

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДИНА**

**Лиманський Олександр Петрович**

**УДК 577.2  
577.32**

**МОДИФІКАЦІЯ ТА ФУНКЦІОНАЛІЗАЦІЯ ЗОНДІВ І СУБСТРАТІВ  
ДЛЯ НАНОБІОТЕХНОЛОГІЇ**

**03.00.20 – біотехнологія**

**Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук**

**Київ – 2007**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у лабораторії нових та маловивчених інфекційних захворювань Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України (м. Харків).

**Науковий консультант** – доктор медичних наук, професор  
**Волянський Юрій Леонідович**,  
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова  
АМН України, м. Харків,  
директор інституту.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор, чл.-кор. НАН України  
**Малюта Станіслав Станіславович**,  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
завідувач відділу молекулярної генетики;

доктор біологічних наук, професор  
**Стародуб Микола Федорович**,  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
головний науковий співробітник;

доктор фізико-математичних наук, професор  
**Малюкін Юрій Вікторович**,  
Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК "Інститут моно-  
кристалів" НАН України,  
завідувач відділу нанокристалічних матеріалів.

Захист відбудеться «\_\_\_» жовтня 2007 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01601, Київ-30, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий \_\_\_ вересня 2007 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

Кірсенко О.В.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Аналіз тенденцій розвитку суспільства засвідчує, що прогрес як людства взагалі, так і окремих країн наразі та у найближчі часи в значній мірі визначатиметься нанотехнологіями. Тому у провідних наукових країнах розроблено пріоритетні національні нанотехнологічні проекти. При цьому вважають, що існують певні ризики вкладення коштів, але підкреслюють, що значно більші ризики виникають у разі невикладення останніх...

Здатність молекул ДНК до регульованого та високоорганізованого складання перетворює її на ідеальний матеріал для нанотехнології та нанобіотехнології (галузі біотехнології, яка направлена на вивчення та створення матеріалів з покращеними фізичними, хімічними та біологічними властивостями на нанорівні, фундаментальні дослідження якої базуються на маніпулюванні біологічними системами з використанням нанотехнологічного обладнання). Увага широкого кола дослідників прикута до ДНК навіть через п'ятдесят з лишком років після відкриття структури цієї молекули. Величезний інтерес вчених та актуальність таких досліджень обумовлені як роллю, що відіграє ДНК у найважливіших клітинних процесах, так і можливістю одержати принципово нову інформацію через розробку новітніх технологій та методів дослідження.

Потужним імпульсом для розвитку нанобіотехнології, структурної нанобіології, нановірусології стала розробка численних варіантів скануючої зондової мікроскопії. Найпоширеніший з таких методів (атомно-силова мікроскопія, АСМ) відкрив безпрецедентні можливості для візуалізації, маніпулювання та аналізу поодиноких молекул, у тому числі за фізіологічних умов. "Оком" атомно-силового мікроскопа, або своєрідним біосенсором, є зонд, який приєднано до кантилевера. Попередні дослідження (Gaub, 1994) показали, що сила розриву між взаємодіючими поверхнями на рівні поодиноких пар молекул надає нову та надзвичайно цінну інформацію щодо природи взаємодії: можливо відрізнити специфічну взаємодію від неспецифічної, та навіть енергетично рівновеликі взаємодії також можуть бути диференційовані. Ковалентне зв'язування біополімерів із зондом атомно-силового мікроскопа перетворює останній на мономолекулярний біосенсор. За його допомогою можливо вивчати тонкі особливості взаємодії ліганда з рецептором, а також локалізувати специфічні рецептори на поверхні зразка.

Створення зондів для вивчення поверхневих властивостей клітин та локалізації білків на поверхні і всередині клітинного ядра, дослідження структури молекул ДНК при іммобілізації на субстратах з різними поверхневими властивостями для фундаментальних і прикладних досліджень за допомогою скануючої зондової мікроскопії є актуальними задачами сучасної нанобіотехнології, яка виникла на стику нанотехнології, молекулярної біології, електроніки, фізики та хімії поверхні.

Визначальна роль в отриманні високоякісних зображень біополімерів за допомогою АСМ відводиться процедурі модифікації субстрату для іммобілізації молекул. Раніше було розвинено декілька методів підготовки зразка ДНК, які нині використовують у багатьох лабораторіях через простоту процедури. Для попередньої

обробки слюди, субстрату для АСМ, з метою підвищення її афінності до ДНК використовували ди- та тривалентні катіони (Hansma et al., 1994; Bustamante et al., 1997), природні та синтетичні поліаміни (Okada et al., 1998; Jovin et al., 2001; Langowski et al., 2003). Також для візуалізації ДНК були застосовані субстрати з напилюванням золота, на поверхні якого утворені самоасоційовані моношари тіогруп (Hegner, 1993). Поряд з зазначеними методами, через наявність у них ряду вузьких міст, було розроблено інші підходи до модифікації слюди – обробкою похідними аміносиланів у розчині та у газовій фазі (Любченко, 1992). Проте залишилися невирішеними питання стосовно структури лінійних молекул ДНК, механізму компактизації суперспіральних ДНК, іммобілізованих на поверхні слюди. Доцільність проведення таких досліджень обумовлена можливістю одержання додаткової фундаментальної інформації, яка може наблизити до розуміння особливостей компактизації ДНК в ядрах еукаріотів, нуклеоїдах бактерій та іммобілізації на субстраті.

Незважаючи на відомі методи модифікації зондів та іммобілізації ДНК на слюді, технологія створення модифікованих зондів та субстратів із заданими властивостями (а саме регульованою поверхневою щільністю заряду та гідрофобністю) для фундаментальних та прикладних досліджень в галузі нанобіотехнології не була реалізована на момент початку досліджень.

Дисертація присвячена розв'язанню наукових проблем нанобіотехнології, що пов'язані з маніпулюванням біополімерами, – створенню субстратів з регульованими поверхневими властивостями, розробці модифікованих зондів (як універсальних компонентів біосенсорів) та зондів, функціоналізованих біомакромолекулами, для силової мікроскопії впізнавання поодиноких молекул, молекулярним механізмам компактизації та структурі лінійних і суперспіральних ДНК, іммобілізованих на субстраті, візуалізації комплексів, що утворює РНК-полімераза (РНКП) бактеріофага T7 з ДНК-матрицею при елонгації транскрипції.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота пов'язана з плановими темами лабораторії нових та маловивчених інфекційних захворювань Інституту мікробіології та імунології ім. Мечникова АМН України: АМН 40/2001 “Розробка молекулярно-генетичних тест-систем для раннього виявлення збудників туберкульозу і генотипування мікобактерій”, № держреєстрації 0101U001328; АМН 47/2002 “Вивчення геномної організації *Bacillus anthracis* та розробка молекулярно-генетичних тест-систем для детекції та типування збудника сибірської виразки”, № держреєстрації 0102U001570; АМН 59/2004 “Вивчення геномної організації та розробка молекулярно-генетичних тест-систем для детекції та типування коронавірусу людини, зчепленого з тяжким гострим респіраторним синдромом”, № держреєстрації 0104U002959, в рамках яких автор був відповідальним виконавцем.

**Мета і завдання дослідження.** Метою дослідження була розробка нанобіотехнологічних підходів до візуалізації і маніпулювання поодинокими молекулами і клітинами та визначення шляхів і молекулярних механізмів компактизації молекул суперспіральної ДНК при іммобілізації на субстраті.

*Об'єктом дослідження є модифіковані та функціоналізовані біополімерами*

зонди та субстрати для атомно-силової мікроскопії, процеси іммобілізації ДНК і білків на їхніх поверхнях.

*Предметом дослідження є процеси модифікації та функціоналізації біополімерами зондів та субстратів для атомно-силової мікроскопії, структура молекул ДНК, іммобілізованих на поверхні амінослиди. Для досягнення зазначеної мети, зважаючи на існуючий стан проблеми, у роботі були поставлені та вирішені наступні задачі:*

1. Розробити технологію наноманіпулювання (витягнення, стиснення) лінійними та суперспіральними молекулами ДНК при іммобілізації на амінослиді.
2. Вивчити зміни конформації лінійних та суперспіральних ДНК в залежності від поверхневих властивостей слиди, на якій іммобілізовані молекули ДНК.
3. Створити технологію аміномодифікації зондів для атомно-силової мікроскопії у газовій фазі з можливістю їх наступної функціоналізації біополімерами.
4. Розробити схеми функціоналізації АСМ-зондів біополімерами на основі амінозондів з приєднаними молекулами амінореакційних лінкерів, бичачого сироваткового альбуміну та ДНК.
5. Охарактеризувати поверхневі властивості аміномодифікованих та функціоналізованих біополімерами зондів за різних іонних умов за допомогою атомно-силової мікроскопії у режимі силових вимірювань.
6. Вивчити комплекси, що утворює РНК-полімераза бактеріофага Т7 з ДНК-матрицею в процесі транскрипції.
7. Розробити методичні підходи для АСМ-візуалізації інтактних клітин безпосередньо у буферному розчині.

*Методи дослідження.* Для візуалізації біополімерів у повітрі та інтактних клітин безпосередньо у водному середовищі використовували атомно-силову мікроскопію. Вимірювання сили адгезії для різних пар поверхонь зонд-субстрат проводили за допомогою атомно-силової мікроскопії в режимі силових вимірювань. Комп'ютерний аналіз застосовували для пошуку неканонічних структур у геномі мікроорганізмів, а стандартну полімеразну ланцюгову реакцію – для отримання ампліконів, які використовували як ДНК-матрицю при проведенні транскрипції.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, що молекули ДНК, на відміну від відомої їхньої властивості – витягування під впливом прикладеної сили, – можуть бути також стиснуті. Такі стиснуті суперспіральні молекули ДНК, які характеризуються відстанню між нуклеотидами вздовж осі спіралі  $1,94 \text{ \AA} < H < 2,19 \text{ \AA}$ , були віднесені до нової форми – S-ДНК, модель якої побудовано.

Візуалізація стиснутих молекул суперспіральної ДНК стала можливою завдяки створенню методики отримання модифікованої амінослиди з підвищеною гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду на відміну від раніше застосованої стандартної амінослиди. Крім того, вперше показано, що при іммобілізації на модифікованій амінослиді довжина осі суперспіралі молекул ДНК зменшується при підвищенні рівня суперспіралізації молекул на відміну від раніше встановленого факту незмінності довжини осі суперспіралі за зазначених умов. Вперше продемонстровано, що суперспіральні молекули ДНК компактизуються укладанням

вдвічі та вчетверо з утворенням осей суперспіралі другого та третього порядку відповідно.

Вперше візуалізовано висококомпактизовані структури, утворені поодинокими суперспіральними ДНК, – напівсфероїди, сфероїди та тороїди, на відміну від раніше досліджених мультимолекулярних агрегатів ДНК. На основі аналізу отриманих АСМ-зображень розроблено модель конформаційних переходів молекул суперспіральної ДНК при підвищенні щільності супервитків та рівня компактизації.

Вперше одержані та охарактеризовані аміномодифіковані зонди для атомно-силової мікроскопії за допомогою їхньої модифікації в парах похідного аміносилану. На відміну від відомих модифікованих зондів, що отримують модифікацією у розчині і які характеризуються наявністю на поверхні самоасоційованих моношарів молекул, одержані в даній роботі амінозонди мають істотно меншу поверхневу щільність реакційних аміногруп завдяки розробленій технології модифікації зондів у газовій фазі. Це особливо важливе для наступної функціоналізації зондів біополімерами з метою зменшення їхньої кількості на поверхні зонда при вивченні взаємодії пар поодиноких молекул, іммобілізованих на поверхнях зонда та субстрату.

Вперше детально охарактеризовані термодинамічно стабільні інвертовані повтори для штамів патогенних мікобактерій туберкульозу H37Rv та CDC1551 з повністю секвенованим геномом, які характеризуються різною вірулентністю.

Вперше показано, що об'єм молекули ДНК, іммобілізованої на АСМ-субстраті, який визначено безпосередньо з АСМ-зображення та відповідного перерізу молекули, збігається з теоретичним об'ємом ДНК.

