM-субстрате, который определен непосредственно из ACM-изображения и соответствующего сечения молекулы, совпадает с теоретически рассчитанным исключенным объемом ДНК.

Принципиальную новизну несет объяснение эффекта уширения адсорбированной на слюде ДНК за счет изменения высоты и ширины молекулы (при сохранении объема молекулы) в отличие от существующего объяснения из-за несовершенства процедуры подготовки образца ДНК (высушивание, подвижность на субстрате) и недостаточной точности измерения атомно-силового микроскопа. Разработан принципиально новый метод вытягивания молекул суперспиральной и линейной ДНК при иммобилизации на поверхность аминослюды с уменьшенной поверхностной плотностью заряда.

Аминомодифицированные зонды охарактеризованы не только величиной силы адгезии, но и работой силы адгезии. Тем самым показана возможность получения новой информации относительно их поверхностных свойств из силовых графиков.

Практическое значение полученных результатов. Одним из важных направлений современной нанобиологии и нанобиотехнологии является создание биосенсоров, позволяющих локализовать протеины на поверхности и внутри клеточного ядра, на основе ACM-зондов, функционализованных биополимерами, специфичными к указанным протеинам. Разработанные автором технологии, схемы, методические подходы и эмпирически определенные протоколы направлены на решение данной проблемы.

Впервые разработанная автором технология аминомодификации зондов в парах производного аминосилана может быть использована как для производства аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии, так и для их последующей функционализации биомолекулами. Разработанная в работе технология получения аминослюды с заданными свойствами также может быть с успехом использована при аминомодификации зондов. Отметим, что получение аминоповерхности зонда с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда (по аналогии с поверхностью аминослюды с уменьшенной поверхностной плотностью заряда) позволит понизить плотность экспонированных на поверхности зонда реакционных аминогрупп, а следовательно, и плотность конъюгированных с ними биополимеров, что необходимо для одного из направлений нанобиологии – силовой микроскопии узнавания единичных молекул.

Предложенный подход вытягивания молекул ДНК может быть применен в экспериментальных работах по фундаментальным исследованиям взаимодействия ДНК с белками при наличии приложенной к ДНК силы натяжения. Структурные параметры S-ДНК могут быть использованы при моделировании конформации молекул ДНК на поверхности с разными свойствами при взаимодействии с белками, пептидными нуклеиновыми кислотами, природными полиаминами в условиях повышенной плотности заряда.

Предложенные методики вычисления объема молекул ДНК, иммобилизованных на аминослюде, непосредственно из АСМ-изображений с построением соответствующих продольных сечений, а также методика оценки поверхностных свойств аминослюды путем визуализации адсорбированных суперспиральных молекул ДНК могут найти применение в фундаментальных исследованиях по нанобиологии биополимеров.

Полученные принципиально новые результаты по компактизации единичных суперспиральных молекул ДНК – визуализации тороидов, полусфероидов, сфероидов, а также жгутоподобных молекул, которые складываются вдвое в несколько этапов, – могут быть использованы в высших учебных заведениях в курсах биофизики, микробиологии, молекулярной биологии и, возможно, со временем и нано-

биологии и нанобиотехнологии.

Полученные диссертантом результаты по компактизации ДНК используют в Харьковском национальном университете им. Каразина в курсах лекций по физике биополимеров, молекулярной биологии и генетике.

Личный вклад соискателя. Личный вклад соискателя заключается в формулировании идеи, обосновании цели и задач диссертационной работы, а также методов их решения путем инициирования серии исследований структурных особенностей геномной ДНК микроорганизмов и механизма компактизации ДНК с целью получения как фундаментальной информации о структуре линейных и суперспиральных молекул ДНК, так и создания технологии модификации и последующей функционализации АСМ-зондов биополимерами и технологии получения аминослюды с заданными свойствами.

Приведенные в диссертации теоретические и экспериментальные результаты получены автором самостоятельно [1-9, 12, 13, 15-22, 27-31] и под его научным руководством [10, 14, 23-26, 32-39].

В работах [1-10, 12-39] автору принадлежат идея исследования, выбор методов и разработка методических подходов; постановка задачи работы [11] была осуществлена вместе с проф. Любченко Ю.Л.

Основные экспериментальные результаты в работе [11], приведенные в диссертации, получены автором самостоятельно, в работах [8, 10, 15, 17, 18, 23-25], опубликованных с соавторами, – вместе с к.б.н., с.н.с. Лиманской О.Ю. Автору принадлежат идеи получения аминослюды с заданными свойствами, разработка технологии и схемы модификации и функционализации биополимерами АСМ-зондов, создания модели компактизации суперспиральной ДНК при повышении уровня суперспирализации. Открытие и построение модели сжатой формы ДНК (S-ДНК) было проведено вместе с Лиманской О.Ю. и Лиманской Л.А. Во всех работах автор принимал участие в обсуждении полученных результатов, подготовке и написании статей.

Планирование диссертационной работы, корректирование и обсуждение методик исследования, интерпретация полученных результатов по определению термодинамически стабильных инвертированных повторов в геноме микобактерий проведены вместе с научным консультантом д.м.н., проф. Волянским Ю.Л.

Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н., проф. Волянскому Ю.Л. за постоянную поддержку, многочисленные плодотворные обсуждения и полезные замечания, д.ф.-м.н., с.н.с. Косевич М.В. за искреннюю помощь и тщательное рецензирование работы, а также к.б.н., с.н.с. Лиманской О.Ю. за конструктивные комментарии и вклад в оформление результатов работы.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты диссертации были представлены автором в виде стендовых докладов и обсуждены на нижеприведенных конференциях: 2-ой конференции по оптической спектроскопии биомолекулярной динамики (г. Эйлат, Израиль, 2006); 5-ом Европейском биофизическом конгрессе 15th IUPAB & 5th EBSA (г. Монпелье, Франция, 2005); Международной конференции "Microtechnologies for the New Millennium Symposium, Bioengineered and Bioinspired Systems" (г. Маспаломас, Испания, 2003); 1-ом конгрессе Европейского общества микробиологов (г. Любляна, Словения, 2002); 8-ом Международном симпозиуме "Molecular Aspects of Chemotherapy" (г. Гданск, Польша, 2001); Международном симпозиуме "Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures" (г. Токио, Япония, 2001); конференции для молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике (г. Киев, 2001); 185-ом съезде электрохимического общества США (г. Сан-Франциско, США, 1994); 2-ой Международной конференции "Nanometer Scale Science and Technology" (г. Москва, Россия, 1993); семинарах Института биохимии и биофизики Польской академии наук (г. Варшава, Польша, 2002), лаборатории клеточного ядра и сигнальных механизмов университета Киото (г. Киото, Япония, 2004), лаборатории молекулярной микробиологии университета Аризоны (г. Темпи, США, 1998-1999), отдела нанокристаллических материалов Института сцинтиляционных материалов НТК "Институт монокристаллов" НАН Украины (г. Харьков, 2006), Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 39 научных работ, в том числе 22 статьи в научных журналах, из которых 13 опубликованы без соавторов, а 8 статей – в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, включая 1 обзор, 14 тезисов докладов на конференциях, получено три патента Украины.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, девяти разделов, выводов, списка использованных источников, приложений. Ее полный объем составляет 363 страницы компьютерного текста, из которых текст занимает 321 страницу. Диссертация иллюстрирована 100 рисунками и 15 таблицами. Перечень использованной литературы объемом 33 страницы охватывает 349 источников. Общий объем пяти приложений составляет 9 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Материалы и методы исследований. В работе использовали линейную ДНК фага λ длиной 48502 пары нуклеотидов (п.н.) фирмы Promega (США), суперспиральную ДНК pUC8 (длина 2665 п.н.), линейную и суперспиральную ДНК pGEMEX (длина 3993 п.н.; Promega, США), бычий сывороточный альбумин (БСА, 5 фракция; Pierce, США).

Атомно-силовая микроскопия. Для визуализации линейных и суперспиральных молекул ДНК, белков в воздухе и клеток в буферном растворе использовали атомно-силовые микроскопы Nanoscope III с D-сканером и Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) с E-сканером, который обеспечивает максимальный диапазон сканирования до 12 мкм. Большинство АСМ-изображений ДНК было записано с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме "высота" с использованием кантилеверов OMCL-AC160TS (Olympus Optical Co., Япония) с резонансной частотой 340-360 кГц и константой жесткости 42 H/м, а также стандартных незаостренных зондов фирмы КТЕК International (Россия) с резонансной частотой 300-360 кГц.

Силовые измерения. Для характеристики аминомодифицированных субстратов, аминомодифицированных и функционализованных биополимерами зондов (путем измерения силы адгезии) применяли атомно-силовую микроскопию в режиме силовых измерений. Измерения были проведены с V-образными кантилеверами из нитрида кремния с золотым напылением, используя зонд E (Microlevers, Park Scientific Instruments, Inc., США) и OMCL-TR400PSA (Olympus Optical Co., Япония). Графики отклонение зонда – Z позиция, т.е. зависимости отклонения зонда от расстояния между поверхностями зонда и слюды (в дальнейшем силовые графики), записаны при вертикальной частоте сканирования 1 Гц и Z-амплитуде 50-200 нм. Графики сила – расстояние, из которых определяли силу адгезии и работу силы адгезии, получены преобразованием графиков отклонение зонда – Z позиция с помощью программного обеспечения Nanoscope III (версия 4.23b15) и Nanoscope IV (версия 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США). Величину силы адгезии, соответствующую максимальному отклонению зонда на кривой удаления, определяли как силу разрыва, т.е. силу, которую необходимо приложить для выведения из контакта поверхностей зонда и субстрата.

Константу жесткости определяли индивидуально для каждого кантилевера с помощью метода резонансной частоты Клевленда (Cleveland, 1993). Значения силы адгезии и ее работы усредняли для 50-196 графиков удаления для разных вариантов модификации ACM-зондов. Всего для характеризации ACM-зондов и субстратов было записано и обработано свыше 4000 силовых графиков. Статистическую обработку проводили с помощью программных пакетов Kaleidagraph (версия 3.01, США) и Origin (версия 5, США).

Модификация и функционализация АСМ-зондов и субстратов. Процедуру получения стандартной аминослюды и аминозондов (модифицированных зондов, поверхность которых равномерно покрыта аминогруппами) осуществляли с помощью модификации свежесколотой слюды аминогруппами в парах перегнанного 3аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС), полученного от Aldrich (США), United Chemical Technologies, Inc. (США) и Wakenyaku (Япония). В ходе выполнения диссертационной работы разработаны и созданы две установки для вакуумной перегонки АПТЭС. Первый вариант установки был применен в университете Аризоны (США), а другой вариант, который позволил получить аминослюду с возможностью регулирования поверхностной плотности заряда и гидрофобности, – в университете Киото (Япония).

Для функционализации аминозондов использовали два гомобифункциональных линкерных агента, содержащих на обоих концах аминореакционную эфирную группу (NHS-эфир): дисукцинимидил суберат (Pierce, США) (ДСС-линкер) и этиленгликоль-бис (N-гидроксисукцинимидный эфир янтарной кислоты) (ЕГС-линкер). Процедуру последующей функционализации АСМ-зондов, для которой использовали бычий сывороточный альбумин, ДНК и глютаральдегид, проводили в коммерческой жидкостной ячейке АСМ. Субстраты для ACM, которые использовали для иммобилизации биополимеров, можно расположить в порядке возрастания гидрофобности и поверхностной плотности положительного заряда: свежесколотая слюда < аминослюда с уменьшенной гидрофобностью < стандартная аминослюда < модифицированная аминослюда.

