

О. Ю. Лиманская^{1,2}, А. П. Лиманский¹

¹Государственное учреждение “Институт микробиологии и иммунологии
им. И. И. Мечникова НАМН Украины”, 61057 Харьков

²Национальный научный центр “Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины”
НААН Украины, 61023 Харьков

НАНОМАНИПУЛИРОВАНИЕ БИОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК (обзор литературы и собственных исследований)

(Представлено чл.-кор. НАН Украины С. С. Малютой)

Представлены экспериментальные результаты исследований внутримолекулярной компактизации единичных молекул ДНК при иммобилизации на субстрате под влиянием его поверхностных свойств. На основе данных атомно-силовой микроскопии доказано, что ДНК представляет собой своеобразную молекулярную пружину — молекула ДНК может быть не только вытянута, но и сжата. На модифицированной аминокислоте наряду с плектономично 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 от 1,94 Å до 2,19 Å. Такие сжатые суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным межнуклеотидным расстоянием по сравнению с известными формами ДНК были отнесены к новой форме ДНК — суперспиральной 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 аминокислоты. Визуализированы этапы компактизации единичных молекул суперспиральной ДНК *pGEMEX*, иммобилизованных на модифицированной аминокислоте. 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 порядка. 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.

Ключевые слова: суперспиральная ДНК, атомно-силовая микроскопия, компактизация ДНК, адсорбция ДНК, аминокислота, сверхсуперспирализация.

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 более значительные риски возникают в случае невкладывания средств.

Способность молекул ДНК к регулируемой и высокоорганизованной сборке превращает ее в

ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины”

О. Ю. Лиманская — в.н.с. лаборатории специфичной профилактики каплевых инфекций, д.б.н. (olga.limanskaya@mail.ru)

А. П. Лиманский — гл.н.с. лаборатории противомикробных средств, д.б.н.

© О. Ю. Лиманская, А. П. Лиманский 2011.

идеальный материал для нанотехнологии и нанобиотехнологии (области биотехнологии, направленной 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. Проведенные исследования [41] 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 разработано 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 аффинности к ДНК применяли ди- и тривалентные катионы [9,12], природные и синтетические полиамины [11,14,46]. Для визуализации ДНК также были использованы субстраты с напылением золота, на поверхности которого образованы самоассоциированные монослои тиогрупп [21]. Наряду с указанными методами, ввиду наличия у них “узких мест”, были разработаны другие подходы к модификации слюды — обработка производными аminosиланов в растворе и в газовой фазе [36]. 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.

В данной работе рассмотрены вопросы нанобиотехнологии, связанные с манипулированием биополимерами: создание субстратов с регулируемыми поверхностными свойствами, определение путей и молекулярных механизмов компактизации молекул суперспиральной ДНК при иммобилизации на субстрате, а также выяснение структуры линейных и суперспиральных ДНК, иммобилизованных на субстрате.

Материал и методы. В работе использовали линейную ДНК фага λ длиной 48502 пары нуклеотидов (п.н.) фирмы *Promega* (США), линейную и суперспиральную ДНК *pGEMEX* (длина 3993 п.н.; *Promega*).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). 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. АСМ-изображения ДНК были записаны с помощью вибрирующего варианта АСМ в воздухе в режиме “высота” с использованием кантиллеров *OMCL-AC160TS* (*Olympus Optical Co.*, Япония) с резонансной частотой 340–360 кГц и константой жесткости 42 Н/м, а также стандартных незаостренных зондов фирмы *KTEK International* (Россия) с резонансной частотой 300–360 кГц [4].

Модификация субстратов для АСМ. Процедуру получения стандартной аминоклюды осуществляли с помощью модификации свежесколотой слюды аминоклупами в парах перегнанного 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС), полученного от *Aldrich* (США), *United Chemical Technologies, Inc.* (США) и *Wakenyaku* (Япония) [33].

Субстраты для АСМ, которые использовали для иммобилизации биополимеров, можно расположить в порядке возрастания гидрофобности и поверхностной плотности положительного заряда: свежесколотая слюда < аминоклюда с уменьшенной гидрофобностью < стандартная аминоклюда < модифицированная аминоклюда.

Подготовка образцов ДНК для АСМ и полимеразной цепной реакции (ПЦР). На полоску аминоклюды площадью 1 см² наносили 10 мкл раствора ДНК в *TE*-буфере (10 мМ трис-НСl рН 7,9, 1 мМ ЭДТА), после 2-минутной экспозиции промывали деионизованной водой, обдували потоком аргона и 20 мин выдерживали образец под давлением 100 мм рт. ст. [33].

Линейную ДНК *pGEMEX* получали ферментативной обработкой суперспиральной ДНК *pGEMEX* рестриктазой *ScaI* (*New England Biolabs*, Великобритания). Для амплификации фрагмента линейной ДНК использовали ПЦР.

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*, США). Для дальнейшей очистки ампликона от нуклеотидов, праймеров, ДНК-полимеразы и бромистого этидия использовали набор *QIA-quick PCR purification kit* (*QIAGEN*, Япония) в соответствии с рекомендациями производителя, а также экстракцию фенол/хлороформом с последующим переосаждением этанолом.

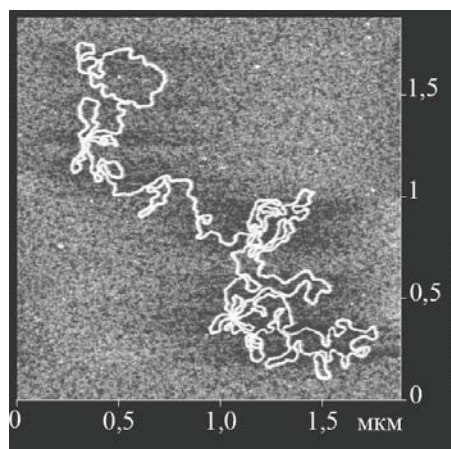
Для проведения ПЦР кроме стандартной *Taq* ДНК-полимеразы (*Promega*, США) использовали термостабильные ДНК-полимеразы высокой точности двух видов — *Pyrobest* ДНК-полимеразу (*TaKaRa Co.*, Япония) и *Invitrogen Platinum* ДНК-полимеразу (*Invitrogen*, Япония).

Результаты и их обсуждение

Визуализация вытянутых молекул ДНК

Поверхность слюды (стандартного субстрата для иммобилизации биомолекул при АСМ-исследованиях) в буферных растворах при нейтральных значениях рН и невысокой ионной силе заряжена отрицательно [13]. Поэтому для иммобилизации на поверхности слюды отрицательно заряженных молекул ДНК используют несколько подходов, позволяющих изменить суммарный поверхностный

Стандартная аминоклюда



Аминоклюда с уменьшенной поверхностной плотностью аминоклуп

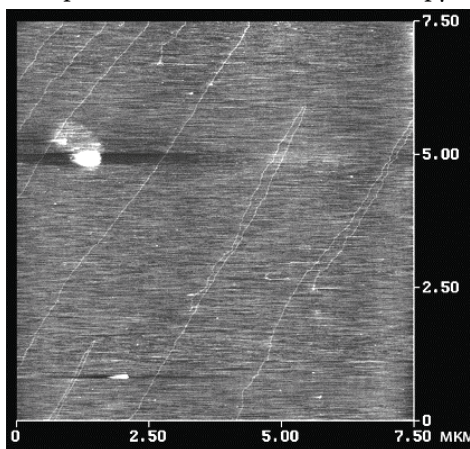


Рис. 1. АСМ-изображения молекул ДНК фага λ , иммобилизованных на стандартной аминоклюде (размер кадра 1,8 мкм \times 1,8 мкм), и на аминоклюде с уменьшенной поверхностной плотностью аминоклуп (размер кадра 7,5 мкм \times 7,5 мкм) [7].