Принципову новизну несе пояснення ефекту розширення адсорбованої на слюді ДНК за рахунок зміни висоти та ширини молекули (при збереженні об'єму молекули) на відміну від існуючого пояснення через недосконаlostі процедури підготовки зразка ДНК (висушування, рухливість на субстраті) та недостатню точність вимірювання атомно-силового мікроскопа.

Розроблено принципово новий метод витягування молекул суперспіральної та лінійної ДНК при іммобілізації на поверхню амінослюди із зменшеною поверхневою щільністю заряду.

Аміномодифіковані зонди охарактеризовані не тільки величиною сили адгезії, а й роботою сили адгезії. Тим самим показано можливість одержання нової інформації стосовно їхніх поверхневих властивостей з силових графіків.

**Практичне значення одержаних результатів.** Одним із важливих напрямків сучасної нанобіології і нанобіотехнології є створення біосенсорів, які дозволяють локалізувати протеїни на поверхні та всередині клітинного ядра, на основі АСМ-зондів, функціоналізованих біополімерами, специфічними до зазначених протеїнів. Розроблені автором технології, схеми, методичні підходи та емпірично визначені протоколи направлені на вирішення даної проблеми.

Вперше розроблена автором технологія аміномодифікації зондів в парах похідного аміносилану може бути використана як для виробництва аміномодифікованих зондів для атомно-силової мікроскопії, так і для їх наступної функціоналізації біомолекулами. Розроблена у роботі технологія отримання амінослюди з заданими

властивостями також може бути з успіхом використана при аміномодифікації зондів. Зазначимо, що отримання аміноповерхні зонда із зменшеною гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду (по аналогії з поверхнею амінослюди із зменшеною поверхневою щільністю заряду) дозволить зменшити щільність експонованих на поверхні зонда реакційних аміногруп, а отже, і щільність кон'югованих з ними біополімерів, що необхідно для одного з напрямків нанобіології – силової мікроскопії впізнавання поодиноких молекул.

Запропонований підхід витягування молекул ДНК може бути застосований в експериментальних роботах з фундаментальних досліджень взаємодії ДНК з білками за наявності прикладеної до ДНК сили натягу. Структурні параметри S-ДНК можуть бути використані при моделюванні конформації молекул ДНК на поверхні з різними властивостями при взаємодії з білками, пептидно-нуклеїновими кислотами, природними поліамінами в умовах підвищеної щільності заряду.

Запропоновані методики обчислення об'єму молекул ДНК, іммобілізованих на амінослюді, безпосередньо з АСМ-зображень з застосуванням відповідних подовжніх перерізів, а також методика оцінки поверхневих властивостей амінослюди через візуалізацію адсорбованих суперспіральних молекул ДНК можуть знайти застосування у фундаментальних дослідженнях з нанобіології біополімерів.

Отримані принципово нові результати з компактизації поодиноких суперспіральних молекул ДНК – візуалізації тороїдів, напівсфероїдів, сфероїдів, а також джгутоподібних молекул, які укладаються вдвічі у декілька етапів, – можуть бути використані у вищих навчальних закладах у курсах біофізики, мікробіології, молекулярної біології та, можливо, з часом і нанобіології та нанобіотехнології.

Одержані дисертантом результати з компактизації ДНК використовують у Харківському національному університеті ім. Каразіна у курсах лекцій з фізики біополімерів, молекулярної біології та генетики.

**Особистий внесок здобувача.** Особистий внесок здобувача полягає у формулюванні ідеї, обґрунтуванні мети та задач дисертаційної роботи, а також методів їх вирішення шляхом ініціювання серії досліджень структурних особливостей геномної ДНК мікроорганізмів та механізму компактизації ДНК з метою отримання як фундаментальної інформації щодо структури лінійних та суперспіральних молекул ДНК, так і створення технології модифікації та наступної функціоналізації АСМ-зондів біополімерами та технології отримання амінослюди з заданими властивостями.

Наведені у дисертації теоретичні та експериментальні результати отримані автором самостійно [1-3, 6, 7, 9-22, 27-31] та під його науковим керівництвом [4, 8, 23-26, 32-39].

В роботах [1-4, 6-39] авторові належать ідея дослідження, вибір методів та розробка методичних підходів; постановка задачі роботи [5] була здійснена разом з проф. Любченком Ю.Л.

Основні експериментальні результати у роботі [5], наведені у дисертації, отримані автором самостійно, у роботах [2, 4, 10, 12, 15, 23-25], опублікованих із співавторами, – разом із к.б.н., с.н.с. Лиманською О.Ю. Авторові належать ідеї отри-

мання амінослуди з заданими властивостями, розробка технології та схеми модифікації та функціоналізації біополімерами АСМ-зондів, створення моделі компактизації суперспіральної ДНК при підвищенні рівня суперспіралізації. Відкриття та побудова моделі стиснутої форми ДНК (S-ДНК) було проведено разом із Лиманською О.Ю. та Лиманською Л.О. В усіх роботах автор брав участь в обговоренні отриманих результатів, підготовці та написанні статей.

Планування дисертаційної роботи, коректування та обговорення методик дослідження, інтерпретація отриманих результатів з визначення термодинамічно стабільних інвертованих повторів у геномі мікобактерій проведені разом з науковим консультантом д.м.н., проф. Волянським Ю.Л.

Автор висловлює щиру подяку д.м.н., проф. Волянському Ю.Л. за постійну підтримку, численні плідні обговорення та корисні зауваження, д.ф.-м.н., с.н.с. Косевич М.В. за щиру допомогу та ретельне рецензування роботи, а також к.б.н., с.н.с. Лиманській О.Ю. за конструктивні коментарі та внесок в оформлення результатів роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертації були представлені автором у вигляді стендових доповідей та обговорені на нижченаведених конференціях: 2-ій конференції з оптичної спектроскопії біомолекулярної динаміки (м. Ейлат, Ізраїль, 2006); 5-ому Європейському біофізичному конгресі 15<sup>th</sup> IUPAB & 5<sup>th</sup> EBSA (м. Монпель'є, Франція, 2005); Міжнародній конференції "Microtechnologies for the New Millennium Symposium, Bioengineered and Bioinspired Systems" (м. Маспаломас, Іспанія, 2003); 1-ому конгресі Європейського товариства мікробіологів (м. Любляна, Словенія, 2002); 8-ому Міжнародному симпозіумі "Molecular Aspects of Chemotherapy" (м. Гданськ, Польща, 2001); Міжнародному симпозіумі "Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures" (м. Токіо, Японія, 2001); конференції для молодих науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики (м. Київ, 2001); 185-ому з'їзді Електрохімічного товариства (м. Сан-Франциско, США, 1994); 2-ій Міжнародній конференції "Nanometer Scale Science and Technology" (м. Москва, Росія, 1993); семінарах Інституту біохімії і біофізики Польської академії наук (м. Варшава, Польща, 2002), лабораторії клітинного ядра та сигнальних механізмів університету Кіото (м. Кіото, Японія, 2004), лабораторії молекулярної мікробіології університету Арізони (м. Темпі, США, 1998-1999), відділу нанокристалічних матеріалів Інституту сцинтиляційних матеріалів НТК "Інститут монокристалів" НАН України (м. Харків, 2006), Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (м. Київ, 2006, 2007).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 39 наукових праць, у тому числі 22 статті у фахових наукових журналах, з яких 13 є одноосібними, включаючи 1 огляд, 14 тез доповідей на наукових конференціях, отримано три патенти України.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається із вступу, дев'яти розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Її повний обсяг становить 351 сторінку машинописного тексту, з яких текст займає 309 сторінок. Дисертацію проілюстровано 100 рисунками та 15 таблицями. Перелік використаної літератури

обсягом 33 сторінки охоплює 349 джерел. Загальний обсяг п'яти додатків становить 9 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

**Матеріали і методи досліджень.** В роботі використано лінійну ДНК фага  $\lambda$  довжиною 48502 пари нуклеотидів (п.н.) фірми Promega (США), суперспіральну ДНК pUC8 (довжина 2665 п.н.), лінійну та суперспіральну ДНК pGEMEX (довжина 3993 п.н.; Promega, США), бичачий сироватковий альбумін (БСА, 5 фракція; Pierce, США).

*Атомно-силова мікроскопія.* Для візуалізації лінійних та суперспіральних молекул ДНК, білків у повітрі та клітин у буферному розчині використовували атомно-силові мікроскопи Nanoscope III з D-сканером та Nanoscope IV MultiMode System (Veeco Instruments Inc., США) з E-сканером, який забезпечує максимальний діапазон сканування до 12 мкм. Переважна більшість АСМ-зображень ДНК була записана за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі у режимі “висота” з використанням кантилеверів OMCL-AC160TS (Olympus Optical Co., Японія) з резонансною частотою 340-360 кГц та константою твердості 42 Н/м, а також стандартних незагострених зондів фірми KTEK International (Росія) з резонансною частотою 300-360 кГц.

*Силові вимірювання.* Для характеристики аміномодифікованих субстратів, аміномодифікованих та функціоналізованих біополімерами зондів (шляхом вимірювання сили адгезії) застосовували атомно-силову мікроскопію в режимі силових вимірювань. Вимірювання було проведено з V-подібними кантилеверами із нітриду кремнію з золотим напилюванням, використовуючи зонд E (Microlevers, Park Scientific Instruments, Inc., США), та OMCL-TR400PSA (Olympus Optical Co., Японія). Графіки відхилення зонда – Z позиція, тобто залежності відхилення зонда від відстані між поверхнями зонда та слюди (в подальшому силові графіки), записані за вертикальної частоти сканування 1 Гц та Z-амплітуди 50-200 нм. Графіки сила – відстань, з яких визначали силу адгезії та роботу сили адгезії, отримані перетворенням графіків відхилення зонда – Z позиція за допомогою програмного забезпечення Nanoscope III (версія 4.23b15) та Nanoscope IV (версія 5.12r3, Veeco Instruments Inc., США). Величину сили адгезії, що відповідає максимальному відхиленню зонда на кривій віддалення, визначали як силу розриву, тобто силу, яку необхідно прикласти для виведення із контакту поверхонь зонда і субстрату.

Константу твердості визначали індивідуально для кожного кантилевера за допомогою методу резонансної частоти Клевленда (Cleveland, 1993). Значення сили адгезії та її роботи усереднювали для 50-196 графіків віддалення для різних варіантів модифікації АСМ-зондів. Всього для характеризувannya АСМ-зондів і субстратів було записано та оброблено понад 4000 силових графіків. Статистичну обробку проводили за допомогою програмних пакетів Kaleidagraph (версія 3.01, США) та Origin (версія 5, США).

*Модифікація і функціоналізація АСМ-зондів та субстратів.* Процедuru отримання стандартної амінослиюди та амінозондів (модифікованих зондів, поверхня яких рівномірно покрита аміногрупами) здійснювали за допомогою модифікації свіжосколотої слиюди аміногрупами у парах перегнаного 3-амінопропілтриетоксисилану (АПТЕС), який отримано від Aldrich (США), United Chemical Technologies, Inc. (США) та Wakenyaku (Японія). В ході виконання дисертаційної роботи розроблено та створено дві установки для вакуумної перегонки АПТЕС. Перший варіант установки було застосовано в університеті Арізони (США), а другий варіант, який дозволив отримати амінослиюду з можливістю регулювання поверхневої щільності заряду та гідрофобності, – в університеті Кіото (Японія).

Для функціоналізації амінозондів використовували два гомобіфункціональних лінкерних агенти, що містять на обох кінцях амінореакційну ефірну групу (NHS-ефір): дисукцинімідил суберат (Pierce, США) (ДСС-лінкер) та етиленгліколь-біс (N-гідроксисукцинімідний ефір янтарної кислоти) (ЕГС-лінкер). Процедuru наступної функціоналізації АСМ-зондів, для якої використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА), ДНК та глютаральдегід, проводили у комерційній рідинній чашечці АСМ.