Подготовка образцов ДНК для АСМ и ПЦР. На полоску аминослюды площадью 1 см² наносили каплю раствора ДНК в ТЕ буфере (10 мМ трис-HCl pH 7,9, 1 мМ ЭДТА) объемом 10 мкл, промывали после 2-минутной экспозиции деионизованной водой, обдували потоком аргона и выдерживали образец под давлением 100 мм рт. ст. на протяжении 20 минут.

Линейную ДНК рGEMEX получали ферментативной обработкой суперспиральной ДНК рGEMEX (рис. 1) рестриктазой ScaI (New England Biolabs, Англия). Сконструированные праймеры ограничивали фрагмент ДНК, содержащий промотор и область терминации транскрипции Т7 РНК-полимеразы. Для амплификации фрагмента линейной ДНК использовали полимеразную цепную реакцию.

Для очистки амплифицированного фрагмента ДНК использовали следующую процедуру. После проведения электрофореза вырезали полоску геля, содержащую ампликон, при этом облучая гель длинноволновым излучением УФ-источника низкой интенсивности (BioRad, CША). Для дальнейшей очистки ампликона от нуклеотидов, праймеров, ДНК-полимеразы и бромистого этидия использовали набор QIA-quick PCR purification kit (QIAgen, Япония) согласно рекомендациям производителя, а также экстракцию фенол/хлороформом с последующим переосаждением этанолом (рис. 2).





Рис. 1. Анализ суперспиральной ДНК рGEMEX1 после проведения электрофореза в 2 % агарозе и последующего окрашивания бромистым этидием. 1 – суперспиральная ДНК рGEMEX1 (3993 п.н.); 2 – неочищенный ампликон длиной 1414 п.н.; 3 – 1000 п.н. маркер молекулярной массы

Рис. 2. Очищенные ампликоны после проведения электрофореза, вырезания полоски с ПЦР-продуктом и обработки с помощью набора для экстракции QIAquick extraction kit. Амплификация с ДНК-полимеразой: 1 – Ругоbest TaKaRa; 2 – Invitrogen Platinum. M – 1000 п.н. маркер мол. массы

Для проведения ПЦР кроме стандартной Таq ДНК-полимеразы ("Promega", США) использовали термостабильные ДНК-полимеразы высокой точности двух видов – Руговезt ДНК-полимеразу (ТаКаRa Co., Япония) и Invitrogen Platinum

ДНК-полимеразу (Invitrogen, Япония). Для молекулярного моделирования структуры ДНК использовали свободно распространяемый программный пакет VMD (версия 1.8.3).

Визуализация цианобактерий. В работе использованы клетки цианобактерий штамма Synechocystis PCC 6803. Измерения проводили в 50 мМ TES буфере (N-трис [гидроксиметил]-метил-2-аминоэтансерная кислота) при комнатной температуре. Для получения изображений цианобактерий в буферном растворе использовали стандартную стеклянную жидкостную ячейку. АСМ-изображения в водном растворе были записаны в вибрирующем варианте АСМ, при частоте сканирования 3-4 Гц и амплитуде 20-40 мВ с помощью стандартных V-образных кантилеверов с константой жесткости K = 0,20-0,27 H/м (Digital Instruments, CША).

Проведение транскрипции. В качестве матрицы для транскрипции использовали ампликон длиной 1414 п.н., содержащий промотор и область терминации транскрипции РНК-полимеразы бактериофага T7. Реакцию транскрипции проводили с использованием наборов для транскрипции с помощью T7 РНК-полимеразы (Promega, США), MegaScript T7 (Ambion, США) и набора от New England Biolabs (Англия) при разных температурных и временных параметрах. Для удаления матрицы ДНК и деградации ДНК, которая может контаминировать препарат РНК, после проведения транскрипции к реакционной смеси добавляли ДНКазу I (Ambion, США) и инкубировали в течение 15 мин. при температуре 37 °C. Для инактивации ДНКазы реакционную смесь инкубировали при температуре 70 °C на протяжении 10 мин. Для контроля эффективности транскрипции после остановки транскрипции проводили электрофорез в 1,2 % агарозном геле, содержащем 1,8 % формальдегида.

Результаты исследований и обсуждение.

Визуализация вытянутых молекул ДНК. Поверхность слюды, стандартного субстрата для иммобилизации биомолекул при АСМ-исследованиях, отрицательно заряжена в буферных растворах при нейтральных значениях рН и невысокой ионной силе (Butt, 1991). Поэтому для иммобилизации в данных условиях на поверхности слюды отрицательно заряженных молекул ДНК используют несколько подходов, позволяющих изменить суммарный поверхностный заряд слюды с отрицательного на положительный. Методика приготовления образца ДНК на аминослюде обеспечивает сильное связывание молекул ДНК с субстратом за счет суперпозиции электростатических и вандерваальсовых сил. При этом иммобилизация молекул ДНК на поверхности аминослюды в водном растворе осуществляется преимущественно путем электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными аминогруппами слюды (рис. 3).

Хорошо известно, что ДНК является эластичной молекулой, которая может быть вытянута, подобно пружине. И такие вытянутые молекулы ДНК с увеличенным расстоянием между нуклеотидами вдоль оси дуплекса были получены и изучены несколькими группами исследователей. С помощью современных методов наноманипулирования единичными молекулами было установлено, что молекулу ДНК можно растянуть в 1,7 раза до межнуклеотидного расстояния H = 5,8 Å в отличие от H = 3,4 Å для B-ДНК (Cluzel et al., 1996; Bustamante et al., 1996).

Принимая во внимание известные экспериментальные данные об эластичности молекул ДНК (Leuba et al., 2004) и важность исследования фундаментальных микромеханических свойств молекулы ДНК, нами разработан новый метод получения вытянутых молекул ДНК с их последующей визуализацией с помощью АСМ. Разработанный метод является чрезвычайно простым и эффективным: он позволяет получать вытянутые молекулы ДНК (рис. 4) при экспозиции капли раствора ДНК на поверхности аминослюды с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Вытянутые молекулы ДНК формируются в процессе подготовки образца для АСМ-визуализации, а именно, при промывании слюды ультрачистой водой после экспозиции с раствором ДНК. Важно, что точно такую же процедуру подготовки образца с интенсивным промыванием направленным потоком воды поверхности слюды мы использовали и для стандартной, и для модифицированной аминослюды с увеличенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Однако вытянутые молекулы ДНК формировались только на поверхности аминослюды с уменьшенной гидрофобностью. Анализ совокупности данных по



Рис. 3. АСМ-изображение молекулы ДНК фага λ, иммобилизованной на стандартной аминослюде. Размер кадра 1,8 мкм × 1,8 мкм. Приведена шкала градаций цвета, соответствующая диапазону координаты Z от 0 до 4,6 нм

визуализации линейных и суперспиральных ДНК на разных субстратах указывает, что формирование вытянутых молекул ДНК обусловлено поверхностными свойствами субстрата, на котором они иммобилизованы под влиянием механической энергии направленного потока воды.

Ввиду использования аминослюды с уменьшенной плотностью поверхностных аминогрупп резко уменьшается число образованных связей между электроотрицательными сайтами ДНК и положительно заряженными аминогруппами слюды. Поэтому под влиянием потока воды молекулы ДНК вытягиваются параллельно направлению, в котором проводится промывание поверхности слюды. Измерение контурной длины единичной нативной молекулы ДНК с субнанометровой разрешающей способностью, что является отличительной особенностью АСМ, позволяет определить, зная количество пар нуклеотидов в данной молекуле, расстояние между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали ДНК. Расстоянием между основаниями, или райзом (rise), называется расстояние между плоскостями оснований, а расстоянием между нуклеотидами вдоль оси спирали (H) – проекция расстояния между основаниями на ось двойной спирали ДНК. Увеличение контурной длины суперспиральных молекул ДНК (ссДНК) рGEMEX от 1243 нм (характерного значения для невытянутой молекулы) до 1943 нм (рис. 5а) и 2140 нм (рис. 5б) означает, что вытягивание ссДНК в 1,56 и в 1,72 раза приводит к возрастанию межнуклеотидного расстояния до H = 4,87 Å и H = 5,36 Å соответственно. Полученные данные для вытянутых молекул ДНК рGEMEX хорошо согласуются с ранее опубликованными результатами исследования вытянутых ДНК разными методами, в том числе и с помощью метода оптического пинцета (Leuba et al., 2003). Очень важным



Рис. 4. АСМ-изображение вытянутых молекул ДНК фага λ , которые иммобилизованы на аминослюде с уменьшенной поверхностной плотностью аминогрупп. Размер кадра 7,5 мкм × 7,5 мкм

является тот факт, что вытянутые молекулы ДНК получены на поверхности аминослюды с уменьшенной поверхностной плотностью аминогрупп. Сразу возникает ряд вопросов. Можно ли получить аминослюду с заданными свойствами, а именно с повышенной поверхностной плотностью аминогрупп? Что будет происходить с молекулой ДНК при иммобилизации на поверхности аминослюды с повышенной плотностью аминогрупп? Если на аминослюде с уменьшенной поверхностной плотностью аминогрупп молекулы ДНК вытягиваются, могут ли они быть сжатыми подобно пружине при иммобилизации на поверхности слюды с повышенной плотностью аминогрупп? Поиску ответов на эти вопросы были посвящены исследования, результаты которых приведены в последующих разделах работы.

S-ДНК – суперспиральная ДНК с расстоянием 1,94 – 2,19 Å между парами оснований вдоль оси дуплекса. С помощью АСМ-визуализации молекул ДНК и измерения их контурной длины было определено расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали ДНК. Показано, что для линейной ДНК (а именно для ампликона, полученного после проведения ПЦР с использованием высокоточных видов термостабильной ДНК-полимеразы), иммобилизованной на свежесколотой слюде, контурная длина уменьшается по сравнению с ожидаемым теоретическим значением, характерным для В-ДНК. На основе определенного расстояния (H = 3,07 Å)



Рис. 5. АСМ-изображения вытянутых суперспиральных молекул ДНК рGEMEX, иммобилизованных на аминослюде с уменьшенной плотностью аминогрупп. (а) – контурная длина ДНК L = 1943 нм, что соответствует расстоянию между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали H = 4,87 Å. Размер кадра 1,13 мкм × 1,13 мкм. (б) – контурная длина ДНК L = 2140 нм, H = 5,36 Å. Размер кадра 1,07 мкм × 1,07 мкм

сделано предположение, что линейные молекулы ДНК, адсорбированные на гидрофильной слюде, находятся в А-форме, переход к которой индуцируют как высушивание образца, так и взаимодействие с поверхностью слюды.

Для суперспиральной ДНК рGEMEX, иммобилизованной на свежесколотой слюде (рис. 6а), были визуализированы плектонемичные суперспиральные молекулы ДНК, характеризующиеся невысоким значением плотности супервитков (7 суперспиральных витков, или узлов, $\sigma = -0,024$). Ранее аналогичные изображения были получены для плазмидных ДНК, адсорбированных на субстратах, обработанных поликатионами полилизином, спермином (Jovin et al., 2003; Tanigawa et al., 1998). Суперспиральные молекулы ДНК рGEMEX на стандартной аминослюде (рис. 6б) более компактизованы, однако их контурная длина, измеренная из АСМизображения, лишь незначительно меньше (L = 1216 нм) по сравнению с контурной длиной плектонемичных молекул ДНК на слюде с катионами Mg²⁺ (L = 1243 нм, рис. 6а). Для молекул ДНК, изображенных на рис. 6а, длина суперспиральной оси (оси двойной спирали суперспиральной молекулы ДНК, которая может быть закручена в виде спирали в отличие от оси линейной молекулы ДНК) составляет l = 466 нм.