заряд слюды с отрицательного на положительный. Методика приготовления образца ДНК на аминокслоде обеспечивает сильное связывание молекул ДНК с субстратом за счет суперпозиции электростатических и вандерваальсовых сил. При этом иммобилизация молекул ДНК на поверхности аминокслоды в водном растворе осуществляется преимущественно путем электростатического взаимодействия отрицательно заряженных фосфатных групп ДНК и положительно заряженных аминогрупп слюды (рис. 1).

Хорошо известно, что ДНК является эластичной молекулой, которая может быть вытянута, подобно пружине. 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 $H = 5,8 \text{ \AA}$ в отличие от $H = 3,4 \text{ \AA}$ для *B*-ДНК [15,44].

Принимая во внимание известные экспериментальные данные об эластичности молекул ДНК [28] и важность исследования их фундаментальных микромеханических свойств, 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 (см. рис. 1) при экспозиции капли раствора ДНК на поверхности аминокслоды 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 поверхности слюды направленным потоком воды мы использовали как для стандартной, так и для модифицированной аминокслоды с увеличенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Однако вытянутые молекулы ДНК формировались только на поверхности аминокслоды с уменьшенной гидрофобностью. Анализ совокупности данных по визуализации линейных и суперспиральных ДНК на разных субстратах показывает, что формирование вытянутых молекул ДНК обусловлено поверхностными свойствами субстрата, на котором они иммобилизованы, под влиянием механической энергии направленного потока воды.

Ввиду использования аминокслоды 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

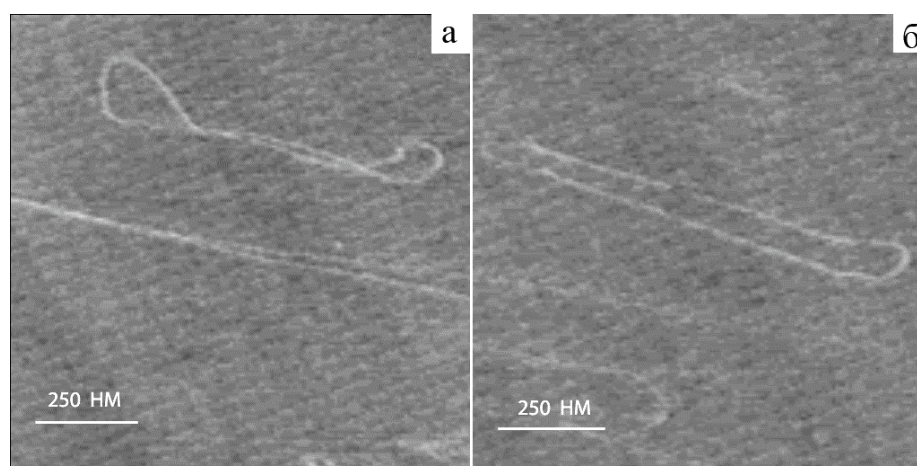


Рис. 2. АСМ-изображения вытянутых суперспиральных молекул ДНК *pGEMEX*, иммобилизованных на аминокслоде с уменьшенной плотностью аминогрупп: **а** — контурная длина ДНК составляет 1943 нм, что соответствует расстоянию между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали равному $4,87 \text{ \AA}$ (размер кадра $1,13 \text{ мкм} \times 1,13 \text{ мкм}$), **б** — контурная длина ДНК — 2140 нм, расстояние между нуклеотидами — $5,36 \text{ \AA}$ (размер кадра $1,07 \text{ мкм} \times 1,07 \text{ мкм}$) [2].

вдоль оси спирали (H) — проекция расстояния между основаниями на ось двойной спирали ДНК. Увеличение контурной длины суперспиральных молекул ДНК (ссДНК) *pGEMEX* с 1243 нм (характерного значения для невытянутой молекулы) до 1943 нм (рис. 2а) и 2140 нм (рис. 2б) означает, что вытягивание ссДНК в 1,56 и в 1,72 раза приводит к возрастанию межнуклеотидного расстояния до 4,87 Å и 5,36 Å, соответственно. Полученные данные для вытянутых молекул ДНК *pGEMEX* хорошо согласуются с ранее опубликованными результатами исследования вытянутых ДНК разными методами, в том числе с помощью метода оптического пинцета [28].

Таким образом, авторами разработана технология получения аминоклюды (субстрата для иммобилизации биополимеров для исследований с помощью АСМ) с заданными свойствами — регулируемой гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда. Наряду с известной стандартной аминоклюдой, полученной модификацией в парах аminosилана, за счет варьирования условий модификации слюды получена модифицированная аминоклюда с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп по сравнению со стандартной аминоклюдой. На основе этого развит новый экспериментальный подход вытягивания молекул ДНК. Вытянутые линейные молекулы ДНК фага λ и вытянутые суперспиральные молекулы ДНК *pGEMEX* визуализированы на поверхности аминоклюды с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминогрупп. Определенное непосредственно из АСМ-изображения увеличение контурной длины вытянутых суперспиральных молекул ДНК *pGEMEX* длиной 3993 п.н. означает, что молекулы ссДНК были вытянуты в 1,5-1,7 раза по сравнению с *B*-формой ДНК, что привело к увеличению расстояния между нуклеотидами вдоль оси спирали до 4,87-5,36 Å.

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

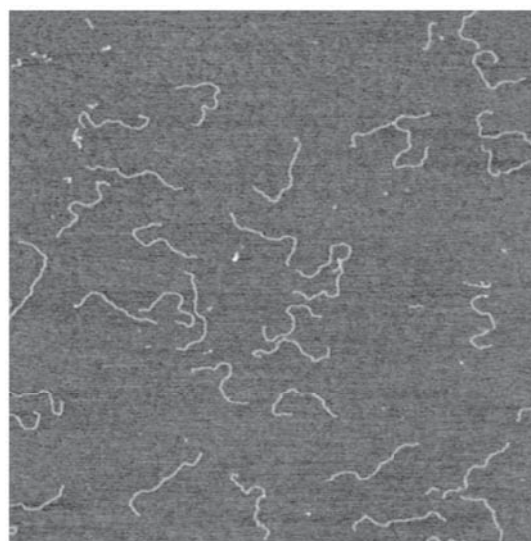
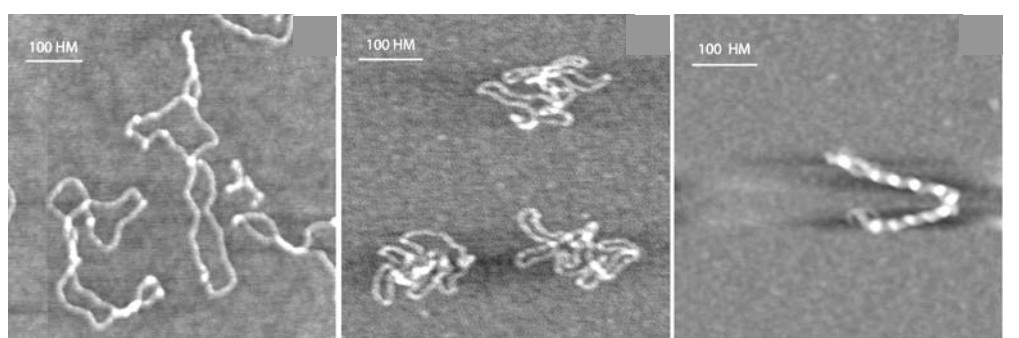


Рис. 3. АСМ-изображение амплифицированного фрагмента ДНК *pGEMEX*. Ожидаемая длина ампликона составляет 1414 п.н., или 485 нм в предположении *B*-формы ДНК (размер кадра — 1,5 мкм × 1,5 мкм) [32].

Суперспиральная ДНК (*S*-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 (рис. 3), контурная длина уменьшается по сравнению с ожидаемым теоретическим значением, характерным для *B*-ДНК. На основе определенного расстояния ($H = 3,07$ Å) сделано предположение, что линейные молекулы ДНК, адсорбированные на гидрофильной слюде, находятся в *A*-форме, переход к которой индуцируют как высушивание образца, так и взаимодействие с поверхностью слюды.