Субстрати для АСМ, які використовували для іммобілізації біополімерів, можна розташувати у порядку зростання гідрофобності та поверхневої щільності позитивного заряду: свіжосколота слиюда < амінослиюда зі зменшеною гідрофобністю < стандартна амінослиюда < модифікована амінослиюда.

*Підготовка зразків ДНК для АСМ та ПЛР.* На смугу амінослиюди площею 1 см<sup>2</sup> наносили краплю розчину ДНК у ТЕ буфері (10 мМ трис-НСІ рН 7,9, 1 мМ ЕДТА) об'ємом 10 мкл, промивали після 2-хвилинної експозиції деіонізованою водою, обдували потоком аргону та витримували зразок під тиском 100 мм рт. ст. протягом 20 хвилин.

Лінійну ДНК рGEMEX отримували ферментативною обробкою суперспіральної ДНК рGEMEX (рис. 1) рестриктазою ScaI (New England Biolabs, Англія). Сконструйовані праймери обмежували фрагмент ДНК, що містить промотор та область термінації транскрипції Т7 РНК-полімерази. Для ампліфікації фрагмента лінійної ДНК використовували полімеразну ланцюгову реакцію.

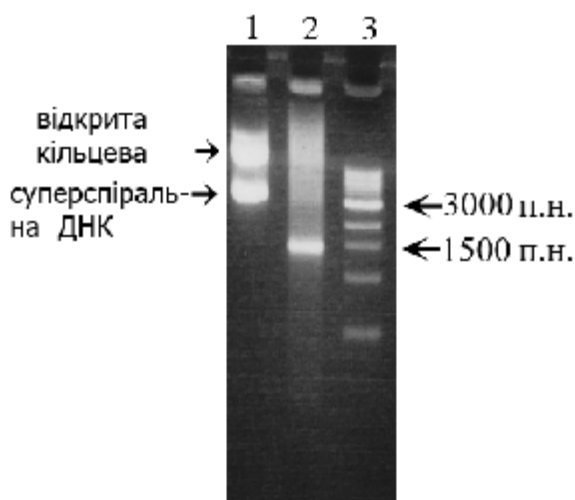
Для очищення ампліфікованого фрагмента ДНК використовували наступну процедуру. Після проведення електрофорезу вирізали смугу гелю, що містить амплікон, при цьому опромінюючи гель довгохвильовим випромінюванням УФ-джерела низької інтенсивності (BioRad, США). Для подальшої очистки амплікона від нуклеотидів, праймерів, ДНК-полімерази та бромистого етидію використовували набір QIA-quick PCR purification kit (QIAGEN, Японія) відповідно до рекомендацій виробника, а також екстракцію фенол/хлороформом з наступним переосадженням етанолом (рис. 2).

Для проведення ПЛР, крім стандартної Таq ДНК-полімерази ("Promega", США), використовували термостабільні ДНК-полімерази високої точності двох видів – Pyrobest ДНК-полімеразу (TaKaRa Co., Японія) та Invitrogen Platinum ДНК-полімеразу (Invitrogen, Японія). Для молекулярного моделювання структури ДНК викори-

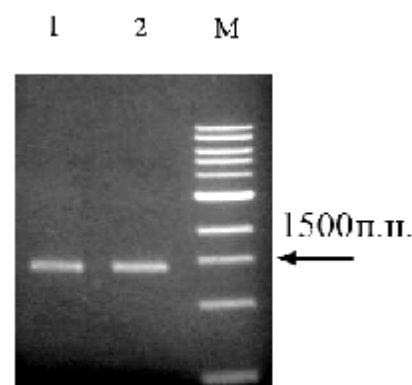
стовували вільно поширюваний програмний пакет VMD (версія 1.8.3).

**Візуалізація ціанобактерій.** В роботі використано клітини ціанобактерій штаму *Synechocystis* PCC 6803. Вимірювання проводили у 50 мМ TES буфері (N-трис [гідроксиметил]-метил-2-аміноетансірчана кислота) за кімнатної температури. Для отримання зображень ціанобактерій у буферному розчині використовували стандартну скляну рідинну чашечку. АСМ-зображення у водному розчині було записано у вібруючому варіанті АСМ, за частоти сканування 3-4 Гц та амплітуди 20-40 мВ за допомогою стандартних V-подібних кантилеверів з константою твердості  $K = 0,20-0,27$  Н/м (Digital Instruments, США).

**Проведення транскрипції.** Як матрицю для транскрипції використовували амплікон довжиною 1414 п.н., що містив промотор та область термінації транск-



**Рис. 1.** Аналіз суперспіральної ДНК pGEMEX1 після проведення електрофорезу у 2 % агарозі та наступного забарвлення бромистим етидієм. 1 – суперспіральна ДНК pGEMEX1 (3993 п.н.); 2 – неочищений амплікон довжиною 1414 п.н.; 3 – 1000 п.н. маркер молекулярної маси



**Рис. 2.** Очищені амплікони після проведення електрофорезу, вирізання смуги з ПЛР-продуктом і обробки за допомогою набору для екстракції QIAquick extraction kit. Ампліфікація з ДНК-полімеразою: 1 – Pyrobest TaKaRa; 2 – Invitrogen Platinum. М – 1000 п.н. маркер

рипції РНК-полімерази бактеріофага Т7. Реакцію транскрипції проводили з використанням наборів для транскрипції за допомогою Т7 РНК-полімерази (Promega, США), MegaScript T7 (Ambion, США) та набору від New England Biolabs (Англія) за різних температурних та часових параметрів. Для видалення матриці ДНК та деградації ДНК, що може контамінувати препарат РНК, після проведення транскрипції до реакційної суміші додавали ДНКазу I (Ambion, США) та інкубували протягом 15 хв. за температури 37 °С. Для інактивації ДНКазу реакційну суміш інкубували за температури 70 °С протягом 10 хв. Для контролю ефективності транскрипції після зупинки транскрипції проводили електрофрез у 1,2 % агарозному гелі, що містив 1,8 % формальдегіду.

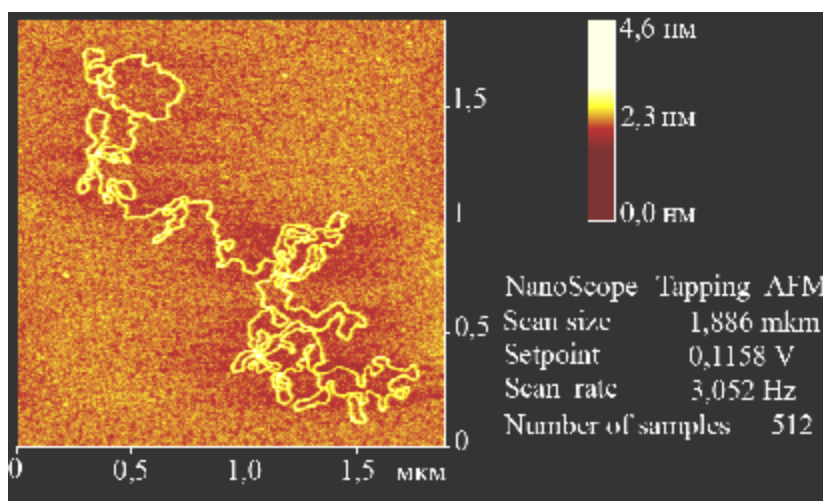
### Результати досліджень та обговорення.

**Візуалізація тягнених молекул ДНК.** Поверхня слюди, стандартного субстрату для іммобілізації біомолекул при АСМ-дослідженнях, негативно заряджена у буферних розчинах за нейтральних значень рН та невисокої іонної сили (Butt, 1991). Тому для іммобілізації за даних умов на поверхні слюди негативно зарядже-

них молекул ДНК використовують декілька підходів, що дозволяють змінити сумарний поверхневий заряд слюди з негативного на позитивний. Методика приготування зразка ДНК на амінослюді забезпечує сильне зв'язування молекул ДНК з субстратом за рахунок суперпозиції електростатичних і вандерваальсових сил. При цьому іммобілізація молекул ДНК на поверхні амінослюди у водному розчині здійснюється переважно через електростатичну взаємодію між негативно зарядженими фосфатними групами ДНК та позитивно зарядженими аміногрупами слюди (рис. 3).

Добре відомо, що ДНК є еластичною молекулою, яка може бути витягнутою, подібно до пружини. І такі тягнені молекули ДНК зі збільшеною відстанню між нуклеотидами уздовж осі дуплекса були отримані та вивчені декількома групами дослідників. За допомогою сучасних методів наноманіпулювання поодинокими молекулами було встановлено, що молекулу ДНК можна розтягнути у 1,7 разу до міжнуклеотидної відстані  $H = 5,8 \text{ \AA}$  на відміну від  $H = 3,4 \text{ \AA}$  для В-ДНК (Cluzel et al., 1996; Bustamante et al., 1996).

Беручи до уваги відомі експериментальні дані про еластичність молекул ДНК (Leuba et al., 2004) та важливість дослідження фундаментальних мікромеханічних властивостей молекули ДНК, нами розроблено новий метод отримання витягнутих молекул ДНК з їх наступною візуалізацією за допомогою АСМ. Розроблений метод є надзвичайно простим та ефективним: він дозволяє отримувати тягнені молекули ДНК (рис. 4) при експозиції краплі розчину ДНК на поверхні амінослюди зі зменшеною гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду. Тягнені молекули ДНК формуються у процесі підготовки зразка для АСМ-візуалізації, а саме, при промиванні слюди ультрачистою водою після експозиції з розчином ДНК. Важливо, що точно таку ж процедуру підготовки зразка з інтенсивним промиванням направленим потоком води поверхні слюди ми використовували і для стандартної, і для модифікованої амінослюди із збільшеною гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду. Проте тягнені молекули ДНК формувалися тільки на поверхні амінослюди зі зниженою гідрофобністю. Аналіз сукупності даних з візуалізації лі-

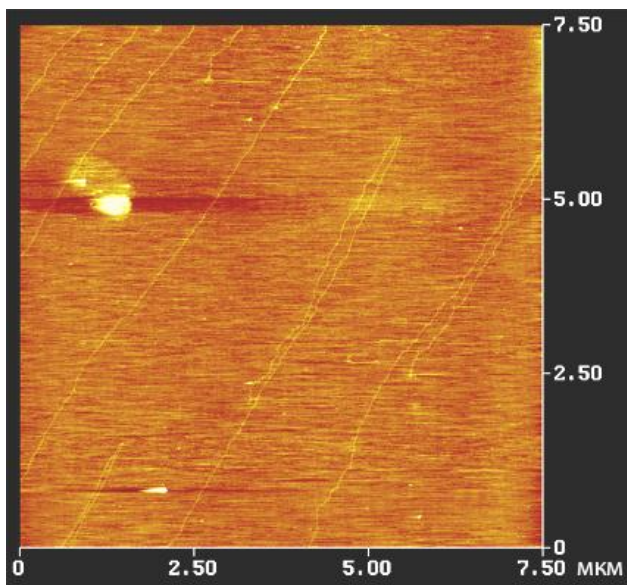


**Рис. 3.** АСМ-зображення молекули ДНК фага  $\lambda$ , іммобілізованої на стандартній амінослюді. Розмір кадру  $1,8 \text{ мкм} \times 1,8 \text{ мкм}$ . Наведено шкалу градацій кольору, яка відповідає діапазону координати Z від 0 до 4,6 нм

нійних та суперспіральных ДНК на різних субстратах вказує, що формування витягнутих молекул ДНК обумовлено поверхневими властивостями субстрату, на якому вони іммобілізовані під впливом механічної енергії спрямованого потоку во-

ди.