В то же время на модифицированной аминослюде (рис. 6в) с повышенной гидрофобностью и поверхностной плотностью положительного заряда по сравнению со стандартной аминослюдой наряду с плектонемичными суперспиральными молекулами ДНК были визуализированы единичные молекулы с чрезвычайно высоким уровнем компактизации, степень суперспирализации которых значительно выше по сравнению как с ранее экспериментально достигнутым уровнем, так и рассмотренным теоретически.

Молекула суперспиральной ДНК на рис. 6в, иммобилизованная на модифициро-



Рис. 6. АСМ-изображения единичных суперспиральных молекул ДНК рGEMEX, иммобилизованных на разных субстратах: свежесколотой слюде после нанесения капли раствора ДНК в 10 мМ HEPES буфере, содержащем 2,5 мМ MgCl₂ (а), стандартной аминослюде (б) и модифицированной аминослюде (в). Контурная длина ДНК рGEMEX составляет: (а) – 1243 нм; (б) – 1216 нм; (в) – 873 нм. Длина суперспиральной оси молекул ДНК: (а) – 466 нм; (в) – 382 нм. Размер кадра: а – 583 нм × 583 нм; б – 500 нм × 500 нм; в – 500 нм × 500 нм

ванной аминослюде, резко отличается по своим параметрам от молекул ДНК на рис. 6а и рис. 6б: количество узлов возросло до 11, длина суперспиральной оси уменьшилась до 382 нм, а рассчитанная из АСМ-изображения контурная длина составила 873 нм (!).

Поскольку длина секвенированной последовательности ДНК рGEMEX составляет 3993 п.н., было определено расстояние между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали ДНК. И если для ДНК рGEMEX, изображенной на рис. 6а, межнуклеотидное расстояние H = 3,11 Å, то для сверхсуперспирализованной ДНК на рис. 6в рассчитанное значение составило H = 2,19 Å (!). Значение H = 3,11 Å согласуется с ранее приведенными фактами незначительного уменьшения контурной длины ДНК, высушенной на слюде, в предположении В-формы ДНК (Bustamante et al., 2003). Однако величина H = 2,19 Å указывает на то, что суперспиральные молекулы ДНК, иммобилизованные на аминослюде с повышенной плотностью заряда, претерпевают значительные внутримолекулярные изменения, которые приводят не только к увеличению уровня суперспирализации, но и к значительному уменьшению межнуклеотидного расстояния. Расстояние между нуклеотидами для других сверхсуперспиральных молекул ДНК варьирует от 1,94 Å до 2,19 Å (рис. 7 и рис. 8).

Как один из параметров, который позволяет отличить единичную молекулу от димера и других высококомпактизованных структур, образованных несколькими молекулами, мы выбрали объем молекулы ДНК, рассчитанный непосредственно из ACM-изображения соответствующей молекулы. Его значение незначительно отличается от теоретически рассчитанного исключенного объема молекулы ДНК pGEMEX ($V_{искл.} = 4010 \text{ нм}^3$) и позволяет надежно дифференцировать единичные молекулы ДНК от агрегатов. Для более точного вычисления объема мы использовали не измеренное в одном месте значение высоты молекулы (которое значитель-



Рис. 7. (a) АСМ-изображение единичной сверхсуперспиральной ДНК рGEMEX в S-форме, полученное после иммобилизации на поверхности модифицированной аминослюды. Размер кадра 250 нм × 250 нм. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси дуплекса для данной молекулы H = 2,19 Å. Стрелками показаны две нити, каждая из которых образована двойной спиралью ДНК, закрученные в правую сверхсуперспиральную ДНК с четко заметными 11 сверхвитками (узлами). (б), (в) Продольные сечения суперспиральной молекулы ДНК рGEMEX. Секущая плоскость проведена перпендикулярно плоскости рисунка через линию, показанную на вставках. Объем молекулы рассчитан как произведение ширины молекулы на сумму площадей продольных сечений. Шесть (рис. 76) и пять пиков (рис. 7в) на профилях сечений соответствуют шести и пяти узлам. (г) Трехмерное изображение молекулы. Стрелками показаны нити дуплекса, которые частично разошлись и образуют сверхсуперспиральную молекулу. (д) Поперечное сечение, проведенное через разошедшиеся нити дуплекса. На вставке показана линия, через которую проведена секущая плоскость. Два пика соответствуют профилям сечений двух нитей, из которых была определена их высота. Максимальная высота пика соответствует высоте фрагмента молекулы. Стрелками на сечении и на вставке показан пик и соответствующая ему двойная спираль ДНК, высота которой составляет $h = 0.38 \pm 0.05$ нм

но варьирует для сверхсуперспирализованных ДНК: при характерной высоте одной нити двойной спирали h = 0,3-0,4 нм высота в узлах, образованных двумя пересекающимися нитями ДНК, может достигать $h_{max} = 1,3-1,8$ нм), а, как правило, продольное сечение молекулы секущей плоскостью, перпендикулярной плоскости слюды. Из приведенных в табл. 1 параметров молекул суперспиральных ДНК можно видеть, что значение объема для сверхсуперспиральных молекул ДНК (поз. 3-5 в табл. 1, рис. 6в, рис. 7 и рис. 8) совпадает со значением объема для единичной суперспиральной молекулы (поз. 1 табл. 1, рис. 6а) в пределах погрешности измере-



Рис. 8. (а) АСМ-изображение единичной левой сверхсуперспиральной ДНК рGEMEX в Sформе. Размер кадра 250 нм × 250 нм. (б) Трехмерное изображение молекулы. (в) Профиль поперечного сечения, выполненного секущей плоскостью вдоль линии, которая показана на вставке. Стрелки указывают на пик и соответствующий ему фрагмент нити двойной спирали ДНК, высота которой составляет h = 0,38 нм. (г) Профиль поперечного сечения, выполненный вдоль линии, показанной на вставке. Стрелка указывает на пик, из которого была определена высота соответствующей части двойной спирали ДНК h = 0,40 нм

ния (± 7,1 %).

Другим важным результатом, свидетельствующим о сверхсуперспирализации единичных молекул, а не жгутов, является высота закрученных нитей, образованных двухцепочечной ДНК. На АСМ-изображении (рис. 7а) и на трехмерном изображении данной молекулы (рис. 7г) стрелками указаны четко различимые нити данной молекулы. Измеренная высота этих нитей, которые частично разошлись (рис. 7д), показывает, что указанные нити образованы двухцепочечной ДНК, поскольку высота каждой нити (h = 0,38 нм) равна высоте нити единичной иммобилизованной на немодифицированной слюде молекулы ДНК (поз. 1, табл. 1), что, в свою очередь, совпадает с литературными данными по АСМ-измерению высоты ДНК, адсорбированной на субстрате (Tanigawa et al., 1998). Аналогичные измерения были проведены и для другой сверхсуперспиральной молекулы ДНК (рис. 8). Как значение объема (поз. 4, табл. 1), так и измерение высоты нитей данной молекулы (h = 0,38-0,40 нм) подтверждает, что и данная сверхсуперспиральная структура образована одной (!) молекулой ДНК. Значения объемов для других визуализированных высококомпактизованных структур (полусфероида, сфероида, димеров, тримера) подтверждают надежность данного метода определения объема конденсированных структур и эффективность их дифференциации.

Такие сжатые, подобно пружине, суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным расстоянием между нуклеотидами вдоль оси дуплекса Н ~ 2 Å по сравнению с

Параметры суперспиральных молекул ДНК рGEMEX, определенные из АСМ-изоблажений

	Асти-изооражении										
				Контур-	Длина	Контур-	Расстоя-				
				ная дли-	супер-	ная дли-	ние меж-				
По-		Вы-	Вы-	на су-	спи-	на рела-	ду нукле-	Объ-			
3И-	Молекула	сота	сота	перспи-	раль-	ксиро-	отидами	ем			
ция				ральной	ной	ванной	вдоль оси				
		h _{max}	h _{min}	молеку-	оси	молеку-	спирали	V			
		(нм)	(нм)	ЛЫ	<i>l</i> (нм)	лы L _{rel}	H (Å)	(HM ³)			
				L (нм)		(нм)					
1	E.	0,80	0,35	1243	466	1243	3,11	3510			
2	N. C.	0,99	0,35	1216	-	1216	3,05	3530			
3	>	2,00	0,35	390	370	873	2,19	3830			
4	al	1,80	0,27	577	282	776	1,94	3830			
5	2	1,33	0,35	642	390	852	2,11	3800			

хорошо известными формами ДНК были названы нами новой формой ДНК – S-ДНК ("S" – от английского слова "spring" или пружина).

Существуют ли пространственные ограничения для нуклеотидов в S-ДНК? Построенные нами модели фрагмента S-ДНК (рис. 9а) и B-ДНК (рис. 9б) длиной 15 п.н. демонстрируют принципиальную возможность существования сжатых молекул S-ДНК, которые могут быть промежуточным этапом при компактизации единичных суперспиральных молекул до уровня сфероидов и минитороидов. Приведенные результаты свидетельствуют, что сжатие суперспиральных молекул ДНК обусловлено поверхностными свойствами субстрата – высокой гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда модифицированной аминослюды, – на котором иммобилизованы молекулы ДНК. Важно, что при этом образуются как левые, так и правые сверхсуперспиральные молекулы ДНК, которые были визуализированы.

Полученные результаты показывают, что сверхсуперспирализация, которая ведет к сжатию единичных молекул ДНК, может происходить *in vitro* в отсутствии протеинов, а необходимым условием этого являются высокие поверхностная плотность положительного заряда и гидрофобность субстрата, на котором иммобилизована суперспиральная ДНК.

Сжатие ДНК, обнаруженное нами, – весьма интересное явление в структурной



Рис. 9. Модель фрагмента ДНК длиной 15 пар нуклеотидов в S-форме (расстояние между парами оснований вдоль оси спирали H = 2,0 Å) (а) и B-форме (H = 3,4 Å) (б). Последовательность "+"-нити: 5′ - аад gtc ttc ggt cgt - 3′. Спиральный повтор для обеих форм ДНК составляет 10,5 пар нуклеотидов на виток

организации нуклеиновых кислот. Исходя из полученных данных, его механизм представляется далеко не тривиальным. В созданных экспериментальных условиях, возможно, реализуется влияние очень многих факторов. Во-первых, это высокая плотность положительного поверхностного заряда аминослюды, на которой иммобилизованы молекулы ДНК. Во-вторых, резкое изменение экранирования фосфатных групп (как следствие иммобилизации на субстрате с повышенной плотностью положительного заряда), что приводит к повышенной нейтрализации их отрицательного заряда. В-третьих, возможно возникновение сильной перегруппировки сетки водородных связей связанной воды в области стэкинга пар оснований. В-четвертых, возможным является конкурентное встраивание NH₂-групп поверхностного слоя аминослюды в межплоскостные водородные связи нуклеотидов (Kabanov A. et al., 2002).