Для суперспиральной ДНК *pGEMEX*, иммобилизованной на свежесколотой слюде (рис. 4), 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 полилизинном, спермином [14, 16]. Суперспиральные молекулы ДНК *pGEMEX* на стандартной аминоклюде (см. рис. 4) более компактизованы, однако их контурная длина,



Свежесколотая слюда ($L = 1243$ нм, $l = 466$ нм, размер кадра—583 нм × 583 нм). Стандартная аминослюда ($L = 1216$ нм, размер кадра—500 нм × 500 нм). Модифицированная аминослюда ($L = 873$ нм, $l = 382$ нм, размер кадра—500 нм × 500 нм).

Рис. 4. АСМ-изображения единичных суперспиральных молекул ДНК *pGEMEX*, иммобилизованных на разных субстратах: свежесколотой слюде после нанесения капли раствора ДНК в 10 мМ *HEPES* буфере, содержащем 2,5 мМ $MgCl_2$, стандартной и модифицированной аминослуде: L — контурная длина, l — длина суперспиральной оси молекул ДНК [6,31].

измеренная по АСМ-изображению, лишь незначительно меньше ($L = 1216$ нм) по сравнению с контурной длиной плектономических молекул ДНК на слюде с катионами Mg^{2+} ($L = 1243$ нм, см. рис. 4). Для молекул ДНК, иммобилизованных на свежесколотой слюде (см. рис. 4), длина суперспиральной оси (оси двойной спирали суперспиральной молекулы ДНК, которая может быть закручена в виде спирали в отличие от оси линейной молекулы ДНК) составляет 466 нм.

В то же время, на модифицированной аминослуде (см. рис. 4) с повышенной гидрофобностью и поверхностной плотностью положительного заряда по сравнению со стандартной аминослудой наряду с плектономическими 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, иммобилизованная на модифицированной аминослуде (см. рис. 4), резко отличается по своим параметрам от молекул ДНК, иммобилизованных на свежесколотой слюде и стандартной аминослуде: количество узлов возросло до 11, длина суперспиральной оси уменьшилась до 382 нм, а рассчитанная по АСМ-изображению контурная длина составила 873 нм (!).

Поскольку длина секвенированной последовательности ДНК *pGEMEX* составляет 3993 п.н., было определено расстояние между нуклеотидами вдоль оси двойной спирали ДНК. И если для ДНК *pGEMEX*, иммобилизованной на свежесколотой слюде, межнуклеотидное расстояние $H = 3,11$ Å, то для сверхсу-

перспирализованной ДНК, иммобилизованной на модифицированной аминослуде, рассчитанное значение составило 2,19 Å (!). Значение $H = 3,11$ Å согласуется с ранее приведенными фактами незначительного уменьшения контурной длины ДНК, высушенной на слюде, предположительно *B*-формы ДНК [43]. Однако величина $H = 2,19$ Å указывает на то, что суперспиральные молекулы ДНК, иммобилизованные на аминослуде 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. 5-6).

В качестве одного из параметров, который позволяет отличить единичную молекулу от димера и других высококомпактизованных структур, образованных несколькими молекулами, мы выбрали объем молекулы ДНК, рассчитанный непосредственно по АСМ-изображению соответствующей молекулы. Его значение незначительно отличается от теоретически рассчитанного исключенного объема молекулы ДНК *pGEMEX* ($V_{\text{искл.}} = 4010$ нм³) 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 значительно 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 $h_{\text{макс}} = 1,3-1,8$ нм), а продольное сечение молекулы секущей плоскостью, перпенди-

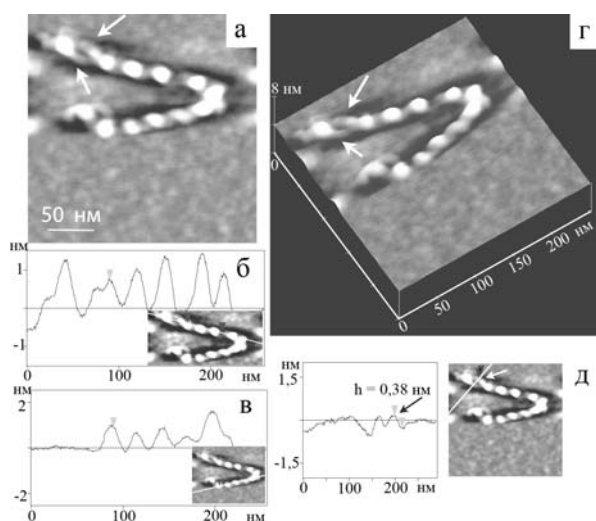


Рис. 5. **а** — АСМ-изображение единичной сверхспиральной ДНК *pGEMEX* в *S*-форме, полученное после иммобилизации на поверхности модифицированной аminosлюды. Расстояние между нуклеотидами вдоль оси дуплекса для данной молекулы равно 2,19 Å. Стрелками показаны две нити (каждая из которых образована двойной спиралью ДНК), закрученные в правую сверхспиральную ДНК с четко заметными 11 сверхвитками (узлами). Размер кадра — 250 нм × 250 нм. **б**, **в** — продольные сечения суперспиральной молекулы ДНК *pGEMEX*. Секущая плоскость проведена перпендикулярно плоскости рисунка через линию, показанную на вставках. Объем молекулы рассчитан как произведение ее ширины на сумму площадей продольных сечений. Шесть (см. **б**) и пять пиков (см. **в**) на профилях сечений соответствуют шести и пяти узлам. **г** — трехмерное изображение молекулы. Стрелками показаны нити дуплекса, которые частично разошлись и образуют сверхспиральную 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 $(0,38 \pm 0,05)$ нм.

кулярной плоскости слюды. Приведенные в табл. 1 значения объема для сверхспиральных молекул ДНК (поз. 3-5 в табл. 1, рис. 4 и рис. 5) совпадают со значением объема для единичной суперспиральной молекулы (поз. 1 табл. 1, рис. 4) в пределах погрешности измерения ($\pm 7,1$ %).

Другим важным результатом, свидетельствующим о сверхспирализации единичных молекул, а не жгутов, является высота закрученных

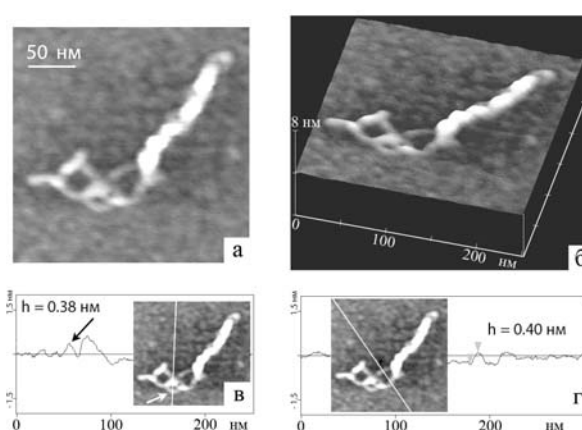





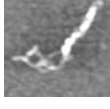
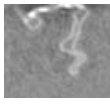
Рис. 6. **а** — АСМ-изображение единичной левой сверхспиральной ДНК *pGEMEX* в *S*-форме (размер кадра — 250 нм × 250 нм). **б** — трехмерное изображение молекулы. **в** — профиль поперечного сечения, выполненного секущей плоскостью вдоль линии, которая показана на вставке. Стрелки указывают на пик и соответствующий ему фрагмент нити двойной спирали ДНК, высота которой составляет 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 равная 0,40 нм [31].