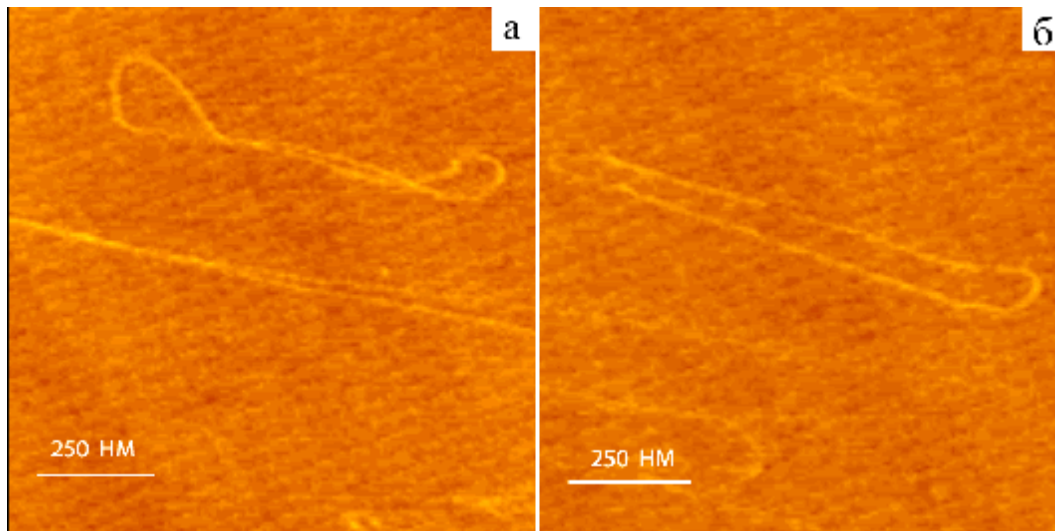
Через використання амінослюди зі зменшеною щільністю поверхневих аміногруп різко зменшується число утворених зв'язків між електронегативними сайтами ДНК та позитивно зарядженими аміногрупами слюди. Тому під впливом струму води молекули ДНК витягуються паралельно напрямку, в якому проводиться промивання поверхні слюди. Вимірювання контурної довжини поодинокі нативної молекули ДНК з субнанометровою роздільною здатністю, що є відмітною особливістю АСМ, дозволяє визначити, знаючи кількість пар нуклеотидів в даній молекулі, відстань між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі ДНК. Відстанню між основами, або райзом (rise), називається відстань між площинами основ, а відстанню між нуклеотидами вздовж осі спіралі (H) – проекція відстані між основами на вісь подвійної спіралі ДНК. Збільшення контурної довжини суперспіральних молекул ДНК (ссДНК) pGEMEX від 1243 нм (характерного значення для невитягнутої молекули) до 1943 нм (рис. 5а) та 2140 нм (рис. 5б) означає, що витягування ссДНК у 1,56 та у 1,72 разу призводить до зростання міжнуклеотидної відстані до  $H = 4,87 \text{ \AA}$  та  $H = 5,36 \text{ \AA}$  відповідно. Отримані дані для тягнутих молекул ДНК pGEMEX добре узгоджуються з раніше опублікованими результатами дослідження тягнутих ДНК різними методами, в тому числі і за допомогою методу оптичного пінцета (Leuba et al., 2003). Дуже важливим є той факт, що тягнуті молекули ДНК



**Рис. 4.** АСМ-зображення витягнутих молекул ДНК фага  $\lambda$ , які іммобілізовані на амінослюді зі зменшеною поверхневою щільністю аміногруп. Розмір кадру 7,5 мкм  $\times$  7,5 мкм

одержано на поверхні амінослюди із зменшеною поверхневою щільністю аміногруп. Відразу виникає низка питань. Чи можливо отримати амінослюду з заданими властивостями, а саме з підвищеною поверхневою щільністю аміногруп? Що буде відбуватися з молекулою ДНК при іммобілізації на поверхні амінослюди з підвищеною щільністю аміногруп? Якщо на амінослюді із зменшеною поверхневою щільністю аміногруп молекули ДНК витягуються, чи можуть вони бути стиснутими подібно до пружини при іммобілізації на поверхні слюди з підвищеною щільністю аміногруп? Пошуку відповідей на ці запитання були присвячені дослідження, результати яких наведено у наступних розділах роботи.

*S*-ДНК – суперспіральна ДНК з відстанню  $1,94 - 2,19 \text{ \AA}$  між парами основ вздовж осі дуплекса. За допомогою АСМ-візуалізації молекул ДНК та вимірювання їхньої контурної довжини була визначена відстань між нуклеотидами



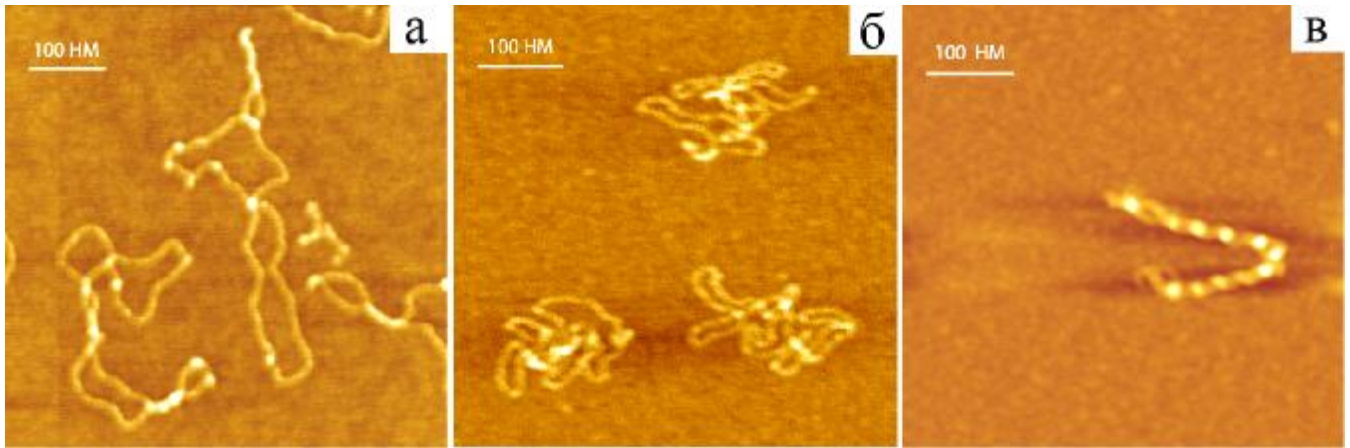
**Рис. 5.** АСМ-зображення витягнутих суперспіральних молекул ДНК рGEMEX, іммобілізованих на амінослюді зі зменшеною щільністю аміногруп. (а) – контурна довжина ДНК  $L = 1943 \text{ нм}$ , що відповідає відстані між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі  $H = 4,87 \text{ \AA}$ . Розмір кадру  $1,13 \text{ мкм} \times 1,13 \text{ мкм}$ . (б) – контурна довжина ДНК  $L = 2140 \text{ нм}$ ,  $H = 5,36 \text{ \AA}$ . Розмір кадру  $1,07 \text{ мкм} \times 1,07 \text{ мкм}$

вздовж осі спіралі ДНК. Показано, що для лінійної ДНК (а саме для амплікона, отриманого після проведення ПЛР з використанням високоточних видів термостабільної ДНК-полімерази), іммобілізованої на свіжосколотій слюді, контурна довжина зменшується у порівнянні із очікуваним теоретичним значенням, характерним для В-ДНК. На основі визначеної відстані ( $H = 3,07 \text{ \AA}$ ) зроблено припущення, що лінійні молекули ДНК, адсорбовані на гідрофільній слюді, знаходяться у А-формі, перехід до якої індують як висушування зразка, так і взаємодія з поверхнею слюди.

Для суперспіральної ДНК рGEMEX, іммобілізованої на свіжосколотій слюді (рис. 6а), були візуалізовані плектонемічні суперспіральні молекули ДНК, що характеризуються невисоким значенням щільності супервитків (7 суперспіральних витків, або вузлів,  $\sigma = -0,024$ ). Раніше аналогічні зображення були отримані для плазмідних ДНК, адсорбованих на субстратах, оброблених полікатионами полілізином, сперміном (Jovin et al., 2003; Tanigawa et al., 1998). Суперспіральні молекули ДНК рGEMEX на стандартній амінослюді (рис. 6б) компактніші, однак їхня контурна довжина, обмірювана із АСМ-зображення, лише незначно менша ( $L = 1216 \text{ нм}$ ) у порівнянні з контурною довжиною плектонемічних молекул ДНК на слюді з катіонами  $\text{Mg}^{2+}$  ( $L = 1243 \text{ нм}$ , рис. 6а). Для молекул ДНК, зображених на рис. 6а, довжина суперспіральної осі (осі подвійної спіралі суперспіральної молекули ДНК, яка може бути закрученою у вигляді спіралі на відміну від осі лінійної молекули ДНК) становить  $l = 466 \text{ нм}$ .

В той же час на модифікованій амінослюді (рис. 6в) з підвищеною гідрофобніс-

тю та поверхневою щільністю позитивного заряду порівняно із стандартною амінослюдою поряд з плектонемічними суперспіральною молекулами ДНК були візуалізовані поодинокі молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, ступінь



**Рис. 6.** АСМ-зображення поодиноких суперспіральних молекул ДНК pGEMEX, іммобілізованих на різних субстратах: свіжосколотій слюді (а), отримане після нанесення краплі розчину ДНК у 10 мМ HEPES буфері, що містить 2,5 мМ  $MgCl_2$ , стандартній амінослюді (б) та модифікованій амінослюді (в). Контурна довжина ДНК pGEMEX становить: (а) – 1243 нм; (б) – 1216 нм; (в) – 873 нм. Довжина суперспіральної осі молекул ДНК: (а) – 466 нм; (в) – 382 нм. Розмір кадру: а – 583 нм × 583 нм; б – 500 нм × 500 нм; в – 500 нм × 500 нм

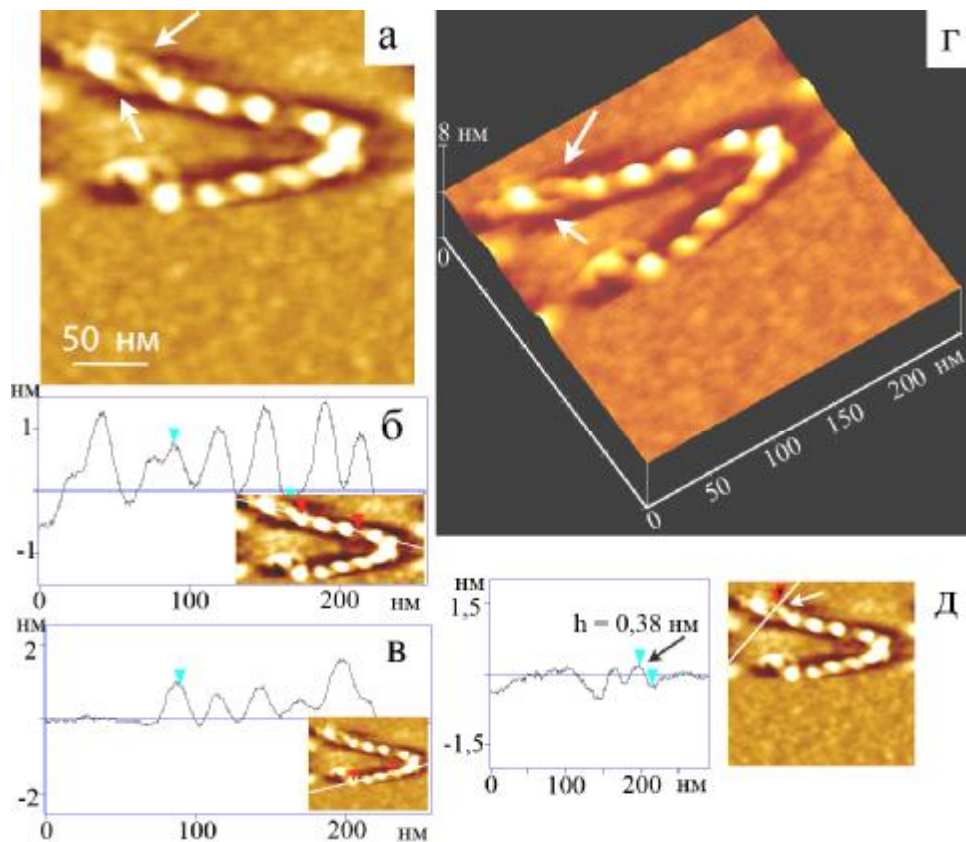
суперспіралізації яких значно вищий у порівнянні з раніше досягнутим рівнем як експериментально, так і розглянутим теоретично.