Компактизация суперспиральной ДНК на модифицированной аминослюde. Paнee было показано (Vinograd et al., 1971), что длина оси суперспиральной ДНК остается постоянной при увеличении плотности супервитков и составляет ~ 35 % контурной длины релаксированной молекулы. Это условие выполняется для молекул ДНК рGEMEX, иммобилизованных на свежесколотой слюде, которая характеризуется относительно невысокой поверхностной плотностью заряда. Иммо-



Рис. 10. Изображение суперспиральной ДНК рGEMEX (длина 3993 п.н.) в воздухе, полученное с помощью атомно-силового микроскопа после нанесения раствора ДНК в ТЕ буфере на поверхность стандартной аминослюды (а) и модифицированной аминослюды (б), которая характеризуется более высоким уровнем гидрофобности и повышенной поверхностной плотностью аминогрупп (т.е. повышенной плотностью положительного заряда) по сравнению со стандартной аминослюдой. Представлены суперспиральные молекулы ДНК с разным уровнем компактизации: от плектонемичных (а) до сверхсуперспиральных молекул (б) с разной длиной суперспиральной оси (две молекулы в тороидальной и приближенной к тороидальной конформации показаны белыми вертикальными стрелками), а также в конформации сфероида (два сфероида показаны наклонными черными стрелками). Размер кадра – 2 мкм × 2 мкм

билизация суперспиральных ДНК на модифицированной аминослюде, имеющей повышенную поверхностную плотность заряда по сравнению не только со свежесколотой, но и со стандартной аминослюдой, ведет к существенной компактизации молекул ДНК (рис. 10), которые характеризуются дальнейшим уменьшением длины суперспиральной оси.

Из 108 индивидуальных молекул ссДНК, которые были исследованы, наиболее характерные варианты молекул с соответствующими параметрами представлены в табл. 2 и табл. 1. Из них количество плектонемичных суперспиральных ДНК (позиция A2 в табл. 2) с низкой плотностью супервитков $\sigma \sim -0,02$ равно 21 %; сверхсу-перспиральные ДНК с высоким значением $\sigma \sim -0,13$, образующие суперспиральную ось первого порядка (B3), – 12 %; сверхссДНК, образующие ось суперспирали второго порядка (C3, B2, C2), – 27 %; молекулы, образующие суперспиральную ось третьего порядка (D2, D3, E2), – 14 %; наболее высококомпактизованные молекулы – сфероиды – 17 %.

Длина суперспиральной оси первого порядка молекул ссДНК составляет ~ 466 – 570 нм. При повышении уровня компактизации ДНК образуется ось суперспирали второго порядка (рис. 11) длиной ~ 280 нм (что составляет ~ 20 % от контурной длины релаксированной молекулы). В результате дальнейшей компактизации образуются молекулы с еще вдвое меньшей длиной суперспиральной оси (длина оси

Параметры сверхсуперспиральных молекул ДНК рGEMEX, определенные из АСМ-изображений. В скобках указано количество визуализированных молекул для каждого варианта. Значение исключенного объема для ДНК pGEMEX равно V = 4010 нм³

Пози- ция на рис. 13	Молекула	Высо- та h _{max} (нм)	Высо- та h _{min} (нм)	Контур- ная длина суперспи- ральной молекулы L (нм)	Длина супер- спи- ральной оси <i>l</i> (нм)	Кажу- щийся объем V (нм ³)
A3 (3)	E	0,80	0,35	1243	466	3510
A2 (21)	S.	0,99	0,35	1216	-	3530
B3 (12)	~~}	0,95	0,35	580	567	4440
C3 (16)	5	1,69	0,78	279	279	3280
B2 (4)	0	1,35	0,28	260	260	3470
C2 (7)	6	1,36	0,30	270	270	3520
D2 (3)	J	3,00	1,25	140	140	5180
D3 (7)	10	1,74	0,84	260	260	3980

третьего порядка равна l = 140 нм, что составляет ~ 10 % от контурной длины релаксированной молекулы, поз. D2 в табл. 2), минитороиды диаметром ~ 50 нм (рис. 12), а также молекулы в сферической конформации – полусфероиды и сфероиды (рис. 11).

Поскольку ранее конденсация ДНК под влиянием разных факторов была обнаружена только для димеров, тримеров, но не для единичных молекул ДНК (Hansma, 1997; Dunlap, 1997), рассмотрим более детально С-образную сверхсуперспираль-



Рис. 11. АСМ-изображение (а), профили сечений (б) и (г) и трехмерное изображение (в) единичной сверхсуперспиральной ДНК рGEMEX, образовавшей ось суперспирали второго порядка. (а) Стрелками показаны разошедшиеся нити ДНК, профиль сечения которых приведен на рис. 11б. Черная стрелка указывает на сфероид. (б) Линия, вдоль которой проведена секущая плоскость через три разошедшиеся нити, показана на вставке. Высота двух пиков составляет h = 0,3 нм, а высота третьего пика – h = 0,6 нм. (г) Профиль сечения, проведенного через разошедшиеся нити сверхсуперспиральной ДНК; секущая плоскость проведена вдоль линии, показанной на вставке. Высота этих нитей составляет h = 0,3 нм, что соответствует высоте нити двухцепочечной ДНК. Размер кадра 250 нм × 250 нм

ную молекулу (рис. 11), конформация которой подобна тороиду. АСМ-изображение этой молекулы с высоким разрешением (рис. 11а) и ее трехмерное изображение (рис. 11в) наглядно демонстрируют, что данная сверхссДНК образована несколькими четко различающимися нитями (стрелками указана часть молекулы, образованная тремя локально разошедшимися нитями). Показанный на рис. 116 профиль сечения, проведенного через эти нити (на вставке показана линия, вдоль которой проведена секущая плоскость перпендикулярно плоскости рисунка), позволяет определить их высоту. Необходимо отметить, что измерение высоты биомолекулы, иммобилизованной на субстрате, с субнанометровым разрешением (!) является крайне важной особенностью атомно-силовой микроскопии, что выгодно отличает ее и в этом отношении от электронной микроскопии. Поскольку высота двух нитей ДНК составляет h = 0.3 нм (что соответствует характерному значению высоты для двухцепочечной молекулы ДНК, иммобилизованной на слюде (Tanigawa et al., 1998)), а высота третьей нити равна h = 0.6 нм, то это означает, что две разошедшиеся нити сверхссДНК являются двухцепочечными нитями ДНК, а нить, высота которой равна двойной высоте молекулы ДНК на слюде (h = 0,6 нм), образована двумя закрученными двухцепочечными нитями.



Рис. 12. АСМ-изображение (а), профили сечения (б) и (г) и трехмерное изображение (в) единичной сверхсуперспирализованной ДНК рGEMEX, образовавшей минитороид. (а) Размер кадра 250 нм × 250 нм. (б) Высота двух фрагментов тороида, через которые проведена секущая плоскость, равна h = 1,74 нм. (г) Высота других двух фрагментов тороида, определенная из профиля сечения, равна h = 1,74 нм и h = 0,84 нм соответственно. Треугольниками показан пик на профиле сечения и уровень, относительно которого было проведено измерение его высоты. Высота этого сегмента минитороида равна h = 1,74 нм. (а, г) Внешний диаметр минитороида – 50-60 нм, внутренний – 15-25 нм

Таким образом, анализ этого профиля сечения показал, что С-образная сверхссДНК образована четырьмя двухцепочечными нитями ДНК. Поскольку контурная длина приведенной сверхссДНК составляет L = 260 нм, это означает, что данная компактизованная структура образована единичной кольцевой молекулой ДНК, "сложенной пополам". Отметим, что при контурной длине L = 260 нм число нитей ДНК в профиле сечения для димера должно было бы составлять восемь.

Представленный на рис. 11г другой профиль сечения этой С-образной молекулы также подтверждает, что данная молекула образована нитями, высота которых равна высоте двунитевой ДНК (h = 0,3 нм). Фактически анализ профиля сечения наряду с определением исключенного объема молекулы также позволяет дифференцировать мономолекулярные структуры от агрегатов, образованных несколькими молекулами.

Другой визуализированной нами структурой, внешне похожей на сфероид на ACM-изображении с невысокой разрешающей способностью, является минитороид. Из профилей сечений на рис. 126 и рис. 12г можно видеть, что три из четырех сегментов тороида имеют одинаковую высоту (h = 1,74 нм), а четвертый сегмент имеет почти вдвое меньшую высоту (h = 0,84 нм). Это означает, что в четвертом сегменте число оборотов жгута ссДНК меньше, чем в других трех сегментах, т.е. минитороид представляет собой своеобразное миникольцо с разрезом в верхней



Рис. 13. Модель компактизации молекул суперспиральной ДНК, предложенная на основе полученных АСМ-изображений ЛНК рGEMEX. А1, А2 – стандартная аминослюда, АЗ – свежесколотая слюда, другие АСМ-изображения получены на модифицированной аминослюде. Стрелки указывают направление этапов дальнейшей компактизации ДНК; прямоугольником выделены четыре димера. При повышении поверхностной плотности заряда, или количества протонированных аминогрупп (т.е. при переходе от свежесколотой и стандартной аминослюды к модифицированной аминослюде), образуются разные топологические варианты компактизованных молекул ДНК. ВЗ сверхссДНК, образующая ось суперспирали 1 порядка; В2, С2, С3 - сверхссДНК, образующая ось суперспирали 2 порядка; D2 - сверхссДНК, образующая ось суперспирали 3 порядка; Е2, Е3 – сфероиды; D3 – минитороид, образованный единичной молекулой ДНК.

части, длина которого равна четверти длины окружности.

На основе анализа полученных АСМ-изображений нами предложена схема поэтапной компактизации как для единичных молекул ДНК, так и для димеров (рис. 13). Позиции В1, С1, D1, Е1, которые выделены прямоугольником, соответствуют димерам ссДНК, что определено на основе вычисления объемов вышеупомянутых молекул, все другие позиции – единичным молекулам. Наименее компактизованные молекулы приведены в поз. А1-А3, самые компактизованные – в поз. Е1-Е3. В поз. А3 приведено изображение ссДНК рGEMEX, иммобилизованной на свежесколотой слюде с ионами Mg^{2+} . Молекулы ссДНК рGEMEX, иммобилизованные на стандартной аминослюде (поз. А1, А2) с высоким значением поверхностной плот-

ности заряда по сравнению со свежесколотой слюдой, имеют другой вид. Они похожи на плектонемичные молекулы ДНК, но являются более компактизованными, т.е. локализованными на меньшей площади субстрата.



Рис. 14. АСМ-изображения суперспиральной ДНК рGEMEX с разной длиной оси суперспирали. ДНК иммобилизована на свежесколотой слюде из буфера, содержащего ионы Mg^{2+} (a), и на модифицированной аминослюде (б-г). (a) Длина оси суперспирали составляет $l = 466 \pm 5$ нм (для обеих молекул), $\sigma = -0,024$. (б) l = 567 нм, $\sigma = -0,13$; молекула содержит 19 узлов. Черной и белой стрелками показаны фрагменты ДНК, которые соответствуют разошедшимся нитям двухцепочечной ДНК и их пересечению соответственно. (в) Сверхсуперспиральная ДНК, характеризующаяся осью суперспирали второго порядка длиной l = 279 нм и числом узлов, равным семи. (г) Сверхсуперспиральная ДНК, длина оси суперспирали третьего порядка которой составляет l = 140 нм. Верхняя граница приведенной шкалы градаций цвета, соответствующая значению высоты объекта на АСМ-изображении, составляет: (а) – 5 нм, (б) – 7 нм, (г) – 8 нм

При переходе к модифицированной аминослюде, которая характеризуется значительно большей поверхностной плотностью заряда по сранению со стандартной аминослюдой, наблюдается несколько вариантов компактизации ссДНК. На первом этапе возрастает количество узлов и образуются сверхсуперспиральные молекулы ДНК (ВЗ), т.е. своеобразные жгуты (рис. 14б). Количество узлов для данной молекулы составляет n = 19 и, как следствие, значение плотности супервитков σ = -0,13. Количество узлов в молекуле было рассчитано визуально из АСМ-изображения (белая точка, или пятно, на АСМ-изображении соответствует узлу), а также с помощью построения профилей сечения молекулы. Во втором варианте молекула

ДНК была разбита на несколько фрагментов, для каждого из которых построено продольное сечение молекулы по высоте плоскостью, перпендикулярной плоскости рисунка. Характер профиля поперечного сечения и значения высоты локально разошедшихся нитей молекулы свидетельствуют о том, что жгутообразная структура образована единичной молекулой ссДНК.