нитей, образованных двухцепочечной ДНК. На АСМ-изображении (рис. 5а) и на трехмерном изображении данной молекулы (рис. 5г) стрелками указаны четко различимые нити данной молекулы. Измеренная высота этих нитей, которые частично разошлись (рис. 5д), 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 данными литературы по АСМ-измерению высоты ДНК, адсорбированной на субстрате [46]. Аналогичные измерения были проведены и для другой сверхспиральной молекулы ДНК (рис. 6). Как значение объема (поз. 4, табл. 1), так и значение высоты нитей данной молекулы ($h = 0,38-0,40$ нм) подтверждают, что и данная сверхспиральная структура образована одной (!) молекулой ДНК. Значения объемов для других визуализированных высококомпактизованных структур (полусфероид, сфероид, димеров, тримера) подтверждают надежность данного метода определения объема конденсированных структур и эффективность их дифференциации.

Такие сжатые, подобно пружине, суперспиральные молекулы ДНК с уменьшенным расстоянием

Таблица 1

Параметры суперспиральных молекул ДНК *pGEMEX* (по данным АСМ-изображений) [2]

Позиция	Молекула	Высота, нм		Контурная длина суперспиральной молекулы L , нм	Длина суперспиральной оси l , нм	Контурная длина релаксированной молекулы L_{rel} , нм	Расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали H , Å	Кажущийся объем V , нм ³
		h_{max}	h_{min}					
1		0,80	0,35	1243	466	1243	3,11	3510
2		0,99	0,35	1216	-	1216	3,05	3530
3		2,00	0,35	390	370	873	2,19	3830
4		1,80	0,27	577	282	776	1,94	3830
5		1,33	0,35	642	390	852	2,11	3800

между нуклеотидами вдоль оси дуплекса $H = \sim 2$ Å по сравнению с 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 и B-ДНК длиной 15 п.н. [2] 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 аминокислоты), 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* при отсутствии протеинов, а необходимым условием этого являются высокие поверхностная плотность положительного заряда и гидрофобность субстрата, на котором иммобилизована суперспиральная ДНК.

Сжатие ДНК, обнаруженное нами, — это весьма интересное явление в структурной 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 аминокислоты, 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 NH_2 -групп поверхностного слоя аминокислоты в межплоскостные водородные связи нуклеотидов [25].

Таким образом, доказано, что ДНК представляет собой своеобразную молекулярную пружину — молекула ДНК может быть не только вытянута, но и сжата. Визуализация сжатых молекул суперспиральной ДНК стала возможной благодаря созданию методики получения модифицированной аминокислоты с повышенной гидрофобностью и

поверхностной плотностью заряда в отличие от ранее используемой стандартной аминокислоты. На модифицированной аминокислоте наряду с плекто-немично 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.

Сжатие, как и растяжение молекулы ДНК, которое возникает в результате изменения уровня экранирования фосфатных групп дуплекса, может изменять равновесие между вандерваальсовыми и электростатическими взаимодействиями, что приводит к конформационной перестройке оснований сетки водородных связей двойной спирали ДНК. Расчеты зависимости энергии от расстояния между соседними парами нуклеотидов, проведенные в работе [15], показали, что если двойная спираль находится в сжатом состоянии, то энергия пар нуклеотидов увеличивается за счет вандерваальсовых взаимодействий. В этом случае при дальнейшем сжатии наиболее выгодной становится А-форма (с положительным скольжением), модель которой для спирально-го райза $H = 2 \text{ \AA}$ приведена в работе [31].

Открытие S-ДНК позволяет понять, почему в экспериментах на модельных нуклеосомах с использованием линейной и суперспиральной ДНК не был выявлен тот высокий уровень компактизации хромосомы, который существует *in vivo*. По нашему мнению, в экспериментах *in vitro* ДНК навивалась на гистоновый октамер (как максимум) при недостаточной степени экранирования отрицательных сайтов на ДНК, поскольку АСМ-визуализацию проводили на субстрате с невысоким для конденсации ДНК уровнем гидрофобности и поверхностной плотности заряда [22,48].

Компактизация суперспиральной ДНК на модифицированной аминокислоте

Геномная ДНК огромной длины (от миллиметра до метра) компактизована посредством взаимодействия с протеинами и другими соединениями в более высокоупорядоченные структуры в нуклеоидах бактерий и ядрах эукариот, объем которых составляет всего лишь от нескольких единиц до сотен кубических микрометров [22,27]. В свою очередь, объем нуклеоида, например *E. coli*, составляет лишь около четверти объема клетки. В отсутствие белков случайным образом компактизованная молекула ДНК занимает значительно больший объем, чем в ядре или нуклеоиде бактериальной клетки. Согласно современным воззрениям, такая компактизация ДНК эукариот обусловлена ее взаи-

модействием с рядом белков (прежде всего с топоизомеразами, гистонами) и последующим образованием нуклеосом, хроматиновых волокон и хромосом [19,45,48]. При этом *in vivo* гистоны нейтрализуют 57 % заряда электроотрицательных сайтов ДНК [40], а оставшуюся часть заряда ДНК нейтрализуют другие положительно заряженные ионы клеточного окружения, в том числе моно- и мультивалентные катионы, составляющие до 1 % массы клетки [50].



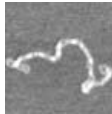
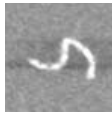

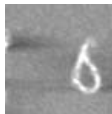

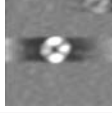
Для прокариот известно около 10 подобных гистонам белков, которые участвуют в компактизации ДНК, в частности белки, связывающиеся с ДНК, *HU* (*heat unstable*), *H-NS* (*histone-like nucleoid structuring*), *IHF* (*integration host factor*) [49]. Другие белки, связывающиеся с ДНК специфичным к последовательности способом, — это представители группы протеинов *HMG* (*high mobility group*), которые модулируют связывание гистонов с ДНК. Кроме того, были идентифицированы конденсины и когезины, относящиеся к белкам группы *SMC* (*structural maintenance of chromosome*), которые являются членами семейства АТФаз, играющих центральную роль в конденсации хромосом, и непосредственно ведут к конденсации ДНК [26].

Компактизация и конденсация ДНК с образованием тороидов и волокон (жгутов) могут быть достигнуты и при других условиях, кроме комплексобразования с белками [38,39]. Многочисленными исследованиями было показано, что поликатионы (полилизин, протамин, гексамин кобальта), природные (спермин⁴⁺, спермидин³⁺) и синтетические полиамины (диаминопропан²⁺) способствуют конденсации ДНК и образованию тороидов [8,10,16,18]. Более того, в работе [46] было продемонстрировано, что для агрегации ДНК присутствие протеинов или водорастворимых мультивалентных поликатионов не является обязательным условием, а конденсация ДНК может быть достигнута путем иммобилизации ее молекул на положительно заряженной поверхности аминокислоты. Степень конденсации молекул ДНК можно контролировать с помощью изменения валентности силанов, которые используют для модификации слюды, а также путем изменения концентрации NaCl [17,24]. Однако вследствие изменения концентрации NaCl в узком интервале (10-100 ммоль/л) высококомпактизованные структуры ДНК, кроме тороидов, не были визуализированы. Интересно отметить, что в работах [24,35] в условиях конденсации линейных молекул ДНК формировались мультимолекулярные агрегаты, а не агрегаты, образованные единичными молекулами ДНК.

Ранее было показано [47], что длина оси суперспиральной ДНК остается постоянной при увеличении плотности супервитков и составляет ~35 %

Таблица 2

Параметры сверхспиральных молекул ДНК *pGEMEX*, (по данным АСМ-изображений) [2]

Позиция на рис. 9	Молекула	Высота, нм		Контурная длина суперспиральной молекулы L , нм	Длина суперспиральной оси l , нм	Кажущийся объем V , нм ³
		h_{max}	h_{min}			
A3 (3)		0,80	0,35	1243	466	3510
A2 (21)		0,99	0,35	1216	—	3530
B3 (12)		0,95	0,35	580	567	4440
C3 (16)		1,69	0,78	279	279	3280
B2 (4)		1,35	0,28	260	260	3470
C2 (7)		1,36	0,30	270	270	3520
D2 (3)		3,00	1,25	140	140	5180
D3 (7)		1,74	0,84	260	260	3980

Примечания: * — в скобках указано количество визуализированных молекул для каждого варианта. Значение исключенного объема для ДНК *pGEMEX* равно 4010 нм³

контурной длины релаксированной молекулы. Это условие выполняется для молекул ДНК *pGEMEX*, иммобилизованных на свежесколотой слюде, которая характеризуется относительно невысокой поверхностной плотностью заряда. Иммобилизация 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, которые характеризуются дальнейшим уменьшением длины суперспиральной оси [29].