Молекула суперспіральної ДНК на рис. 6в, іммобілізована на модифікованій амінослюді, різко відрізняється за своїми параметрами від молекул ДНК на рис. 6а та рис. 6б: кількість вузлів зросла до 11, довжина суперспіральної осі зменшилася до 382 нм, а розрахована із АСМ-зображення контурна довжина склала 873 нм (!).

Оскільки довжина секвенованої послідовності ДНК pGEMEX становить 3993 п. н., була визначена відстань між нуклеотидами вздовж осі подвійної спіралі ДНК. І якщо для ДНК pGEMEX, зображеної на рис. 6а, міжнуклеотидна відстань  $H = 3,11 \text{ Å}$ , то для надсуперспіралізованої ДНК на рис. 6в розраховане значення склало  $H = 2,19 \text{ Å}$  (!). Значення  $H = 3,11 \text{ Å}$  узгоджується з раніше наведеними фактами незначного зменшення контурної довжини ДНК, висушеної на слюді, у припущенні В-форми ДНК (Bustamante et al., 2003). Однак величина  $H = 2,19 \text{ Å}$  вказує на те, що суперспіральні молекули ДНК, іммобілізовані на амінослюді з підвищеною щільністю заряду, зазнають значних внутрішньомолекулярних перетворень, які ведуть не тільки до збільшення рівня суперспіралізації, але і до значного зменшення міжнуклеотидної відстані. Відстань між нуклеотидами для інших надсуперспіральних молекул ДНК варіювала від  $1,94 \text{ Å}$  до  $2,19 \text{ Å}$  (рис. 7 та рис. 8).

Як один із параметрів, який дозволяє відрізнити поодинокі молекули від димера та інших висококомпактизованих структур, утворених декількома молекулами, ми вибрали об'єм молекули ДНК, розрахований безпосередньо із АСМ-зображення відповідної молекули. Його значення незначно відрізняється від теоретично розрахованого виключеного об'єму молекули ДНК pGEMEX ( $V_{\text{викл.}} = 4010 \text{ нм}^3$ ) та доз-

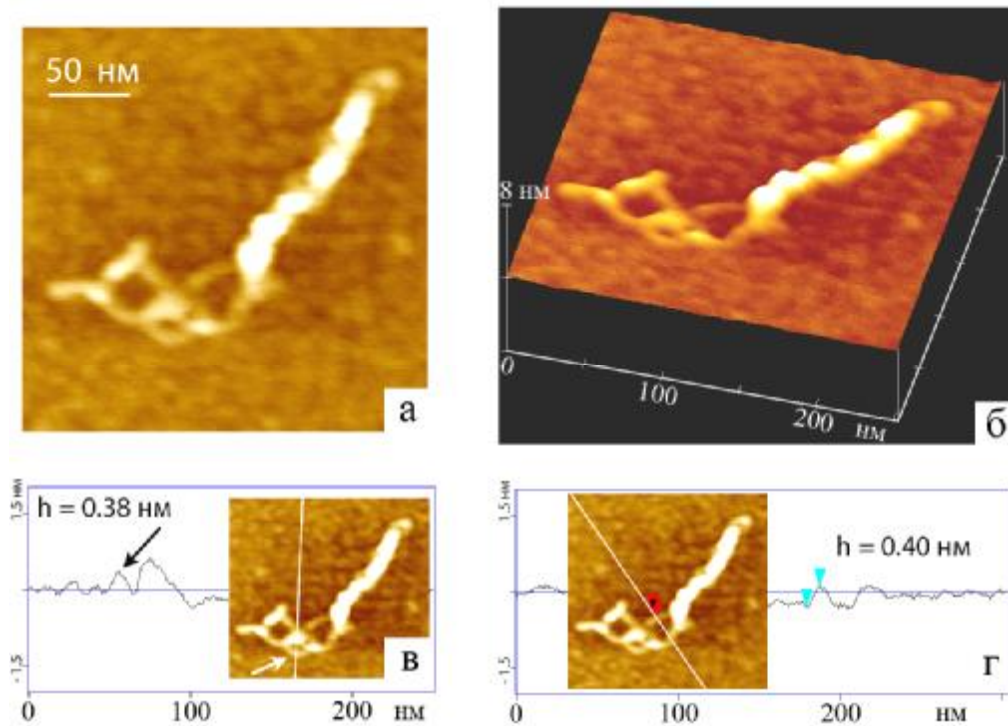
воляє надійно диференціювати поодинокі молекули ДНК від агрегатів. Для точнішого обчислення об'єму ми використовували не обмірюване в одному місці значення висоти молекули (яке значно варіює для надсперспіралізованих ДНК: за характерної висоти однієї нитки подвійної спіралі  $h = 0,3-0,4$  нм висота у вузлах, утворених двома нитками ДНК, що перетинаються, може досягати  $h_{\max} = 1,3-1,8$  нм),



**Рис. 7. (а) АСМ-зображення поодинокій надсперспіральній ДНК рGEMEX в S-формі, отримане після іммобілізації на поверхню модифікованої амінослиди. Розмір кадру 250 нм × 250 нм. Відстань між нуклеотидами вздовж осі дуплекса для даної молекули  $H = 2,19$  Å. Стрілками показано дві нитки, кожна із яких утворена подвійною спіраллю ДНК, закручені в праву надсперспіральну ДНК з чітко помітними 11 надвитками (вузлами). (б), (в) Подовжні перерізи суперспіральної молекули ДНК рGEMEX. Січну площину проведено перпендикулярно площині рисунка через лінію, показану на вставках. Об'єм молекули розраховано як добуток ширини молекули на суму площ подовжніх перерізів. Шість (рис. 7б) та п'ять піків (рис. 7в) на профілях перерізів відповідають шести та п'яти вузлам. (г) Тривимірне зображення молекули. Стрілками вказано нитки дуплекса, що частково розійшлися та утворюють надсперспіральну молекулу. (д) Поперечний переріз, виконаний через нитки дуплекса, що розійшлися. На вставці показано лінію, через яку проведено січну площину. Два піки відповідають профілям перерізів двох ниток, із яких було визначено їхню висоту. Максимальна висота піка відповідає висоті фрагмента молекули. Стрілками на перерізі та на вставці вказано пік та відповідна йому подвійна спіраль ДНК, висота якої становить  $h = 0,38 \pm 0,05$  нм**

а, як правило, подовжній переріз молекули січною площиною, перпендикулярною площині слиди. Із наведених в табл. 1 параметрів молекул суперспіральних ДНК можна бачити, що значення об'єму для надсперспіральних молекул ДНК (поз. 3-5

в табл. 1, рис. 6в, рис. 7 та рис. 8) збігається зі значенням об'єму для поодинокі суперспіральної молекули (поз. 1 табл. 1, рис. 6а) в межах погрішності вимірювання ( $\pm 7,1\%$ ).



**Рис. 8. (а) АСМ-зображення поодинокі лівої надсуперспіральної ДНК рGEMEX в S-формі. Розмір кадру  $250\text{ нм} \times 250\text{ нм}$ . (б) Тривимірне зображення молекули. (в) Профіль поперечного перерізу, виконано січною площиною вздовж лінії, яку показано на вставці. Стрілки вказують на пік та відповідний йому фрагмент нитки подвійної спіралі ДНК, висота якої становить  $h = 0,38\text{ нм}$ . (г) Профіль поперечного перерізу, виконано вздовж лінії, показаної на вставці. Стрілка вказує на пік, із якого було визначено висоту відповідної частини подвійної спіралі ДНК  $h = 0,40\text{ нм}$**

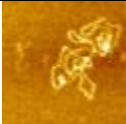
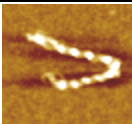
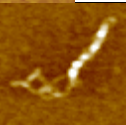
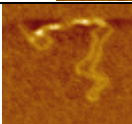
Іншим важливим результатом, що свідчить про надсуперспіралізацію поодинокі молекул, а не джгутів, є висота закручених ниток, утворених дволанцюговою ДНК. На АСМ-зображенні (рис. 7а) та на тривимірному зображенні даної молекули (рис. 7г) стрілками вказано чітко помітні нитки даної молекули. Виміряна висота цих ниток, які частково розійшлися (рис. 7д), показує, що зазначені нитки утворено дволанцюговою ДНК, оскільки висота кожної нитки ( $h = 0,38\text{ нм}$ ) дорівнює висоті нитки поодинокі іммобілізованої на немодифікованій слюді молекули ДНК (поз. 1, табл. 1), що, в свою чергу, збігається з літературними даними з АСМ-вимірювання висоти ДНК, адсорбованої на субстраті (Tanigawa et al., 1998). Аналогічні вимірювання були проведені і для іншої надсуперспіральної молекули ДНК (рис. 8). Як значення об'єму (поз. 4, табл. 1), так і вимірювання висоти ниток даної молекули ( $h = 0,38\text{--}0,40\text{ нм}$ ) підтверджує, що і дана надсуперспіральна структура утворена однією (!) молекулою ДНК. Значення об'ємів для інших візуалізованих висококомпактизованих структур (напівсфероїда, сфероїда, димерів, тримера) підтверджують надійність даного методу визначення об'єму конденсованих структур та ефективність їхньої диференціації.

Такі стиснуті, подібно до пружини, суперспіральні молекули ДНК зі зменше-

ною відстанню між нуклеотидами вздовж осі дуплекса  $H \sim 2 \text{ \AA}$  порівняно з добре відомими формами ДНК було названо нами новою формою ДНК – S-ДНК (“S” – від англійського слова “spring” або пружина).

Таблиця 1

**Параметри суперспіральних молекул ДНК pGEMEX, визначені із АСМ-зображень**

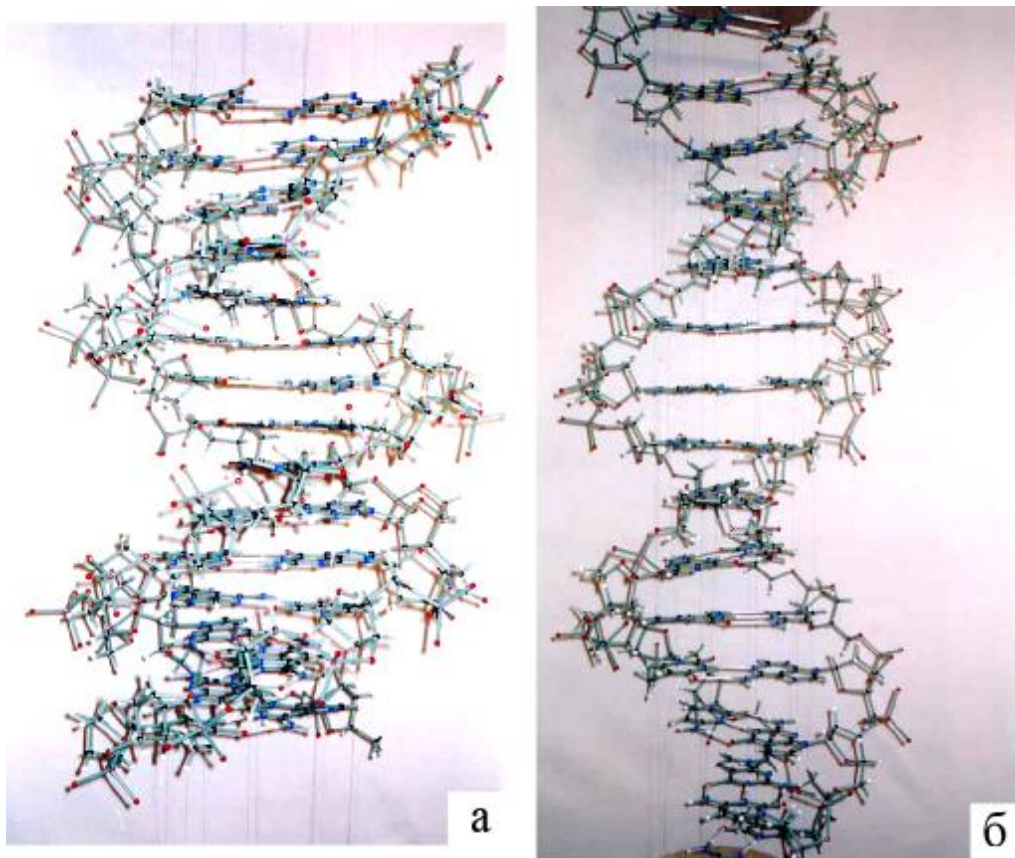
| По-зи-ція | Молекула                                                                            | Ви-сота $h_{\max}$ (нм) | Ви-сота $h_{\min}$ (нм) | Контур-на дов-жина супер-спіраль-ної мо-лекули $L$ (нм) | Дов-жина супер-спі-раль-ної осі $l$ (нм) | Контур-на дов-жина релаксо-ваної молеку-ли $L_{\text{rel}}$ (нм) | Відстань між нук-леотида-ми вздовж осі спіра-лі $H$ (Å) | Об’єм $V$ (нм <sup>3</sup> ) |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------|
| 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                         |