Нами также визуализированы молекулы ДНК, которые имеют значительно меньшую длину оси суперспирали – l = 279 нм (рис. 14в) и l = 140 нм (рис. 14г). Поскольку объем обеих молекул совпадает с объемом единичной молекулы ДНК рGEMEX, можно предположить, что молекула с l = 279 нм (рис. 14в) образована в результате складывания вдвое молекулы с l = 567 нм (рис. 12б), а молекула с длиной оси l = 140 нм (рис. 14г) – складыванием вдвое молекулы с длиной оси l = 279 нм (рис. 14в). Таким образом, при иммобилизации молекул ссДНК на поверхности аминослюды с повышенной плотностью аминогрупп визуализированы сверхсуперспиральные ДНК, образующие оси суперспирали второго (рис. 14в) и третьего порядка (рис. 14г), длина которых приблизительно в два и четыре раза меньше, чем длина оси суперспирали первого порядка (рис. 14б) соответственно.

Компактизация на модифицированной аминослюде происходит не только для единичных молекул ДНК, но и для олигомеров. Молекулы, АСМ-изображения которых показаны в поз. В1, С1, D1, E1 (рис. 13), образуют димеры, что определено нами на основе вычисления их объемов. Сначала две плектонемичные молекулы (А1, А2) образуют жгутообразные структуры (В1). В дальнейшем возможно формирование тороида (С1, D1) или жгута (Е1), длина суперспиральной оси которого составляет четверть контурной длины релаксированной молекулы. Позиция D2 также соответствует тороиду, образованному двумя молекулами сверхссДНК.

Возвращаясь к схеме компактизации ДНК (рис. 13), отметим, что на втором этапе жгутообразная молекула (В3) складывается вдвое – длина суперспиральной оси уменьшается в два раза (С3, В2, С2, рис. 14в). На этом этапе возможно как дальнейшее формирование жгутов (С3), так и образование тороидов (С2). На третьем этапе образуются более короткие жгуты с еще вдвое меньшей длиной суперспиральной оси $l \sim 140$ нм (D2). Кроме того, возможно формирование минитороида (D3) как из тороида (С2), так и из жгутовидной молекулы (С3). На четвертом этапе дальнейшая компактизация тороидов и жгутов ведет к возникновению полусфероидов (Е2) и сфероидов. Интересно отметить, что минитороиды возникают как группами, так и единичными структурами.

Стараясь ответить на вопрос, почему разные молекулы ДНК компактизованы до разного уровня, можно предположить, что (i) на поверхности модифицированной аминослюды протонированные аминогруппы локализованы неоднородно; (ii) наиболее компактизованные структуры – сфероиды и полусфероиды – образуются на участках модифицированной аминослюды с максимальной плотностью активных аминогрупп.

Локализация морфологически близких форм ссДНК (минитороидов, жгутоподобных молекул с длиной оси суперспирали $l \sim 570$ нм и $l \sim 280$ нм) на участках слюды размером ~ 500 нм × 500 нм указывает на то, что поверхностная плотность заряда модифицированной аминослюды варьирует. А наличие такого градиента плотности заряда служит причиной разного экранирования фосфатных групп ДНК и, как следствие, образования вариантов компактизованных морфологично отличающихся ссДНК. Кроме того, исследуемый образец ДНК содержит набор топоизомеров, характеризующихся разной плотностью супервитков. В случае, если характерное время компактизации ДНК имеет близкое значение ко времени достижения молекулами ДНК поверхности аминослюды, топоизомеры с разным количеством супервитков могут конденсироваться в агрегаты с разным уровнем компактизации.

Таким образом, предложенная модель компактизации ДНК демонстрирует, что в условиях высокой поверхностной плотности заряда субстрата, на котором иммобилизованы молекулы ДНК, возможна значительная компактизация не только димеров, тримеров ДНК, но и единичных молекул ДНК с поэтапным складыванием молекул вдвое и формированием осей суперспирали второго и третьего порядков. Одной из причин продольного сжатия и внутримолекулярной компактизации ДНК может быть увеличение эластичности ДНК при повышении уровня нейтрализации фосфатных групп (именно это предусматривает теория Manning, 1978, а подтверждено экспериментально Podesta et al., 2005).

Модификация и функционализация зондов и субстратов для атомно-силовой микроскопии. Поверхностные свойства стандартной аминослюды были охарактеризованы двумя методами – (i) атомно-силовой микроскопией в режиме силовых измерений и (ii) визуализацией линейных и суперспиральных молекул ДНК, адсорбированных на аминослюде. Режим силовых измерений контактного варианта АСМ был использован для характеристики аминослюды и аминозондов, а также аминозондов, функционализованных молекулами ДНК, глютаральдегида, гомобифункциональными линкерными агентами и бычьего сывороточного альбумина путем определения силы адгезии и работы силы адгезии между взаимодействующими поверхностями. Один цикл силовых измерений состоит из двух этапов: (i) сближения поверхностей зонда и субстрата при перемещении сканера от некоторого заданного положения относительно оси Z до положения Z = 0 и (ii) их последующего удаления от положения сканера Z = 0 до заданного значения Z. При этом записывают два силовых графика, соответствующих сближению зонда и субстрата с расстояния Z = 90-180 нм до Z = 0 нм и последующему их удалению (рис. 15). Характер обоих силовых графиков для пар поверхностей аминомодифицированная слюда – зонд и свежесколотая (немодифицированная) слюда – зонд в буферных растворах при разных ионных условиях указывает на особенности межмолекулярных сил между взаимодействующими поверхностями зонда и субстрата.

Аминогруппы, покрывающие поверхность слюды после ее модификации с помощью АПТЭС, положительно заряжены при pH 7,6. Это приводит к адгезивному эффекту между положительно заряженной аминослюдой и отрицательно заряженным зондом (рис. 15б) благодаря электростатическому взаимодействию между аминогруппами модифицированной слюды и гидроксигруппами зонда. Сила адгезии между аминослюдой и зондом уменьшается в 1,5-2 раза при возрастании ионной силы в 10 раз (рис. 15в) с последующим еще более значительным экранированием заряда аминогрупп при pH 11,2 (рис. 15г). Кроме стандартной аминослюды (АП1-слюды) аналогичные силовые измерения с теми же самыми кантилеверами были проведены для АП2-слюды (время обработки которой в парах АПТЭС составляло 2 часа при сохранении всех других параметров протокола модификации), для которой было найдено возрастание силы адгезии и, следовательно, поверхностной плотности положительного заряда по сравнению с АП1-слюдой. Мы проверили значительное количество протоколов аминомодификации слюды и нитрида кремния в парах АПТЭС, но наивысшее качество АСМ-изображений плектонемичной суперспиральной ДНК было достигнуто для стандартной и модифицированной аминослюды. Отметим, что нам также не удалось получить качественные АСМизображения ДНК, иммобилизованной на АП2-слюде. Этот факт наглядно демонстрирует чрезвычайную зависимость качества АСМ-изображения ДНК, адсорбированной на слюде, даже от небольших изменений протокола модификации слюды.



Рис. 15. Силовые графики, или зависимости "отклонение зонда – расстояние", для пар взаимодействующих поверхностей, аминомодифицированная слюда – зонд и немодифицированная свежесколотая слюда – зонд в водных растворах при разных ионных условиях: а – свежесколотая слюда - зонд, ТЕ буфер; (б-г) – аминослюда - зонд;

б – ТЕ буфер, рН 7,6; в – 10×ТЕ буфер, рН 7,6; г – 7 мМ NaOH, рН 11,2

Преимущества объединения методики иммобилизации ДНК на аминослюде с возможностями ACM (над традиционными методами электронной и криоэлектронной микроскопии) позволили нам визуализировать такую неканоническую структуру, как крест, образованный инвертированными повторами, суперспиральной ДНК pUC8. Изображение ссДНК pUC8 на стандартной аминослюде, полученное с помощью вибрирующего варианта ACM в воздухе (рис. 16), показывает, что крест выглядит как резко очерченные выступы на нити ДНК с длиной плеч (т.е. шпилек), которую можно оценить непосредственно из ACM-изображения. Анализ наших экспериментальных результатов показывает, что в образовании шпильки участвует 11-12 пар нуклеотидов, а термодинамический анализ инвертированных повторов подтвердил, что крест образован 52 нуклеотидами. Для сравнения отметим, что палиндромные участки, в которых с помощью методов двумерного электрофореза и обработки нуклеазами были зарегистрированы крестообразные структуры в ДНК фага ϕ X 174, плазмидах pBR322, ColE1, pAO3, составляют 9-13 п.н. в спиральных участках каждой из шпилек креста, а их петли содержат 3-5 нуклеотидов (Lilley, 1980; Lyamichev et al., 1984). Свободная энергия ∆G шпильки, образующей крест в ДНК рUC8, составляет -17,8 ккал/моль.

С целью выяснения связи между шпилечными структурами (которые были визуализированы нами для плазмиды pUC8 в виде образованного ими креста) и вирулентностью микроорганизмов, нами были исследованы два изолята патогенных микобактерий туберкулеза с полностью секвенированным геномом – лабораторный штамм *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и высокопатогенный изолят CDC1551. Было обнаружено, что оба изолята содержат по 8 длинных инвертиро-



Рис. 16. АСМ-изображение суперспиральной плазмиды pUC8 (длина составляет 2665 п.н.) в воздухе. Размер кадра: (а) – 858 нм × 858 нм; (б) – 372 нм × 372 нм; (в) – 134 нм × 134 нм. Стрелками показана крестообразная структура

ванных повторов длиной 48-62 нуклеотида, образующих термодинамически стабильные шпильки со свободной энергией $\Delta G = -38,9 - -56,2$ ккал/моль, а положение 6 шпилек полностью совпадает. В то же время в геноме CDC1551, в отличие от H37Rv, на 5'-конце (матричной цепи ДНК) локализована высокостабильная шпилька длиной 58 нуклеотидов. Предполагается, что локализация высокостабильной шпильки с $\Delta G = -53,9$ ккал/моль в области 5'-конца матричной цепи ДНК изолята CDC1551 может приводить к разной степени стабилизации РНК-транскриптов или разной эффективности терминации транскрипции для РНК-полимеразы штамма CDC1551 по сравнению с изолятом H37Rv. Это, в свою очередь, несмотря на то, что степень подобия ДНК двух изолятов микобактерий составляет свыше 98 %, может служить одной из причин разной вирулентности штаммов.