Из 108 исследованных индивидуальных молекул ссДНК наиболее характерные варианты молекул с соответствующими параметрами представлены в табл. 1-2. Из них количество плектонемичных суперспиральных ДНК (поз. А2 в табл. 2) с низкой плотностью супервитков ($\sigma \sim -0,02$) равно 21 %; сверхспиральные ДНК с высоким значением $\sigma \sim -0,13$, образующие суперспиральную ось первого порядка (В3), — 12 %; сверхссДНК, образующие ось суперспирали второго порядка (С3, В2, С2), — 27 %; молекулы, образующие суперспиральную ось третьего порядка (D2, D3, E2), — 14 %; наиболее

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. 7) длиной ~280 нм (что составляет ~20 % контурной длины релаксированной молекулы). В результате дальнейшей компактизации образуются молекулы с еще вдвое меньшей длиной суперспиральной оси (длина оси третьего порядка равна 140 нм, что составляет ~10 % контурной длины релаксированной молекулы, поз. D2 в табл. 2), минитороиды диаметром ~50 нм (рис. 8), а также молекулы в сферической конформации — полусфероиды и сфероиды (см. рис. 7).

Поскольку конденсация ДНК под влиянием разных факторов ранее была обнаружена только для димеров, тримеров, но не для единичных молекул ДНК [16,20], рассмотрим более детально С-образную сверхсуперспиральную молекулу (см. рис. 7), конформация которой подобна тороиду. АСМ-изображение этой молекулы с высоким разрешением (рис. 7а) и ее трехмерное изображение (рис. 7в) наглядно демонстрируют, что такая сверхссДНК образована несколькими четко различающимися нитями (стрелками указана часть молекулы, образованная тремя локально разошедшимися нитями). Показанный на рис. 7б 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 АСМ, что выгодно отличает ее и в этом отношении от электронной микроскопии. Поскольку высота двух нитей ДНК составляет 0,3 нм (что соответствует характерному значению высоты для двухцепочечной молекулы ДНК, иммобилизованной на слюде [46], а высота третьей нити равна 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.

Таким образом, анализ этого профиля сечения показал, что С-образная сверхссДНК образована четырьмя двухцепочечными нитями ДНК. Поскольку контурная длина приведенной сверхссДНК составляет 260 нм, это означает, что данная компактизованная структура образована “сложенной пополам” единичной кольцевой молекулой ДНК. Отметим, что при контурной длине, равной 260 нм,

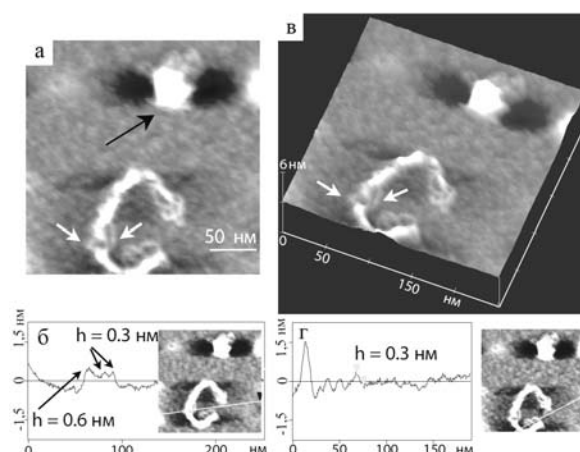


Рис. 7. а — АСМ-изображение, б и г — профили сечений, в — трехмерное изображение единичной сверхсуперспиральной ДНК *pGEMEX*, образовавшей ось суперспирали второго порядка. а — стрелками показаны разошедшиеся нити ДНК, профиль сечения которых приведен на б. Черная стрелка указывает на сфероид. б — линия, вдоль которой проведена секущая плоскость через три разошедшиеся нити, показана на вставке. Высота двух пиков составляет 0,3 нм, а третьего пика — 0,6 нм. г — профиль сечения, проведенного через разошедшиеся нити сверхсуперспиральной ДНК; секущая плоскость проведена вдоль линии, показанной на вставке. Высота этих нитей составляет 0,3 нм, что соответствует высоте нити двухцепочечной ДНК. Размер кадра — 250 нм × 250 нм [5].

число нитей ДНК в профиле сечения для димера должно было бы составлять восемь.

Представленный на рис. 7г другой профиль сечения этой С-образной молекулы также подтверждает, что данная молекула образована нитями, высота которых равна высоте двунитовой ДНК ($h = 0,3$ нм). Фактически анализ профиля сечения наряду с определением исключенного объема молекулы также позволяет дифференцировать молекулярные структуры от агрегатов, образованных несколькими молекулами.

Другой визуализированной нами структурой, внешне похожей на сфероид на АСМ-изображении с невысокой разрешающей способностью, является минитороид. Из профилей сечений на рис. 8б и рис. 8г 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 части, длина которого равна четверти длины окружности.

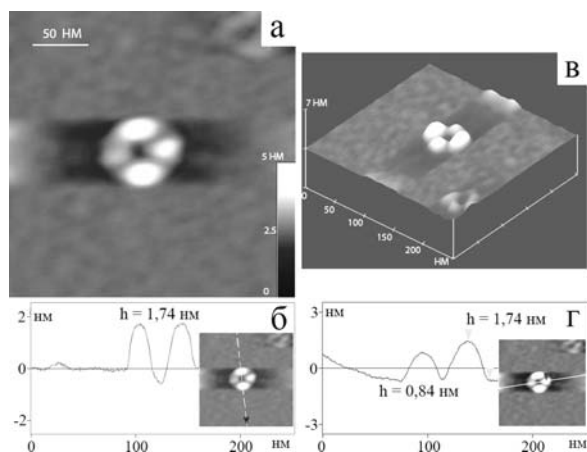


Рис. 8. **а** — АСМ-изображение (размер кадра — 250 нм × 250 нм), **б** и **г** — профили сечения, **в** — трехмерное изображение единичной сверхспирализованной ДНК *pGEMEX*, образовавшей миниториод (внешний диаметр — 50-60 нм, внутренний — 15-25 нм). **б** — высота двух фрагментов ториода, через которые проведена секущая плоскость, равна 1,74 нм. **г** — высота двух других фрагментов ториода, определенная из профиля сечения, равна 1,74 нм и 0,84 нм, соответственно. Треугольниками показан пик на профиле сечения и уровень, относительно которого было проведено измерение его высоты. Высота этого сегмента миниториода равна 1,74 нм. (см. **б**, **г**) [29].

На основе анализа полученных АСМ-изображений нами предложена схема поэтапной компактизации как для единичных молекул ДНК, так и для димеров (рис. 9). Позиции *B1*, *C1*, *D1*, *E1*, 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. *A1*-*A3*, самые компактизованные — в поз. *E1*-*E3*. В поз. *A3* приведено изображение ссДНК *pGEMEX*, иммобилизованной на свежесколотой слюде с ионами Mg^{2+} . Молекулы ссДНК *pGEMEX*, иммобилизованные на стандартной аминокислоте (поз. *A1*, *A2*) с высоким значением поверхностной плотности 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.