Чи існують просторові обмеження для нуклеотидів в S-ДНК? Побудовані нами моделі фрагмента S-ДНК (рис. 9а) та В-ДНК (рис. 9б) довжиною 15 п.н. демонструють принципову можливість існування стиснутих молекул S-ДНК, які можуть бути проміжним етапом при компактизації поодиноких суперспіральних молекул до рівня сфероїдів та мінітороїдів. Наведені результати свідчать, що стискування суперспіральних молекул ДНК обумовлено поверхневими властивостями субстрату – високою гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду модифікованої амінослюди, – на якому іммобілізовані молекули ДНК. Важливо, що при цьому утворюються як ліві, так і праві надсуперспіральні молекули ДНК, які були візуалізовані.

Отримані результати показують, що надсуперспіралізація, яка веде до стискування поодиноких молекул ДНК, може відбуватися *in vitro* за відсутності протеїнів, а необхідною умовою цього є високі поверхнева щільність позитивного заряду та гідрофобність субстрату, на якому іммобілізована суперспіральна ДНК.

Стискування ДНК, знайдене нами, – вельми цікаве явище у структурній організа-

ції нуклеїнових кислот. Виходячи із отриманих даних, його механізм уявляється далеко не тривіальним. У створених експериментальних умовах, можливо, реалізу-



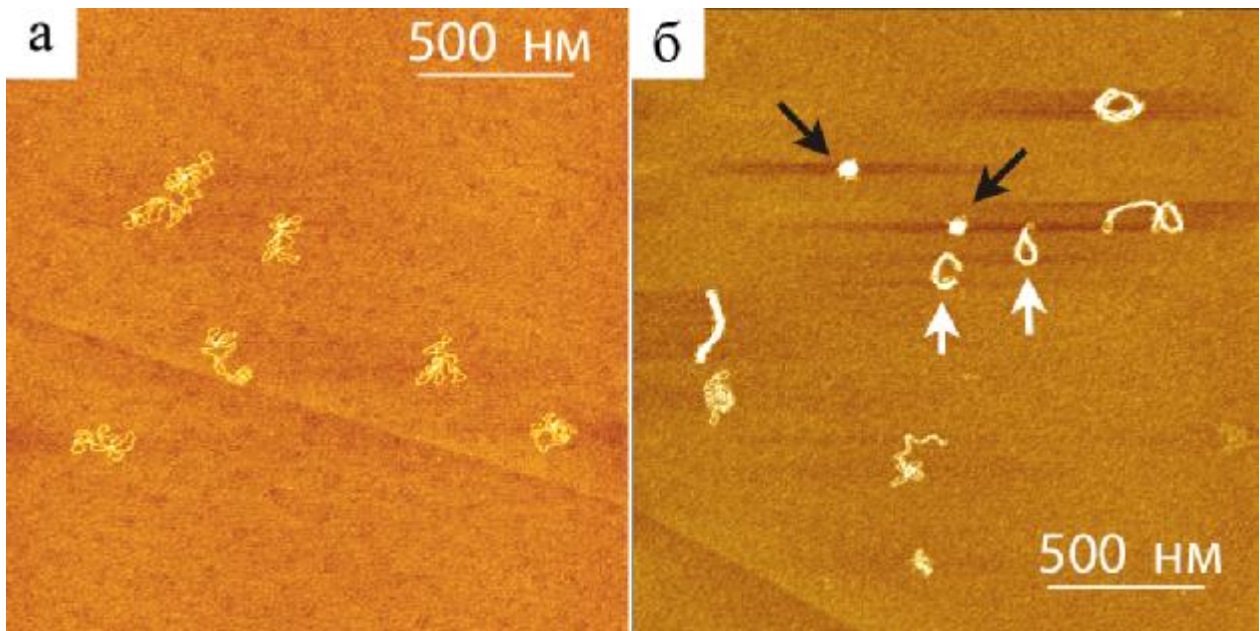
**Рис. 9.** Модель фрагмента ДНК довжиною 15 пар нуклеотидів в S-формі (відстань між парами основ вздовж осі спіралі  $H = 2,0 \text{ \AA}$ ) (а) та В-формі ( $H = 3,4 \text{ \AA}$ ) (б). Послідовність „+”-нитки: 5' - aag gtc ttc ggt cgt - 3'. Спіральний повтор для обох форм ДНК становить 10,5 пар нуклеотидів на виток

ється вплив дуже багатьох факторів. По-перше, це висока щільність позитивного поверхневого заряду амінослюди, на якій іммобілізовані молекули ДНК. По-друге, різка зміна екранування фосфатних груп (як наслідок іммобілізації на субстраті з підвищеною щільністю позитивного заряду), що призводить до підвищеної нейтралізації їхнього негативного заряду. По-третє, можливе сильне перегрупування сітки водневих зв'язків зв'язаної води в області стекінга пар основ. По-четверте, можливим є конкурентне вбудовування  $\text{NH}_2$ -груп поверхневого шару амінослюди у міжплощинний водневий зв'язок нуклеотидів.

**Компактизація суперспіральної ДНК на модифікованій амінослюді.** Раніше було показано (Vinograd et al., 1971), що довжина осі суперспіральної ДНК залишається постійною при збільшенні щільності супервитків і становить  $\sim 35 \%$  контурної довжини релаксованої молекули. Ця умова виконується для молекул ДНК рGEMEX, що іммобілізовані на свіжосколотій слюді, яка характеризується відносно невисокою поверхневою щільністю заряду. Іммобілізація суперспіральних ДНК на модифікованій амінослюді, що має підвищену поверхневу щільність заряду у порівнянні не тільки зі свіжосколотою, а й зі стандартною амінослюдою, веде до істотної компактизації молекул ДНК (рис. 10), які характеризуються по-

дальшим зменшенням довжини суперспіральної осі.

З 108 індивідуальних молекул ссДНК, які було досліджено, найхарактерніші ва-



**Рис. 10.** Зображення суперспіральної ДНК рGEMEX (довжина 3993 п.н.) у повітрі, отримане за допомогою атомно-силового мікроскопа після нанесення розчину ДНК у ТЕ буфері на поверхню стандартної амінослюди (а) та модифікованої амінослюди (б), яка характеризується вищим рівнем гідрофобності та підвищеною поверхневою щільністю аміногруп (тобто підвищеною щільністю позитивного заряду) порівняно зі стандартною амінослюдою. Представлено суперспіральні молекули ДНК з різним рівнем компактизації: від плектонемічних (а) до надсуперспіральних молекул (б) з різною довжиною суперспіральної осі (дві молекули у тороїдальній та наближеній до тороїдальної конформації показано білими вертикальними стрілками), а також у конформації сфероїда (два сфероїди показано похилими чорними стрілками). Розмір кадру зображень 2 мкм × 2 мкм

ріанти молекул з відповідними параметрами представлено в табл. 2 і табл. 1. З них кількість плектонемічних суперспіральних ДНК (позиція А2 у табл. 2) з низькою щільністю супервитків  $\sigma \sim -0,02$  дорівнює 21 %; надсуперспіральні ДНК з високим значенням  $\sigma \sim -0,13$ , що утворюють суперспіральну вісь першого порядку (В3), – 12 %; надссДНК, що утворюють вісь суперспіралі другого порядку (С3, В2, С2), – 27 %; молекули, що утворюють суперспіральну вісь третього порядку (D2, D3, E2), – 14 %; найбільш висококомпактизовані молекули – сфероїди – 17 %.

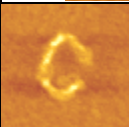
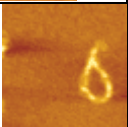
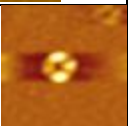
Довжина суперспіральної осі першого порядку молекул ссДНК становить  $\sim 466 - 570$  нм. При підвищенні рівня компактизації ДНК утворюється вісь суперспіралі другого порядку (рис. 11) довжиною  $\sim 280$  нм (що становить  $\sim 20$  % від контурної довжини релаксованої молекули). В результаті подальшої компактизації утворюються молекули з ще вдвічі меншою довжиною суперспіральної осі (довжина осі третього порядку дорівнює  $l = 140$  нм, що становить  $\sim 10$  % від контурної довжини релаксованої молекули, поз. D2 у табл. 2), мінітороїди діаметром  $\sim 50$  нм (рис. 12), а також молекули у сферичній конформації – напівсфероїди та сфероїди (рис. 11).

Оскільки раніше конденсацію ДНК під впливом різних факторів було виявлено тільки для димерів, тримерів, але не для поодиноких молекул ДНК (Hansma, 1997;

Dunlap, 1997), розглянемо детальніше С-подібну надсуперспіральну молекулу (рис. 11), конформація якої подібна до тороїда. АСМ-зображення цієї молекули з вищою роздільною здатністю (рис. 11а) та її тривимірне зображення (рис. 11в) наочно де-

Таблиця 2

**Параметри надсуперспіральних молекул ДНК рGEMEX, визначені із АСМ-зображень. У дужках вказано кількість візуалізованих молекул для кожного варіанта. Значення виключеного об'єму для ДНК рGEMEX дорівнює  $V = 4010 \text{ нм}^3$**

| Позиція на рис. 13 | Молекула                                                                            | Висота $h_{\max}$ (нм) | Висота $h_{\min}$ (нм) | Контурна довжина суперспіральної молекули $L$ (нм) | Довжина суперспіральної осі $l$ (нм) | Уявний об'єм $V$ (нм <sup>3</sup> ) |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 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                                |

монструють, що дану надсДНК утворено декількома чітко помітними нитками (стрілками вказано частину молекули, утворену трьома нитками, які локально розійшлися). Показаний на рис. 11б профіль перерізу, проведеного через ці нитки (на вставці показано лінію, вздовж якої проведено січну площину перпендикулярно

площині рисунка), дозволяє визначити їх висоту. Необхідно відзначити, що вимірювання висоти біомолекули, іммобілізованої на субстраті, з субнанометровою роздільною здатністю (!) є вкрай важливою особливістю атомно-силової мікроскопії, що вигідно відрізняє її і в цьому відношенні від електронної мікроскопії. Оскільки висота двох ниток ДНК становить  $h = 0,3$  нм (що відповідає характерному значенню висоти для дволанцюгової молекули ДНК, іммобілізованої на слюді (Tanigawa et al., 1998)), а висота третьої нитки дорівнює  $h = 0,6$  нм, то це означає, що дві нитки надсДНК, що розійшлися, є дволанцюговими нитками ДНК, а нитку, висота якої дорівнює подвійній висоті молекули ДНК на слюді ( $h = 0,6$  нм), утворено двома закрученими дволанцюговими нитками.