С целью визуализации биообъектов непосредственно в физиологической среде были исследованы интактные цианобактерии и определены их линейные размеры. Для увеличения силы взаимодействия клетка – субстрат цианобактерии Synechocystis PCC 6803 были иммобилизованы на стандартной аминослюде в TES буфере. Из ACM-изображений определено, что средний размер цианобактерий в буферном растворе составляет приблизительно 70 нм × 90 нм, а их высота равна ~ 20 нм.

Модификация зондов аминогруппами, как и в случае аминомодификации слюды, приводит к появлению пика на графике удаления зависимости сила – расстояние (рис. 17).

После аминомодификации зондов в парах АПТЭС, как и для аминослюды, возникает значительная (до 4,6 нН) сила адгезии. Этот адгезивный эффект, как и для аминомодифицированной слюды, обусловлен, в основном, электростатическим взаимодействием между положительно заряженными аминогруппами зонда и отрицательно заряженными силанольными группами слюды. Наши данные показывают, что увеличение ионной силы в 10 раз приводит к уменьшению силы адгезии между аминозондом и слюдой в 1,7-2 раза. Разброс значений сил адгезии может быть объяснен разным радиусом закругления зондов, а также образованием на их поверхности аминослоев с различной плотностью аминогрупп.



Рис. 17. Зависимости отклонение зонда – расстояние для пары поверхностей аминозонд – свежесколотая слюда в водных растворах: а – силовые графики в ТЕ буфере; б – в 10× ТЕ буфере; в – при рН 11,2

На следующем этапе аминомодифицированные АСМ-зонды были функционализованы, т.е. было подтверждено, что аминогруппы аминозондов являются реакционными, и они могут быть конъюгированы с биомолекулами при использовании хорошо известной химии иммобилизации аминов. Для функционализации аминозондов были использованы нековалентное связывание ДНК и ковалентное взаимодействие с глютаральдегидом (ГА). Ковалентное связывание аминогрупп аминозонда с карбонильными группами ГА приводит к образованию Шиффового основания (Кпарр, 1991). В результате происходит уменьшение поверхностной плотности положительного заряда аминозонда и, следовательно, силы адгезии для системы аминозонд + ГА – слюда.

Взаимодействие отрицательно заряженных фосфатных групп молекул ДНК с положительно заряженными аминогруппами аминозонда приводит к их нейтрализации и исчезновению эффекта адгезии. В этом случае силовые кривые для аминозонда с иммобилизованной ДНК в ТЕ буфере подобны силовым графикам для пары немодифицированный зонд – свежесколотая слюда. Силовые графики аминозонд + ДНК в ТЕ буфере, записанные с интервалом в несколько секунд, показывают, что молекулы ДНК, которые адсорбированы на аминозонде, являются лабильными: под влиянием приложенной силы появляются один или несколько пиков адгезии (рис. 18). В процессе силовых измерений эти пики могут исчезать и появляться снова. Нековалентное связывание аминозонд – ДНК и ковалентное взаимодействие аминозонд – глютаральдегид показали возможность функционализации модифицированных аминозондов, что может найти применение в исследованиях структурных особенностей поверхностей клеток, определении их микромеханических свойств, мониторинге клеточной динамики in vitro.

Силовые графики системы аминозонд – аминослюда демонстрируют наличие значительного адгезивного эффекта, несмотря на то, что обе поверхности несут суммарный позитивный заряд. Существенно более высокое значение работы сил адгезии (т.е. площади под кривой отдаления) для пары аминозонд – аминослюда при приблизительно одинаковом пиковом значении силы адгезии с парой аминозонд – слюда указывают на образование значительно большего количества межмолекулярных связей между аминозондом и аминослюдой по сравнению с парой поверхностей аминозонд – слюда.



Рис. 18. Зависимости отклонение зонда – расстояние для аминомодифицированного зонда, функционализованного ДНК. (а, б) – аминозонд + ДНК – свежесколотая слюда, ТЕ буфер. Графики записаны с интервалом в несколько секунд

С целью выяснения механизма иммобилизации ДНК на модифицированной аминоповерхности нами были получены изображения ДНК на аминослюде при высокой ионной силе I = 900 мМ Na⁺ и pH 9. Несмотря на элиминацию электростатических сил взаимодействия между аминогруппами на поверхности слюды и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК при I = 900 мМ Na⁺, на поверхности аминослюды все еще существуют сайты для связывания нуклеиновых кислот. Эти данные позволяют предположить, что в связывании молекул ДНК как с аминоповерхностью модифицированного зонда, так и с поверхностью модифицированного зонда, так и с поверхности с электроотрицательными сайтами ДНК. Поскольку вандерваальсовые силы не зависят от pH (Butt, 1991), взаимодействие ДНК с аминозондом (как и в случае аминослюды при pH 9, I = 10 мМ Na⁺), по нашему мнению, обусловлено суперпозицией электростатических и вандерваальсовых сил.

На основе методики аминомодификации ACM-зондов разработана общая схема их функционализации и получены зонды, функционализованные бычьим сывороточным альбумином (БСА), которые могут быть использованы для изучения процессов молекулярного узнавания (рис. 19). Процедура модификации и функционализации ACM-зонда включает три этапа. Сначала путем модификации в парах производного аминосилана был получен аминозонд, с поверхностными аминогруппами которого на втором этапе взаимодействовал аминореакционный гомобифункциональный линкер. На заключительном этапе зонд с ковалентно присоединенным линкером ДСС был функционализован молекулами БСА. Полученные ACM-зонды были охарактеризованы на разных этапах модификации с помощью ACM в режиме силовых измерений (как после каждого этапа модификации, так и только для зонда с присоединенным БСА) – из силовых графиков (рис. 20) определена сила адгезии и работа силы адгезии.

Поскольку поверхности модифицированного и функционализованного зондов по своим свойствам подобны поверхностям модифицированной и функционализованной слюды соответственно, процесс функционализации был также охарактеризован путем визуализации молекул ДНК и БСА, иммобилизованных на модифицированной и функционализованной слюде. Отличительной особенностью аминомодификации зонда с помощью АПТЭС (рис. 19) является то, что одна молекула АПТЭС взаимодействует с тремя поверхностными ОН-группами зонда. Тем самым количество аминогрупп на поверхности зонда, обработанного АПТЭС, может быть существенно меньше, чем для зонда, обработанного, например, с помощью этаноламина с последующим образованием самоассоциированных монослоев (Reiner et al., 2003).



Рис. 19. Схема функционализации зондов для атомно-силовой микроскопии. (а) Немодифицированный АСМ-зонд.

АСМ-зонд, модифициро-**(б)** аминогруппами. ванный Ha первом этапе в результате обработки в парах производного аминосилана (АПТЭС) поверхность зонда модифицирована ковалентно присоединенными аминогруппами. (в) Зонд, поверхность которого содержит ДСС-линкер, имеющий свободный аминореакционный конец (NHS-эфир). На втором этапе аминогруппы аминозонда реагируют с NHS-эфирной группой гомобифункционального аминореакционного ДССлинкера. (г) Зонд с ковалентно присоединенными молекулами

бычьего сывороточного альбумина (БСА). На третьем этапе аминореакционные группы ДСС-линкера взаимодействуют с лизиновыми остатками БСА

Использование гомобифункционального аминореакционного линкерного агента также направлено на уменьшение количества молекул-рецепторов на поверхности зонда. Возможным является вариант, при котором один аминореакционный конец линкера (NHS-эфир) взаимодействует с аминогруппой зонда, а второй конец остается свободным – с этим реакционным концом линкера могут взаимодействовать аминогруппы лизиновых остатков БСА. Однако также возможно связывание обоих NHS-концов линкера с аминогруппами зонда, что уменьшает количество свобод-

ных аминогрупп на поверхности аминозонда.

Визуализация комплексов ДНК – Т7 РНК-полимераза при элонгации транскрипции. Для исследования структуры комплексов Т7 РНК-полимераза – ДНК иммобилизацию биомолекул проводили на свежесколотую слюду с добавлением ионов магния. ДНК-матрица для транскрипции была сконструирована таким образом, что содержала промотор и область терминации транскрипции Т7 РНКП асимметрично локализованными на концах ампликона длиной 1414 п.н. (его контурная длина составляла 435 ± 15 нм).

В процессе транскрипции образуются элонгационные комплексы, которые характеризуются типичными изгибами для комплексов ДНК – белок (рис. 21). Транскрипцию можно рассматривать как своеобразное сканирование ДНК-матрицы



Рис. 20. Силовые графики аминомодифицированного зонда после (а) функционализации аминореакционным гомобифункциональным ДСС-линкером и (б) иммобилизации бычьего сывороточного альбумина

РНК-полимеразой. Направление сканирования задается последовательностью промотора в матричной цепи ДНК (Milligan, 1987). Но для поиска промотора и исключения возможности пропуска сайта промотора такой высокоточной "машиной", которой является РНКП, по нашему мнению, этот молекулярный мотор начинает сканирование с одного из концевых фрагментов ДНК. Именно этим обстоятельством мы объясняем довольно значительное количество визуализированных концевых комплексов, или комплексов, которые предшествуют образованию комплексов инициации транскрипции. Наши предположения согласуются с экспериментальными результатами по АСМ-визуализации диффузии РНКП во время поиска промотора (Guthold, 1999) и моделью перемещения белка вдоль ДНК (быстрого переноса белка между разными фрагментами ДНК с помощью механизмов одномерной диффузии и слабого неспецифичного связывания) (Berg, 1981).

Отметим, что при взаимодействии молекулы ДНК с Т7 РНКП образуются специфичные и неспецифичные комплексы. Специфичное связывание (взаимодействие с промотором) является относительно нечувствительным к изменению ионной силы раствора, но оно зависит от конформации фрагмента ДНК. Неспецифичные комплексы ДНК – Т7 РНКП образуются за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных остатков полимеразы с отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Среди довольно большого массива проанализированных комплексов ДНК – Т7 РНКП (свыше 200) были визуализированы комплексы, образованные полимеразой именно с терминальными (т.е. концевыми) фрагментами ДНК (около 30 комплексов). Типичные АСМ- и трехмерное изображения таких комплексов приведены на рис. 22. Наличие нескольких молекул Т7 РНКП, образовавших комплекс с единичной молекулой ДНК, подтверждает, что после начала транскрипции одной молекулой Т7 РНКП другая молекула фермента может связаться с терминальным фрагментом ДНК-матрицы, локализованным вблизи промотора Т7 РНКП, для проведения последующей преинициации и элонгации транскрипции.



Рис. 21. АСМ-изображения комплексов Т7 РНКП и ДНК. Молекулы Т7 РНКП выглялят как сферы диаметром около 8 нм. Белые стрелки указывают на комплексы, образованные молекулами **T7** РНКП и ДНК, а черные – на РНКтранскрипты. Транскрипция проведена при комнатной температуре в течение 60 мин. Размер кадра: (a) - 348 нм × 348 нм; (б) - 306 нм × 306 нм; (в) – 298 нм × 298 нм; (г) – 299 нм × 299 нм. Контурная длина молекул составляет: (а) – 445-450 нм, (б) – 454-457 нм

В области терминации транскрипции несколько молекул Т7 РНКП могут быть связаны с ДНК-матрицей (показано черной стрелкой на рис. 22). Эти данные согласуются с результатами работы Epstein et al. (2003), в которой показана возможность объединения молекул РНКП в процессе элонгации транскрипции – большинство внутренних и внешних блоков транскрипции (сигналов паузы и остановки) исчезают, если больше чем одна молекула РНКП инициирует транскрипцию с одного и того же промотора. Наоборот, при проведении именно единичного цикла транскрипции наличие внутренних терминаторов существенно влияет на скорость элонгации и выход полноразмерных транскриптов.