При переходе к модифицированной аминокислоте, которая характеризуется значительно большей поверхностной плотностью заряда по сравнению со стандартной аминокислотой, наблюдается несколько вариантов компактизации ссДНК. На первом этапе возрастает количество узлов и образуются сверхспирализованные молекулы ДНК (*B3*), т. е. своеобраз-

ные жгуты (рис. 10б). Количество узлов для данной молекулы составляет 19 и, как следствие, значение плотности супервитков $\sigma = -0,13$. Количество узлов в молекуле было рассчитано визуально по АСМ-изображению (белая точка или пятно на АСМ-изображении соответствуют 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. 10в) и $l = 140$ нм (рис. 10г). Поскольку объем обеих молекул совпадает с объемом единичной молекулы ДНК *pGEMEX*, можно предположить, что молекула с $l = 279$ нм (см. рис. 10в) образована в результате складывания вдвое молекулы с $l = 567$ нм (см. рис. 10б), а молекула с длиной оси $l = 140$ нм (см. рис. 10г) — складыванием вдвое молекулы с длиной оси $l = 279$ нм (см. рис. 10в). Таким образом, при иммобилизации молекул ссДНК на поверхности аминокислуды с повышенной плотностью аминогрупп визуализированы сверхспирализованные ДНК, образующие оси суперспирали второго (см. рис. 10в) и третьего (см. рис. 10г) порядка, длина которых приблизительно в два и четыре раза меньше, чем длина оси суперспирали первого порядка (см. рис. 10б), соответственно.

Компактизация на модифицированной аминокислоте происходит не только для единичных молекул ДНК, но и для олигомеров. Молекулы, АСМ-изображения которых показаны в поз. *B1*, *C1*, *D1*, *E1* (см. рис. 9), образуют димеры, что определено нами на основе вычисления их объемов. Сначала две плектонемичные молекулы (*A1*, *A2*) образуют жгутообразные структуры (*B1*). В дальнейшем возможно формирование ториода (*C1*, *D1*) или жгута (*E1*), длина суперспиральной оси которого составляет четверть контурной длины релаксированной молекулы. Позиция *D2* также соответствует ториоду, образованному двумя молекулами сверхссДНК.

Возвращаясь к схеме компактизации ДНК (см. рис. 9), отметим, что на втором этапе жгутообразная молекула (*B3*) складывается вдвое — длина суперспиральной оси уменьшается в два раза (*C3*, *B2*, *C2*). На этом этапе возможно как дальнейшее формирование жгутов (*C3*), так и образование ториодов (*C2*). На третьем этапе образуются более короткие жгуты с еще вдвое меньшей длиной супер-

спиральной оси $l = \sim 140$ нм (*D2*). Кроме того, возможно формирование минитороида (*D3*) как из тороида (*C2*), так и из жгутовидной молекулы (*C3*). На четвертом этапе дальнейшая компактизация тороидов и жгутов ведет к возникновению полусфероидов (*E2*) и сфероидов. Интересно отметить, что минитороиды возникают как группами, так и единичными структурами.

Пытаясь ответить на вопрос, почему разные молекулы ДНК компактизованы до разного уровня, можно предположить, что, во-первых, на поверхности модифицированной аминокислоты протонированные аминогруппы локализованы неоднородно и, во-вторых, наиболее компактизованные структуры (сфероиды и полусфероиды) образуются на участках модифицированной аминокислоты с максимальной плотностью активных аминогрупп.

Локализация морфологически близких форм ссДНК (минитороидов, жгутоподобных молекул с длиной оси суперспирали ~ 570 нм и ~ 280 нм) на участках слюды размером ~ 500 нм \times 500 нм указывает на то, что поверхностная плотность заряда модифицированной аминокислоты 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 аминокислоты, топоизомеры с разным количеством супервитков могут конденсироваться в агрегаты с разным уровнем компактизации.

Таким образом, 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 аминокислоты. Визуализированы этапы компактизации единичных молекул суперспиральной ДНК *pGEMEX*, иммобилизованных на модифицированной аминокислоте. 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 порядка. Визуализированы полусфероиды и сфероиды — структуры, образованные единичными суперспиральными молекулами ДНК, — и показано, что тороиды также могут быть образованы единичными молекулами ДНК. На основе анализа

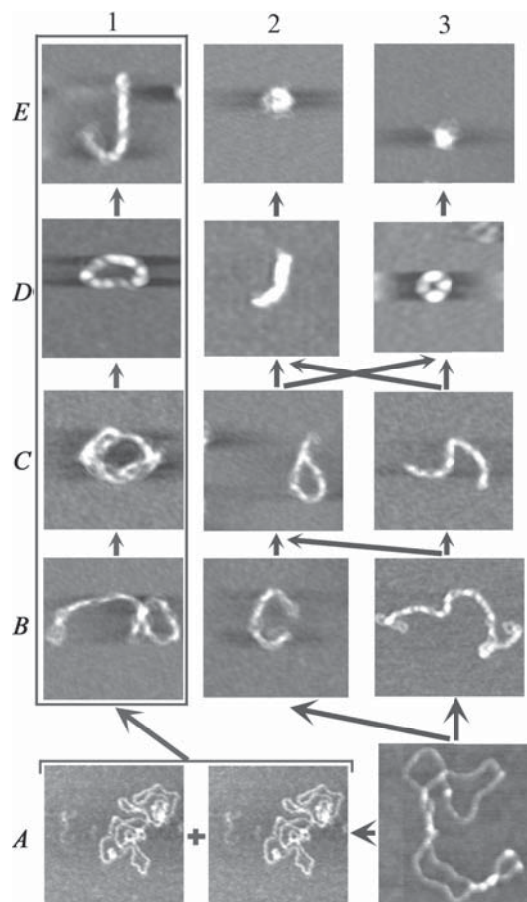


Рис. 9. Модель компактизации молекул суперспиральной ДНК, предложенная на основе полученных АСМ-изображений ДНК *pGEMEX*. **A1, A2** — стандартная аминокислота, **A3** — свежесколотая слюда, остальные АСМ-изображения получены на модифицированной аминокислоте. Стрелки указывают направление этапов дальнейшей компактизации ДНК; прямоугольником выделены четыре димера. При повышении поверхностной плотности заряда, или количества протонированных аминогрупп (т. е. при переходе от свежесколотой и стандартной аминокислоты к модифицированной аминокислоте), образуются разные топологические варианты компактизованных молекул ДНК. **B3** — сверхсуперспиральная ДНК, образующая ось суперспирали 1-го порядка; **B2, C2, C3** — сверхсуперспиральная ДНК, образующая ось суперспирали 2-го порядка; **D2** — сверхсуперспиральная ДНК, образующая ось суперспирали 3-го порядка; **D3** — минитороид, образованный единичной молекулой ДНК; **E2, E3** — сфероиды [1].

полученных изображений предложена модель возможных конформационных переходов суперспиральной ДНК *in vitro* в отсутствие протеинов при возрастании уровня компактизации ДНК. Компактизация единичных суперспиральных

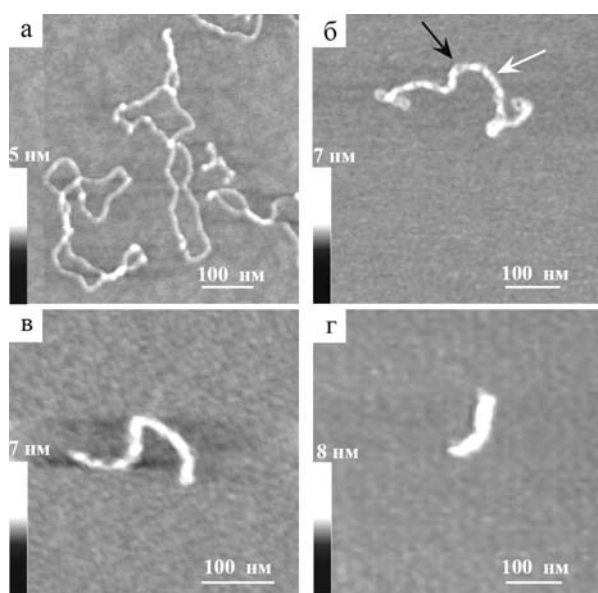


Рис. 10. АСМ-изображения суперспиральной ДНК *pGEMEX*, иммобилизованной на свежесколотой слюде из буфера, содержащего ионы Mg^{2+} (а), и на модифицированной аминокислоте (б-г), с разной длиной оси суперспирали. Длина оси суперспирали составляет: на а — (466 ± 5) нм (для обеих молекул), $\sigma = -0,024$, на б — 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), на в — 279 нм (ось суперспирали 2-го порядка содержит 7 узлов), на г — 140 нм (ось суперспирали 3-го порядка). Цифры над верхней границей шкалы градаций цвета соответствуют значениям высоты объекта на АСМ-изображении [5].