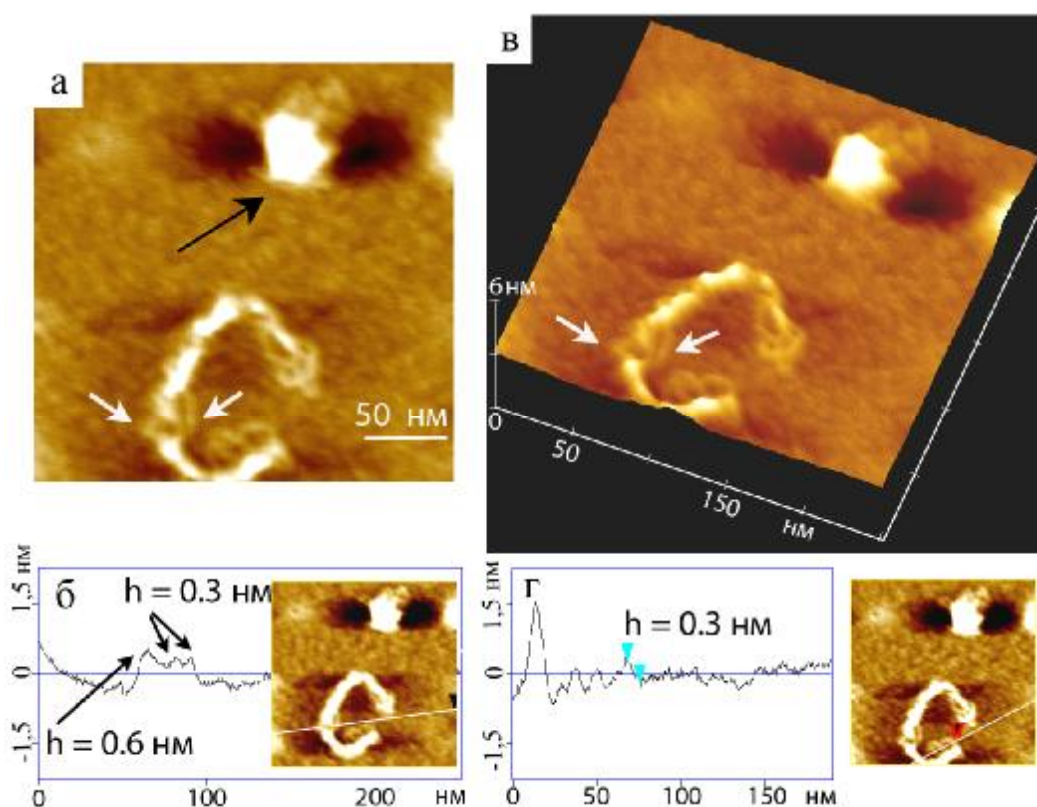
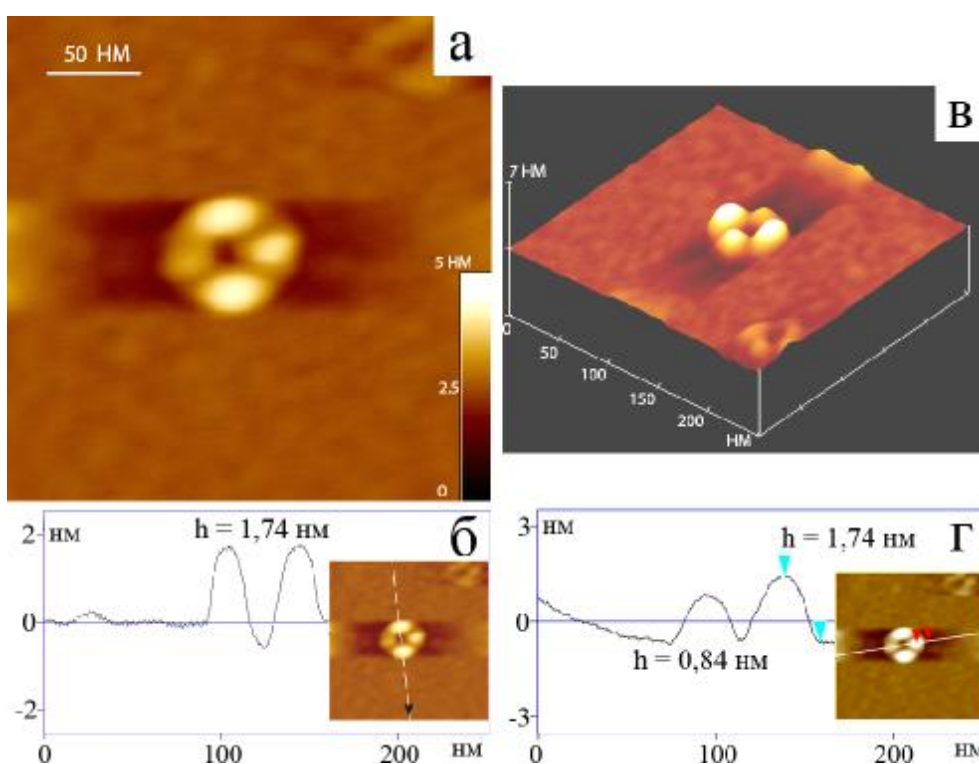


Рис. 11. АСМ-зображення (а), профілі перерізів (б) і (г) та тривимірне зображення (в) поодинокій надсуперспіральної ДНК рGEMEX, що утворила вісь суперспіралі другого порядку. (а) Стрілками показано нитки ДНК, що розійшлися, профіль перерізу яких наведено на рис. 11б. Чорна стрілка вказує на сферіод. (б) Лінію, уздовж якої проведено січну площину через три нитки, що розійшлися, показано на вставці. Висота двох піків становить  $h = 0,3$  нм, а висота третього піка –  $h = 0,6$  нм. (г) Профіль перерізу, проведеного через нитки надсуперспіральної ДНК, що розійшлися; січну площину проведено уздовж лінії, показаної на вставці. Висота цих ниток становить  $h = 0,3$  нм, що відповідає висоті нитки дволанцюгової ДНК. Розмір кадру  $250 \text{ нм} \times 250 \text{ нм}$

Таким чином, аналіз цього профілю перерізу показав, що С-подібну надсДНК утворено чотирма дволанцюговими нитками ДНК. Оскільки контурна довжина наведеної надсДНК становить  $L = 260$  нм, це означає, що дану компактизовану структуру утворено поодинокую кільцевою молекулою ДНК, “складеною навпіл”. Зазначимо, що за контурної довжини  $L = 260$  нм число ниток ДНК у профілі перерізу для димера повинно було б становити вісім.

Представлений на рис. 11г інший профіль перерізу цієї С-подібної молекули також підтверджує, що дану молекулу утворено нитками, висота яких дорівнює висоті двониткової ДНК ( $h = 0,3$  нм). Фактично аналіз профілю перерізу поряд з визначенням виключеного об'єму молекули також дозволяє диференціювати мономолекулярні структури від агрегатів, утворених декількома молекулами.

Іншою візуалізованою нами структурою, зовні схожою на сфероїд на АСМ-зображенні з невисокою роздільною здатністю, є мінітороїд. З профілів перерізів на рис. 12б та рис. 12в можна бачити, що три із чотирьох сегментів тороїда мають однакову висоту ( $h = 1,74$  нм), а четвертий сегмент має майже вдвічі меншу висоту ( $h = 0,84$  нм). Це означає, що у четвертому сегменті число обертів джгута ссДНК менше, ніж у інших трьох сегментах, тобто мінітороїд являє собою своєрідне мінікільце з розрізом у верхній частині, довжина якого дорівнює чверті довжини кола.



**Рис. 12.** АСМ-зображення (а), профілі перерізів (б) і (г) та тривимірне зображення (в) поодинокій надсперспіралізованої ДНК pGEMEX, що утворила мінітороїд. (а) Розмір кадру  $250$  нм  $\times$   $250$  нм. (б) Висота двох фрагментів тороїда, через які проведено січну площину, дорівнює  $h = 1,74$  нм. (г) Висота інших двох фрагментів тороїда, визначена з профілю перерізу, дорівнює  $h = 1,74$  нм та  $h = 0,84$  нм відповідно. Трикутниками показано пік на профілі перерізу та рівень, відносно якого було проведено вимірювання його висоти. Висота цього сегмента мінітороїда дорівнює  $h = 1,74$  нм. (а, г) Зовнішній діаметр мінітороїда –  $50$ - $60$  нм, внутрішній –  $15$ - $25$  нм

На основі аналізу отриманих АСМ-зображень нами запропоновано схему поетапної компактизації як для поодиноких молекул ДНК, так і для димерів (рис. 13). Позиції В1, С1, D1, Е1, які виділені прямокутником, відповідають димерам ссДНК, що визначено на основі обчислення об'ємів вищезгаданих молекул, всі інші позиції – поодиноким молекулам. Найменш компактизовані молекули наведено на поз. А1-А3, найкомпактизованіші – на поз. Е1-Е3. На поз. А3 наведено зображення

ссДНК pGEMEX, іммобілізованої на свіжосколотій слюді з іонами  $Mg^{2+}$ . Молекули ссДНК pGEMEX, іммобілізовані на стандартній амінослюді (поз. А1, А2) з високим значенням поверхневої щільності заряду у порівнянні із свіжосколотою слюдою