Нами визуализированы и РНК-транскрипты, образовавшиеся после проведения транскрипции. О том, что в результате транскрипции синтезируются РНК-транскрипты ожидаемой длины, свидетельствовало наличие соответствующей полосы на электрофореграмме после проведения электрофореза в денатурирующих условиях продуктов транскрипции. РНК-транскрипты выглядят как конденсированные



Рис. 22. АСМ-изображение (а) и трехмерное изображение (б) комплексов, образованных молекулой Т7 РНК-полимеразы с терминальными фрагментами ДНК-матрицы. Белая стрелка указывает на комплекс инициации, а черная – на комплекс в области терминации транскрипции. (а) – размер кадра – 297 нм × 297 нм. Приведена шкала градаций серого цвета, которая соответствует диапазону высоты от 0 до 5 нм. Транскрипцию проводили в течение 65 мин. при T = 31 °C

структуры, как и в предыдущих исследованиях по ACM-визуализации PHK (Hansma, 1999), поскольку, по нашему мнению, для визуализации вытянутых неконденсированных молекул PHK необходимо изменить поверхностные свойства субстрата (слюды).

выводы

В диссертации представлено новое решение научной проблемы молекулярных механизмов компактизации суперспиральной ДНК при иммобилизации на субстрате под влиянием его поверхностных свойств путем разработки подходов к визуализации и наноманипулированию единичными молекулами. На основе обобщения данных, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии (ACM), полимеразной цепной реакции, доказано, что ДНК является эластичной молекулой, которая может быть не только растянута, но и сжата, подобно пружине, а также установлено, что молекулы ДНК компактизуются до уровня сфероидов через три этапа последовательного складывания вдвое с уменьшением длины оси суперспирали, т.е. с образованием осей суперспирали второго и третьего порядков.

1. Впервые разработана технология получения аминослюды, субстрата для иммобилизации биополимеров для исследований с помощью атомно-силовой микроскопии, с заданными свойствами – регулируемой гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Наряду с известной стандартной аминослюдой, полученной модификацией в парах аминосилана, за счет варьирования условий модификации слюды получена модифицированная аминослюда как с повышенными гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп, так и с уменьшенными по сравнению со стандартной аминослюдой.

2. Развит новый экспериментальный подход вытягивания молекул ДНК. Вытянутые линейные молекулы ДНК фага λ и вытянутые суперспиральные молекулы ДНК рGEMEX визуализированы на поверхности аминослюды с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп. Определенное непосредственно из АСМ-изображения увеличение контурной длины вытянутых суперспиральных молекул ДНК рGEMEX длиной 3993 п.н. означает, что молекулы ссДНК были вытянуты в 1,5-1,7 раза по сравнению с В-формой ДНК, что привело к увеличению расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали до H = 4,87 – 5,36 Å соответственно.

3. Доказано, что ДНК представляет собой своеобразную молекулярную пружину – молекула ДНК может быть не только вытянута, но и сжата. На модифицированной аминослюде наряду с плектонемично суперспиральными молекулами ДНК были визуализированы единичные молекулы с чрезвычайно высоким уровнем компактизации, степень суперспирализации которых значительно выше по сравнению с ранее достигнутыми экспериментально и рассмотренными теоретически. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали для этих суперспиральных молекул ДНК изменялось в диапазоне 1,94 Å < H < 2,19 Å. Такие сжатые суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием вдоль оси дуплекса по сравнению с известными формами ДНК были отнесены к новой форме ДНК – S-ДНК, для которой построена модель и определен наклон оснований. Важно, что при этом образуются как левые, так и правые сверхсуперспиральные молекулы ДНК.

4. Визуализацией линейных и суперспиральных молекул ДНК на четырех субстратах с разными поверхностными свойствами доказано, что сжатие молекул ДНК обусловлено поверхностными свойствами субстрата – высокой гидрофобностью и плотностью заряда модифицированной аминослюды.

5. Впервые визуализированы этапы компактизации единичных молекул суперспиральной ДНК рGEMEX, иммобилизованных на модифицированной аминослюде. Показано, что компактизация единичных молекул происходит в три этапа последовательного складывания пополам с уменьшением длины оси суперспирали, т.е. с образованием осей суперспирали второго и третьего порядков.

6. Впервые визуализированы полусфероиды и сфероиды – структуры, образованные единичными суперспиральными молекулами ДНК, – и показано, что тороиды также могут быть образованы единичными молекулами ДНК. На основе анализа полученных изображений предложена модель возможных конформационных переходов суперспиральной ДНК *in vitro* в отсутствии протеинов при возрастании уровня компактизации ДНК. Компактизация единичных суперспиральных молекул ДНК обусловлена экранированием отрицательно заряженных взаимно отталкивающихся фосфатных групп ДНК положительно заряженными аминогруппами аминослюды. 7. Показано, что новый метод характеризации субстратов, основанный на визуализации конформации плектонемично суперспиральных молекул ДНК, является чрезвычайно информативным даже по сравнению с АСМ в режиме силовых измерений, поскольку позволяет получить дополнительную информацию о поверхностных свойствах субстрата, на котором иммобилизованы молекулы ДНК. Визуализирована крестообразная структура суперспиральной ДНК pUC8 и показано, что размер стебля ее шпильки составляет 11 пар нуклеотидов, а петля содержит 4 нуклеотида.

8. Впервые разработана методика получения аминомодифицированных АСМ-зондов в газовой фазе в отличие от существующего подхода аминомодификации в растворе. С помощью АСМ в режиме силовых измерений показано, что значения силы адгезии для пары поверхностей аминозонд – слюда (как и для пары стандартная аминослюда – зонд) уменьшались в ряду I = 10 мМ Na⁺ \rightarrow I = 100 мМ Na⁺ \rightarrow pH 11,2. Модифицированные аминозонды были функционализованы посредством нековалентного связывания с ДНК и ковалентного взаимодействия с глютаральдегидом.

9. Разработана схема функционализации АСМ-зондов протеинами и проведена их функционализация бычьим сывороточным альбумином (БСА). Модифицированные аминозонды с ковалентно присоединенным аминореакционным линкером и БСА были охарактеризованы путем силовых измерений – определены значения силы адгезии и работы силы адгезии как после каждого этапа функционализации, так и только для зонда с присоединенным БСА.

10. Визуализированы РНК-транскрипты (в виде жгутообразных конденсированных структур) и комплексы, которые образует РНК-полимераза (РНКП) бактериофага Т7 с ДНК-матрицей (которая содержит промотор и терминатор транскрипции Т7 РНКП) в процессе транскрипции. Показано, что на одной молекуле ДНК-матрицы 2-3 молекулы Т7 РНКП одновременно образуют как комплексы с концевыми фрагментами ДНК-матрицы, так и комплексы в процессе элонгации транскрипции и в области терминации.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в периодических научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук

1. *Лиманский А.П.* Визуализация крестообразной структуры суперспиральной ДНК посредством атомно-силовой микроскопии // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 6. – С. 1039-1043.

Limanskii A.P. Visualization of cruciform structure in supercoiled DNA by atomic force microscopy. – Biophysics 2000, V. 45, № 6: 1007-1011.

2. Лиманский А.П. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и

белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 6. – С. 531-542.

3. *Лиманский А.П.* Визуализация ампликонов после проведения полимеразной цепной реакции // Биофизика. – 2005. – Т. 50, № 6. – С. 1019-1024.

Limanskii A. Visualization of amplicons after polymerase chain reaction. – Biophysics 2005, V.50, 6: 879-883.

4. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* S-форма ДНК – суперспиральная ДНК с 1.94 – 2.19 Å расстоянием между парами оснований вдоль оси дуплекса // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 122-136.

Limanskaya L., Limanskii A. S-DNA is oversupercoiled with DNA 1.94 – 2.19 Å rise per nucleotide. – Molecular Biology 2006, V. 40, № 1: 107-120.

(https://commerce.metapress.com/content/n7p727u770m33185/resource-secured/?target=fulltext.pdf&sid=sz0cux55jyqorq332nhj2i55&sh=www.springerlink.com

5. *Лиманский А.П.* Функционализация аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 2. – С. 225-235.

Limanskii A. Functionalization of amino modified probes for atomic force microscopy. – Biophysics 2006, V. 51, 2: 186-195.

6. *Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминослюде // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 32, № 5. – С. 494-510.

Limanskaya L,, Limanskii A. Compaction of single supercoiled DNA molecules adsorbed onto amino mica. – Russian Journal of Bioorganic Chemistry 2006, V. 32, № 5: 444-459.

7. *Лиманский А.П.* Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, иммобилизованных на аминослюде: от дуплекса к минитороидальной и сферической конформации // Биофизика. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 252-260.

8. *Лиманский А.П., Лиманская О.Ю., Волянский Ю.Л.* Компьютерный анализ инвертированных повторов в геноме микобактерий туберкулеза // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 5. – С. 48-52.

Статьи в других периодических изданиях, материалах конференций и сборниках научных трудов

9. Лиманский А.П., Лиманская О.Ю. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и клеток до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Биологический вестник. – 2001. – Т. 5, № 1-2. – С. 124-132 (укр.).

10. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // Биополимеры и клетка. – 2001. – Т. 17, № 4. – С. 292-297.

11. *Лиманский А.П., Лиманская О.Ю*. Изучение геномной ДНК микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 30-36 (укр.).

12. Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y. Aminomodi-

fied probes for atomic force microscopy // Probe Microscopy. – 2002. – Vol. 2, № 3-4. – P. 227-234.

13. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированных зондов для атомносиловой микроскопии биомолекул // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18, № 1. – С. 62-70

14. Лиманский А.П. Изучение крестообразной структуры суперспиральной ДНК плазмиды pUC8 с помощью атомно-силовой микроскопии и компьютерного моделирования // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18, № 5. – С. 401-405 (укр.). 15. Лиманский А.П., Лиманская О.Ю. Визуализация цианобактерий в водном растворе с помощью атомно-силовой микроскопии // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 1. – С. 68-71 (укр.).

16. *Лиманский А.П.* Сверхсуперспирализация и компактизация суперспиральной ДНК // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 64-71 (укр.).

17. Лиманская О.Ю., Лиманская Л.А., Лиманский А.П. S-форма ДНК – сверхсуперспиральная макромолекула с ~ 2 Å расстоянием между парами нуклеотидов вдоль оси дуплекса // Биополимеры и клетка. – 2005. – Т. 21, № 6. – С. 515-524 (укр.).

18. *Лиманская О.Ю., Лиманская Л.А., Лиманский А.П.* Компактизация суперспиральной ДНК на модифицированной аминослюде // Биополимеры и клетка. – 2006. – Т. 22, № 1. – С. 18-28 (укр.).

19. *Лиманский А.П.* Аминомодифицированные зонды с ковалентно присоединенными молекулами для атомно-силовой микроскопии // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 70-80 (укр.).

(<u>https://commerce.metapress.com/content/4l37213537375625/resource</u>-secured/?tar-get=fulltext.pdf&sid=vaxansv1kcp41q45hdlpsf55&sh=<u>www.springerlink.com</u>)

20. *Лиманский А.П.* Визуализация комплекса ДНК с Т7 РНК-полимеразой с помощью атомно-силовой микроскопии // Биополимеры и клетка. – 2007. – Т. 23, № 1. – С. 3-13 (укр.).