молекул ДНК обусловлена экранированием отрицательно заряженных взаимно отталкивающихся фосфатных групп ДНК положительно заряженными аминокислотными группами аминокислоты.

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 порядка. Одной из причин продольного сжатия и внутримолекулярной компактизации ДНК может быть уве-

личение ее эластичности при повышении уровня нейтрализации фосфатных групп (именно это предусматривает теория *G. Manning* [37], подтвержденная экспериментально в работе [42]).

Наши результаты показывают, что конденсация ДНК происходит через суперспирализацию молекул, которая, в свою очередь, зависит от уровня экранирования электроотрицательных сайтов ДНК [30]. Сверхсуперспирализация может быть структурно реализована двумя вариантами — за счет деформации оси молекулы, а также через изменение осевого закручивания двойной спирали. Конформация большинства визуализированных молекул свидетельствует, что поликатионы (т. е. аминокислота) не увеличивают вероятность образования катенанов. Поскольку лишь одна из визуализированных структур образовала катенаны, этот факт подтверждает ранее известные данные, что суперспирализация значительно уменьшает вероятность образования катенанов [23].

Одним из важных направлений современной нанобиологии и нанобиотехнологии является создание биосенсоров, позволяющих локализовать протеины на поверхности и внутри клеточного ядра, на основе АСМ-зондов, функционализированных биополимерами, специфичными к указанным протеинам. Разработанные авторами технологии, схемы, методические подходы и эмпирически определенные протоколы направлены на решение данной проблемы [3].

Разработанная нами технология аминомодификации зондов в парах производного аминокислоты [34] может быть использована как для производства аминомодифицированных зондов для АСМ, так и для их последующей функционализации биомолекулами. Разработанная в работе технология получения аминокислоты с заданными свойствами также может быть с успехом использована при аминомодификации зондов. Отметим, что получение аминоперфорированной поверхности зонда с уменьшенной гидрофобностью и поверхностной плотностью заряда (по аналогии с поверхностью аминокислоты с уменьшенной поверхностной плотностью заряда) позволит снизить плотность экспонированных на поверхности зонда реакционных аминокислотных групп, а следовательно, и плотность конъюгированных с ними биополимеров, что необходимо для одного из направлений нанобиологии — силовой микроскопии узнавания единичных молекул.

Список использованной литературы

1. Лиманская О. Ю., Лиманская Л. А., Лиманский А. П. Компактизация суперспиральной ДНК на модифицированной аминокислоте // Биополимеры и клетка. — 2006. — 22, № 1. — С. 18-28
2. 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. — 21, № 6. — С. 515-524.
3. Лиманский А. П. Атомно-силовая микроскопия: от визуализации молекул ДНК и белков до измерения силы межмолекулярных взаимодействий // Успехи соврем. биол. — 2003. — 123, № 6. — С. 531-542.
4. Лиманский А. П. Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // Биополимеры и клетка. — 2001. — 17, № 4. — С. 292-297.
5. Лиманский А. П. Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, иммобилизованных на аминокислоте: от дуплекса к минитороидальной и сферической конформации // Биофизика. — 2007. — 52, № 2. — С. 252-260.
6. Лиманский А. П. Сверхсуперспирализация и компактизация суперспиральной ДНК // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 2. — С. 64-71.
7. Лиманский А. П., Лиманская О. Ю. Изучение геномной ДНК микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 4. — С. 30-36.
8. Allen M., Bradbury E., Balhorn R. AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica // Nucleic Acids Res. — 1997. — 25. — P. 2221-2226.
9. Bezanilla M., Drake B., Nudler E. et al. Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope // Biophys. J. — 1994. — 67, № 12. — P. 2454-2459.
10. Bloomfield V. DNA condensation by multivalent cations // Biopolymers. — 1997. — 44. — P. 269-282.
11. Bussiek M., Mucke N., Langowski J. Polylysine-coated mica can be used to observe systematic changes in the supercoiled DNA conformation by scanning force microscopy in solution // Nucleic Acids Res. — 2003. — 31, № 22. — P. 1-10.
12. Bustamante C., Rivetti C., Keller D. Scanning force microscopy under aqueous solutions // Curr. Opin. Struct. Biol. — 1997. — 7, № 5. — P. 709-716.
13. Butt H. Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope // Biophys. J. — 1991. — 60, № 6. — P. 1438-1444.
14. Cherny D., Jovin T. Electron and scanning force microscopy studies of alterations in supercoiled DNA tertiary structure // J. Mol. Biol. — 2001. — 313. — P. 295-307.
15. Cluzel P., Lebrun A., Heller C. et al. DNA: an extensible molecule // Science. — 1996. — 271. — P. 792-794.
16. Dunlap D., Maggi A., Soria M., Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery // Nucleic Acids Res. — 1997. — 25. — P. 3095-3101.
17. Fang Y., Hoh J. Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations // Nucleic Acids Res. — 1998. — 26. — P. 588-593.
18. Golan R., Pietrasanta L., Hsieh W., Hansma H. DNA toroids: stages in condensation // Biochemistry. — 1999. — 38. — P. 14069-14076.
19. Gonzalez-Huici V., Salas M., Hermoso J. Genome wide, supercoiling-dependent *in vivo* binding of a viral protein involved in DNA replication and transcriptional control // Nucleic Acids Res. — 2004. — 32. — P. 2306-2314.
20. Hansma H., Golan R., Hsieh W. et al. DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy // Nucleic Acids Res. — 1998. — 26. — P. 2481-2487.
21. Hegner M., Wagner P., Semenza G. Immobilizing DNA on gold via thiol modification for atomic force microscopy imaging in buffer solutions // FEBS Lett. — 1993. — 336, № 3. — P. 452-456.
22. Hizume K., Yoshimura S., Maruyama H. et al. Chromatin reconstitution: development of a salt-dialysis method monitored by nanotechnology // Arch. Histol. Cytol. — 2002. — 65, № 5. — P. 405-413.
23. Holmes V., Cozzarelli N. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation and supercoiling // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2000. — 97, № 4. — P. 1322-1324.
24. Hud N., Downing K. Cryoelectron microscopy of λ phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2001. — 98. — P. 14925-14930.
25. Kabanov A. V., Komarov V. M. Polymorphism of hydrogen bonding in the short double helices of oligonucleotides. Quantum-chemical semiempirical study // Intern. J. Quantum. Chem. — 2002. — 88. — P. 579-587.
26. Kemura K., Rybenkov V., Crisona N. et al. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation // Cell. — 1999. — 98. — P. 239-248.
27. Kim J., Yoshimura S., Hizume K. et al. Fundamental structural units of the Escherichia coli nucleoid revealed by atomic force microscopy // Nucleic Acids Res. — 2004. — 32. — P. 1982-1992.
28. Leuba S., Karymov M., Tomschik M. et al. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the DNA molecule: magnetic tweezers study // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2003. — 100, № 2. — P. 495-500.
29. Limanskaya L., Limanskii A. Compaction of single supercoiled DNA molecules adsorbed onto amino mica // Rus. J. Bioorg. Chem. — 2006. — 32, № 5. — P. 444-459.
30. Limanskaya O., Limanskii A. Imaging compaction of single supercoiled DNA molecules by atomic force microscopy // Gen. Physiol. Biophys. — 2008. — 27, № 4. — P. 322-337.
31. Limanskaya L., Limanskii A. S-DNA is oversupercoiled with DNA 1.94 – 2.19 Å rise per nucleotide // Mol. Biol. — 2006. — 40, № 1. — P. 107-120.
32. Limanskii A. Visualization of amplicons after polymerase chain reaction // Biophysics. — 2005. — 50, № 6. — P. 879-883.
33. Limanskii A. P. Visualization of cruciform structure in supercoiled DNA by atomic force microscopy // Biophysics. — 2000. — 45, № 6. — P. 1007-1011.
34. Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S. et al. Aminomodified probes for atomic force microscopy // Probe Microscopy. — 2002. — 2, № 3-4. — P. 227-234.
35. Lin C., Wang C., Feng X. et al. The observation of the local ordering characteristics of spermidine-condensed DNA: atomic force microscopy and polarizing microscopy studies // Nucleic Acids Res. — 1998. — 26. — P. 3228-3234.
36. Lyubchenko Y., Gall A., Shlyakhtenko L. et al. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA // J. Biomol. Structure and Dynamics. — 1992. — 10, № 3. — P. 589-606.