21. *Лиманский А.П.* Визуализация комплексов РНК-полимеразы бактериофага Т7 с ДНК-матрицей при элонгации транскрипции // Укр. биохим. журн. – 2007. – Т. 79, № 1. – С. 94-103 (укр.).

22. *Лиманский А.П.* Визуализация РНК-транскриптов с помощью атомно-силовой микроскопии // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 12-18 – (укр.).

23. Пат. 13571Украина, МПК С12Q 1/04, С12Q 1/68. Способ модификации слюды, субстрата для атомно-силовой микроскопии: Пат. 13571 Украина, МПК С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманский А.П., Лиманская О.Ю., Волянский А.Ю., Руденко С.С., Драч М.И., Лиманская Л.А., Климов А.И. (Украина); Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины. – № 200508247; Заявл. 22.08.2005; Опубл. 17.04.2006. – 14 с. (укр).

24. Пат. 17942 Украина, МПК С12Q 1/04, С12Q 1/68. Способ вытягивания линейных суперспиральных молекул ДНК: Пат. 17942 Украина, МПК С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманский А.П., Лиманская О.Ю., Волянский А.Ю., Руденко С.С., Драч М.И., Лиманская Л.А., Климов А.И. (Украина); Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины. – № 200604603; Заявл. 25.04.2006; Опубл. 16.10.2006. – 8 с. (укр.).

25. Пат. 17981 Украина, МПК С12Q 1/04, С12Q 1/68. Способ сжатия линейных и суперспиральных молекул ДНК: Пат. 17981 Украина, МПК С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманский А.П., Лиманская О.Ю., Волянский А.Ю., Руденко Л.М., Кучма И.Ю., Лиманская Л.А., Пугач Н.Б. (Украина); Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины. – № 200604883; Заявл. 03.05.2006; Опубл. 16.10.2006. – 8 с. (укр.).

26. *Limansky A., Limanskaya O., Kamensky Yu., Vovk O., Vashchenko L.* Study of fullerene structure by scanning tunneling microscopy // Proc. 185th Meeting of The Electrochemical Society. – 1994. – San Francisco (USA). – P. 215-216.

27. *Limansky A*. Chemical force microscopy of aminomodified AFM tips and substrates // Proc. International Symp. "Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures". – 2001. – Tokyo (Japan). – P. 85.

28. *Limansky A*. Imaging of cruciform structure in supercoiled DNA by atomic force microscopy // Proc. International Symp. "Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures". – 2001. – Tokyo (Japan). – P. 86.

29. *Limansky A*. Imaging of linear and supercoiled nucleic acids in air and cells in aqueous solution by atomic force microscopy // Конф. для молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике. – 2001. – Киев (Украина). – С. 106.

30. *Lymanskiy A*. Cruciform structure in supercoiled DNA: imaging by atomic force microscopy and computer modeling // Proc. 8th International Symp. on Molecular Aspects of Chemotherapy. – 2001. – Gdansk (Poland). – P. 192.

31. *Lymanskiy A*. Atomic force microscopy aminomodified tips and substrates for DNA immobilization // Proc. 8th International Symp. on Molecular Aspects of Chemotherapy. – 2001. – Gdansk (Poland). – P. 193.

32. *Limanskii A., Limanskaya O.* Inverted repeats: computer analysis of microorganisms genome and imaging of cruciform structure in DNA by atomic force microscopy // Proc. SPIEs First International Symp. on Microtechnologies for the New Millennium. – Maspalomas (Spain). – 2003. – Vol. 5119. – P. 337-348.

33. *Limanskii A., Limanskaya O.* Inverted repeats in microorganisms: comparison of two isolates of Mycobacterium tuberculosis with complete genome and visualization of cruciform structure in plasmid DNA by atomic force microscopy // Proc. 1st FEMS Congress of European Microbiologists. – 2003. – Ljubljana (Slovenia). – P. 442.

34. *Limanskaya O., Limanskii A.* Imaging of S-DNA – new DNA form with ~ 2 Å rise per base pair // Proc. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress. – Montpellier (France). – 2005. – P. 673.

35. *Limanskaya O., Limanskii A.* Compaction of single supercoiled DNA molecules on the modified amino mica // Proc. 15th IUPAB & 5th EBSA International Biophysics Congress. – 2005. – Montpellier (France). – P. 673.

36. *Limanskaya O., Limanskii A.* Imaging stretched and compressed supercoiled DNA // Proc. III International Conference on Hydrogen Bonding and Molecular Interactions. – Kyiv (Ukraine). – 2006. – P. 124.

37. *Limanskaya O., Limanskii A.* Compaction of supercoiled DNA molecules into spheroids // Proc. III International Conference on Hydrogen Bonding and Molecular Interactions. – Kyiv (Ukraine). – 2006. – P. 125.

38. *Limanskii A., Limanskaya O.* Visualizing stretched and compressed single supercoiled DNA molecules // Proc. Optical Spectroscopy of Biomolecular Dynamics II. – Eilat (Israel). – 2006. – P. 64.

39. *Limanskii A., Limanskaya O.* Imaging compacted single supercoiled DNA molecules with different length of superhelix axis // Proc. Optical Spectroscopy of Biomolecular Dynamics II. – Eilat (Israel). – 2006. – P. 52.

АННОТАЦИЯ

Лиманский А.П. Модификация и функционализация зондов и субстратов для нанобиотехнологии. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2007.

Представлены экспериментальные результаты разработки и характеризации модифицированных и функционализированных биополимерами зондов и субстратов для атомно-силовой микроскопии (ACM), а также результаты исследований внутримолекулярной компактизации единичных молекул ДНК при иммобилизации на субстрате под влиянием его поверхностных свойств.

Разработана технология получения аминослюды, субстрата для иммобилизации биомолекул для исследований с помощью атомно-силовой микроскопии, с заданными свойствами – регулируемой гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Наряду с известной стандартной аминослюдой, получаемой модификацией свежесколотой слюды в парах аминосилана, посредством варьирования условий модификации слюды получена модифицированная аминослюда как с повышенной, так и с пониженной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп по сравнению со стандартной аминослюдой.

Разработана технология получения аминомодифицированных АСМ-зондов в газовой фазе в отличие от существующего подхода аминомодификации в растворе. С помощью АСМ в режиме силовых измерений показано, что значения сил адгезии для пары поверхностей аминозонд – слюда (как и для пары стандартная аминослюда – зонд) уменьшались в ряду I = 10 мМ Na⁺ \rightarrow I = 100 мМ Na⁺ \rightarrow pH 11,2. Аминозонды были функционализированы посредством нековалентного связывания с ДНК и ковалентного взаимодействия с глютаральдегидом. Также разработана технология функционализации АСМ-зондов белками и проведена их функционализация бычьим сывороточным альбумином (БСА). Модифицированные аминозонды с ковалентно присоединенным аминореакционным гомобифункциональным линкером и БСА были охарактеризованы путем силовых измерений – определены значения силы адгезии и работы силы адгезии как после каждого этапа функционализации, так и только для зонда с присоединенным БСА.

Развит новый экспериментальный подход вытягивания молекул ДНК. Тянутые

линейные молекулы ДНК фага λ и суперспиральные молекулы ДНК pGEMEX визуализированы на поверхности аминослюды с пониженной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп под действием направленного потока воды. Для тянутых молекул ДНК pGEMEX длиной 3993 п.н. определенное из ACM-изображения посредством измерения контурной длины расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составило H = 4,87 – 5,36 Å.

Доказано, что ДНК представляет собой своеобразную молекулярную пружину – молекула ДНК может быть не только вытянута, но и сжата. На модифицированной аминослюде наряду с плектонемично суперспиральными молекулами ДНК были визуализированы единичные молекулы с чрезвычайно высоким уровнем компактизации, степень суперспирализации которых значительно выше по сравнению с ранее достигнутыми экспериментально и рассмотренными теоретически. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали для таких суперспиральных молекул ДНК изменялось в диапазоне 1,94 Å < H < 2,19 Å. Такие сжатые суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием по сравнению с известными формами ДНК были отнесены к новой форме ДНК – S-ДНК, для которой построена модель и определен наклон оснований. При этом были визуализированы как левые, так и правые сверхсуперспиральные молекулы ДНК. Визуализацией линейных и суперспиральных молекул ДНК на четырех разных субстратах с разными поверхностными свойствами доказано, что сжатие суперспиральных молекул ДНК обусловлено поверхностными свойствами субстрата – высокой гидрофобностью и плотностью заряда модифицированной аминослюды.

Визуализированы этапы компактизации единичных молекул суперспиральной ДНК рGEMEX, иммобилизованных на модифицированной аминослюде. Показано, что компактизация единичных молекул происходит через три этапа последовательного складывания пополам с уменьшением длины оси суперспирали, т.е. с образованием осей суперспирали второго и третьего порядков. Компактизация единичных молекул завершается образованием молекул в сферической конформации. Предложена модель возможных конформационных переходов суперспиральной ДНК *in vitro* в отсутствие протеинов при возрастании уровня компактизации.

Показано, что новый метод характеризации, основанный на визуализации конформации плектонемичных суперспиральных молекул ДНК, является чрезвычайно информативным даже по сравнению с АСМ в режиме силовых измерений, поскольку позволяет получить дополнительную информацию о поверхностных свойствах аминослюды. Визуализирована крестообразная структура суперспиральной ДНК рUC8 и показано, что размер ее шпильки составляет 11 пар нуклеотидов, а петля содержит 4 нуклеотида.

Ключевые слова: суперспиральная ДНК, атомно-силовая микроскопия (ACM), аминослюда, S-ДНК, сверхсуперспирализация, компактизация ДНК, адсорбция ДНК, сфероид, тороид, силовые измерения, функционализация зонда, крестообразная структура.

SUMMARY

Limanskii A.P. Modification and functionalization of probes and substrates for nanobiotechnology. – Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Science in Biology by speciality 03.00.20 – Biotechnology. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2007.

Experimental results are presented on the design and characterization of the modified and functionalized by biopolymers probes and substrates for atomic force microscopy (AFM) and results on the intramolecular compaction of single DNA molecules under influence of surface properties after their immobilization onto substrate. Amino mica (substrate for immobilization of biopolymers) with regulated hydrophobicity and surface charge density and amino modified and functionalized by biopolymers (DNA, bovine serum albumine) AFM probes were obtained and characterized by force measurements mode of AFM. Based on the AFM images obtained, DNA is proved to be a molecular spring that can be stretched and compressed as well. Stretched phage λ linear DNAs and pGEMEX supercoiled DNAs (which were characterized by helical rise per base pair ranged from 4,87 to 5,36 Å), as well as single molecules with an extremely high compaction level (i.e. molecules with a significantly higher superhelix density compared to those previously observed experimentally and estimated theoretically) have been visualized. The distance between nucleotides along the duplex axis for these supercoiled DNA molecules was varied from 1,94 to 2,19 Å. These compressed supercoiled DNA molecules are considered to be a new form of DNA, S-DNA. It was determined that DNA molecules are compacting into spheroids by three stages of subsequent folding in half with decreasing a length of superhelix axis, i.e. by the formation of superhelix axis of second and third orders.

Keywords: supercoiled DNA, atomic force microscopy (AFM), amino mica, S-DNA, oversupercoiling, DNA compaction, DNA adsorption, spheroid, toroid, force measurements, probe functionalization, cruciform structure.