37. Manning G. The molecular theory of polyelectrolyte solutions with application of the electrostatic properties of polynucleotides // Q. Rev. Biophys. — 1978. — **11**. — P. 179-246.
38. Martinkina L., Klinov D., Kolesnikov A. et al. Atomic force and electron microscopy of high molecular weight circular DNA complexes with synthetic oligopeptide trivalent // J. Biomol. Struct. Dyn. — 2000. — **17**. — P. 687-695.
39. Martinkina L., Kolesnikov A., Streltsov S. et al. Circular superhelical DNA complexes with synthetic oligopeptide: unusual compact structures and influence of bent sequences on the results of compaction // J. Biomol. Struct. Dyn. — 1998. — **15**. — P. 949-957.
40. Morgan J., Blankenship J., Mattheus H. Polyamines and acetylpolyamines increase the stability and alter the conformation of nucleosome core particles // Biochemistry. — 1987. — **26**. — P. 3643-3649.
41. Moy V., Florin E.-L., Gaub H. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors // Science. — 1994. — **266**. — P. 257-259.
42. Podesta A., Indrieri M., Brogioli D. et al. Positively charged surfaces increase the flexibility of DNA // Biophys. J. — 2005. — **89**, № 4. — P. 2558-2563.
43. Rivetti C., Codeluppi S., Dieci G., Bustamante C. Visualizing RNA extrusion and DNA wrapping in transcription elongation complexes of bacteria and eukaryotic RNA polymerases // J. Mol. Biol. — 2003. — **326**, № 5. — P. 1413-1426.
44. Smith S., Cui Y., Bustamante C. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules // Science. — 1996. — **271**. — P. 795-799.
45. Takeyasu K., Kim J., Ohniwa R. et al. Genome architecture studied by nanoscale imaging: analyses among bacterial phyla and their implication to eukaryotic genome folding // Cytogenet. Genome Res. — 2004. — **107**. — P. 38-48.
46. Tanigawa M., Okada T. Atomic force microscopy of supercoiled DNA structure on mica // Anal. Chim. Acta. — 1998. — **365**, № 1. — P. 19-25.
47. Upholt W., Gray H., Vinograd J. Sedimentation velocity behavior of closed circular SV40 DNA as a function of superhelix density, ionic strength, counterion and temperature // J. Mol. Biol. — 1971. — **61**, № 1. — P. 21-38.
48. Yoshimura S. H., Hizume K., Murakami A. et al. Condensin architecture and interaction with DNA: regulatory non-SMC subunits bind to the head of SMC heterodimer // Curr. Biol. — 2002. — **12**, № 6. — P. 508-513.
49. Zimmerman S. Studies on the compaction of isolated nucleoids from *Escherichia coli* // J. Structur. Biol. — 2004. — **147**. — P. 146-158.
50. Zinchenko A., Yoshikawa K. Na⁺ shows a markedly higher potential than K⁺ in DNA compaction in a crowded environment // Biophys. J. — 2005. — **88**. — P. 4118-4123.

Получено 30.06.2011

НАНОМАНІПУЛЮВАННЯ З БІОМАКРОМОЛЕКУЛАМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ КОМПАКТИЗАЦІЇ ДНК (огляд літератури та власних досліджень)

О. Ю. Лиманська^{1,2}, О. П. Лиманський¹

¹Державна установа “Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України” 61057 Харків

²Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини НААН України”
61023 Харків

Представлено експериментальні результати досліджень внутрішньомолекулярної компактизації поодиноких молекул ДНК при іммобілізації на субстраті під впливом його поверхневих властивостей. На підставі даних атомно-силової мікроскопії доведено, що ДНК являє собою своєрідну молекулярну пружину — молекула ДНК може бути не тільки витягнута, але й зжата. На модифікованій амінослуді поряд із плектономічно суперспіральною молекулою ДНК були візуалізовані поодинокі молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, ступінь суперспіралізації яких значно вищий порівняно з раніше досягнутими експериментально та розглянутими теоретично. Відстань між нуклеотидами уздовж осі спіралі для таких суперспіральною молекул ДНК змінювалась у діапазоні від 1,94 Å до 2,19 Å. Такі зжаті суперспіральною молекули ДНК зі зменшеною міжнуклеотидною відстанню порівняно з відомими формами ДНК були віднесені до нової форми ДНК — S-ДНК. Візуалізацією лінійних та суперспіральною молекул ДНК на чотирьох різних субстратах з різними поверхневими властивостями доведено, що стиснення суперспіральною молекул ДНК обумовлене поверхневими властивостями субстрату — високою гідрофобністю та щільністю заряду модифікованою амінослуди. Візуалізовано етапи компактизації поодиноких молекул суперспіральною ДНК *pGEMEX*, іммобілізованих на модифікованій амінослуді. Показано, що компактизація поодиноких молекул відбувається у три етапи послідовного складання навпіл зі зменшенням довжини осі суперспіралі, тобто з утворенням осей суперспіралі другого та третього порядку. Компактизація поодиноких молекул завершується утворенням молекул у сферичній конформації. Запропоновано модель можливих конформаційних переходів суперспіральною ДНК *in vitro* за відсутності протеїнів при зростанні рівня компактизації.

NANOMANIPULATION WITH BIOMACROMOLECULES AND MOLECULAR MECHANISMS OF DNA COMPACTION

(review of literature and own data)

O. Yu. Limanskaia^{1,2}, A. P. Limanskiy¹

¹I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology NAMS Ukraine, 61057 Kharkov

²National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine NAAS Ukraine", 61023 Kharkov

Presented are the results of study of intramolecular compaction of single DNA molecules when being immobilized onto substrate under the influence of its surface properties. Based on the atomic force microscopy images obtained, DNA is proved to be a molecular spring that can be stretched and compressed as well. On a modified amino mica 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) along with the plectonemically supercoiled DNA molecules have been visualized. The distance between nucleotides along the duplex axis for these supercoiled DNA molecules varied from 1.94 to 2.19 Å. These compressed supercoiled DNA molecules with a reduced internucleotide distance compared to the known forms of DNA are considered to be a new DNA form – S-DNA. Visualization of linear and supercoiled DNA molecules on four different substrates with different surface properties has proved that compression of supercoiled DNA molecules has been determined by surface properties of the substrate – a high hydrophobicity and charge density of modified amino mica. Stages of compaction of supercoiled pGEMEX DNA single molecules, immobilized on a modified amino mica were visualized. The compaction of single molecules was shown to occur through the three phases of folding in half with a consistent decrease in the axis length of the superhelix, i.e. with formation of the superhelix axis of the second and third orders. The compaction of single molecules is finishing by the formation of molecules in a spherical conformation. A model of possible conformational transitions of supercoiled DNA in vitro without proteins with increasing compaction level is proposed.