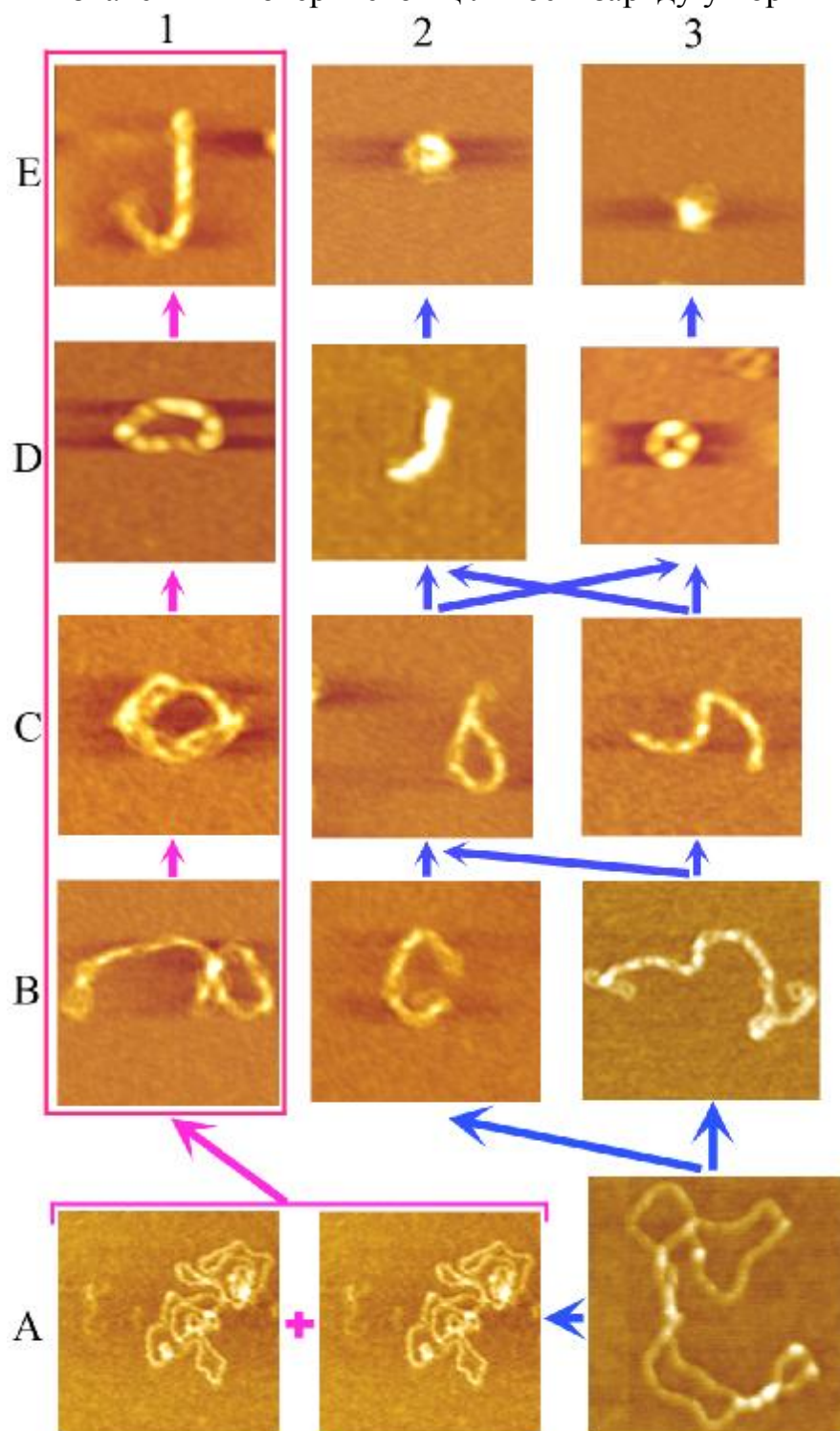
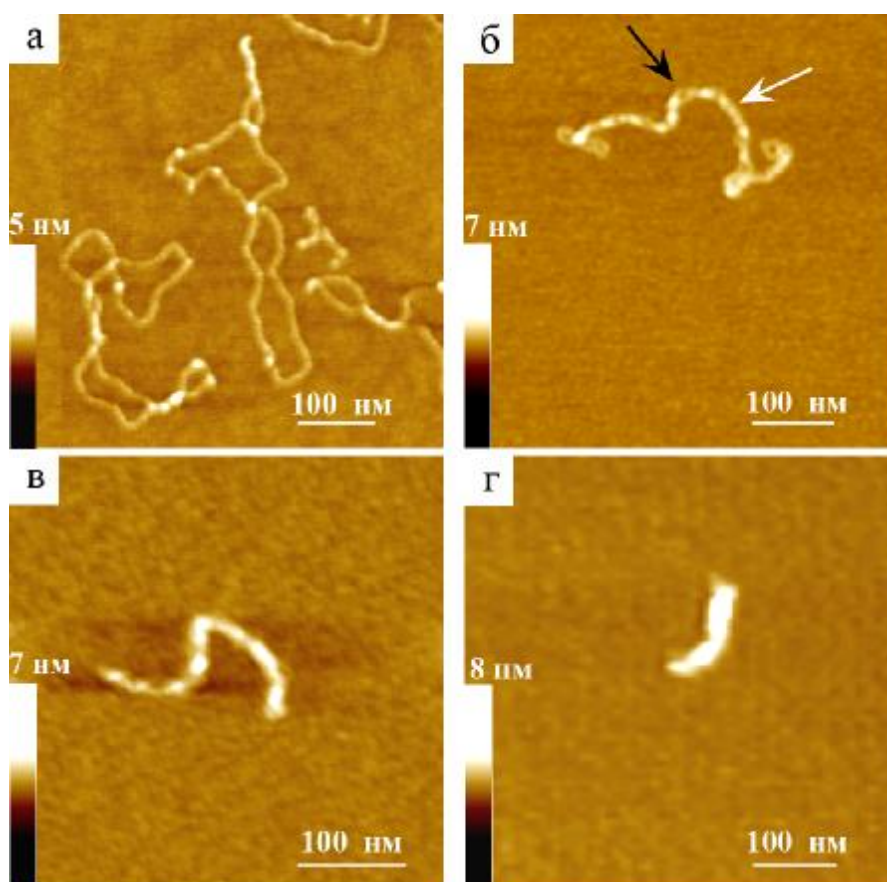


Рис. 13. Модель компактизації молекул суперспіральної ДНК, що запропонована на основі отриманих АСМ-зображень ДНК pGEMEX. А1, А2 – стандартна амінослюда, А3 – свіжосколота слюда, інші АСМ-зображення отримані на модифікованій амінослюді. Стрілки вказують на прямі етапи подальшої компактизації ДНК; прямокутником виділено чотири димери. При підвищенні поверхневої щільності заряду, або кількості протонуваних аміногруп (тобто при переході від свіжосколотої і стандартної амінослюди до модифікованої амінослюди), утворюються різні топологічні варіанти компактизованих молекул ДНК. В3 – надссДНК, що утворює вісь суперспіралі 1 порядку; В2, С2, С3 – надссДНК, що утворює вісь суперспіралі 2 порядку; D2 – надссДНК, що утворює вісь суперспіралі 3 порядку; Е2, Е3 – сфероїди; D3 – мінітороїд, утворений поодинокими молекулами ДНК

дою, мають інший вигляд. Вони схожі на плектонемічні молекули ДНК, але є компактизованішими, тобто локалізованими на меншій площі субстрату.

При переході до модифікованої амінослюди, яка характеризується значно більшою поверхневою щільністю заряду у порівнянні зі стандартною амінослюдою, спостерігається кілька варіантів компактизації ссДНК. На першому етапі зростає кількість вузлів і утворюються надсуперспіральні молекули ДНК (В3), тобто своє-

рідні джгути (рис. 14б). Кількість вузлів для даної молекули становить  $n = 19$  та, як наслідок, значення щільності супервитків  $\sigma = -0,13$ . Кількість вузлів в молекулі було розраховано візуально з АСМ-зображення (біла крапка, або пляма, на АСМ-зображенні відповідає вузлу), а також за допомогою побудови профілів перерізу молекули. У другому варіанті молекулу ДНК було розбито на декілька фрагментів, для кожного з яких побудовано подовжній переріз молекули по висоті площиною, перпендикулярною площині рисунка. Характер поперечного профілю перерізу та значення висоти ниток молекули, які локально розійшлися, свідчать про те, що джгутоподібна структура утворена поодинокую молекулою ссДНК.



**Рис. 14.** АСМ-зображення суперспіральної ДНК pGEMEX з різною довжиною осі суперспіралі. ДНК іммобілізована на свіжосколотій слюді з буфера, що містить іони  $Mg^{2+}$  (а), та на модифікованій амінослюді (б-г). (а) Довжина осі суперспіралі становить  $l = 466 \pm 5$  нм (для обох молекул),  $\sigma = -0,024$ . (б)  $l = 567$  нм,  $\sigma = -0,13$ ; молекула містить 19 вузлів. Чорною та білою стрілками вказано фрагменти ДНК, які відповідають ниткам дволанцюгової ДНК, що розійшлися, та їхньому перетинанню відповідно. (в) Надсуперспіральна ДНК, що характеризується віссю суперспіралі другого порядку довжиною  $l = 279$  нм та числом вузлів, що дорівнює семи. (г) Надсуперспіральна ДНК, довжина осі суперспіралі третього порядку якої становить  $l = 140$  нм. Верхня границя наведеної шкали градацій кольору, що відповідає значенню висоти об'єкта на АСМ-зображенні, становить: (а) – 5 нм, (б) – 7 нм, (в) – 7 нм, (г) – 8 нм

Нами також візуалізовано молекули ДНК, які мають значно меншу довжину осі суперспіралі –  $l = 279$  нм (рис. 14в) та  $l = 140$  нм (рис. 14г). Оскільки об'єм обох молекул збігається з об'ємом поодинокі молекули ДНК pGEMEX, можна припус-

тити, що молекулу з  $l = 279$  нм (рис. 14в) утворено в результаті складання вдвічі молекули з  $l = 567$  нм (рис. 12б), а молекулу з довжиною осі  $l = 140$  нм (рис. 14г) – складанням вдвічі молекули з довжиною осі  $l = 279$  нм (рис. 14в). Таким чином, при іммобілізації молекул ссДНК на поверхні амінослюди з підвищеною щільністю аміногруп візуалізовано надсуперспіральні ДНК, що утворюють осі суперспіралі другого (рис. 14в) та третього порядку (рис. 14г), довжина яких приблизно в два та чотири рази менша, ніж довжина осі суперспіралі першого порядку (рис. 14б) відповідно.

Компактизація на модифікованій амінослюді відбувається не тільки для поодиноких молекул ДНК, а й для олігомерів. Молекули, АСМ-зображення яких показано у поз. В1, С1, D1, Е1 (рис. 13), утворюють димери, що визначено нами на основі обчислення їхніх об'ємів. Спочатку дві плектономічні молекули (А1, А2) утворюють джгутоподібні структури (В1). У подальшому можливе формування тороїда (С1, D1) або джгута (Е1), довжина суперспіральної осі якого становить чверть контурної довжини релаксованої молекули. Позиція D2 також відповідає тороїду, утвореному двома молекулами надссДНК.

Повертаючись до схеми компактизації ДНК (рис. 13), зазначимо, що на другому етапі джгутоподібна молекула (В3) складається вдвічі – довжина суперспіральної осі зменшується в два рази (С3, В2, С2, рис. 14в). На цьому етапі можливе як подальше формування джгутів (С3), так і утворення тороїдів (С2). На третьому етапі утворюються коротші джгути з ще вдвічі меншою довжиною суперспіральної осі  $l \sim 140$  нм (D2). Крім того, можливе формування мінітороїда (D3) як із тороїда (С2), так і з джгутовидної молекули (С3). На четвертому етапі подальша компактизація тороїдів та джгутів веде до виникнення напівсфероїдів (Е2) та сфероїдів. Цікаво відзначити, що мінітороїди виникають як групами, так і поодинокими структурами.

Намагаючись відповісти на запитання, чому різні молекули ДНК компактизовані до різного рівня, можна припустити, що (і) на поверхні модифікованої амінослюди протоновані аміногрупи локалізовані неоднорідно; (ii) найкомпактизованіші структури – сфероїди та напівсфероїди – утворюються на ділянках модифікованої амінослюди з максимальною щільністю активних аміногруп.

Локалізація морфологічно близьких форм ссДНК (мінітороїдів, джгутоподібних молекул з довжиною осі суперспіралі  $l \sim 570$  нм та  $l \sim 280$  нм) на ділянках слюди розміром  $\sim 500$  нм  $\times$   $500$  нм вказує на те, що поверхнева щільність заряду модифікованої амінослюди варіює. А наявність такого градієнта щільності заряду спричиняє різне екранування фосфатних груп ДНК та, як наслідок, утворення варіантів компактизованих ссДНК, що морфологічно відрізняються. Крім того, досліджуваний зразок ДНК містить набір топоізомерів, що характеризуються різною щільністю супервитків. У випадку, якщо характерний час компактизації ДНК має близьке значення до часу досягнення молекулами ДНК поверхні амінослюди, топоізомери з різною кількістю супервитків можуть конденсуватися в агрегати з різним рівнем компактизації.

Таким чином, запропонована модель компактизації ДНК демонструє, що в умовах високої поверхневої щільності заряду субстрату, на якому іммобілізовані моле-

кули ДНК, можлива надзвичайна компактизація не тільки димерів, тримерів ДНК, але й поодиноких молекул ДНК з поетапним складанням молекул вдвічі та формуванням осей суперспіралі другого та третього порядків. Однією з причин подовжнього стискування та внутрішньомолекулярної компактизації ДНК може бути збільшення гнучкості ДНК при збільшенні рівня нейтралізації фосфатних груп (саме це передбачає теорія Manning, 1978, а підтверджено експериментально Podesta et al., 2005).

**Модифікація та функціоналізація зондів і субстратів для атомно-силової мікроскопії.** Поверхневі властивості стандартної амінослюди були охарактеризовані двома методами – (i) атомно-силовою мікроскопією у режимі силових вимірювань та (ii) візуалізацією лінійних та суперспіральних молекул ДНК, адсорбованих на амінослюді. Режим силових вимірювань контактного варіанта АСМ був застосований для характеристики амінослюди та амінозондів, а також амінозондів, функціоналізованих молекулами ДНК, глютаральдегіду, гомобіфункціональними лінкерними агентами та бичачого сироваткового альбуміну шляхом визначення сили адгезії та роботи сили адгезії між поверхнями, що взаємодіють. Один цикл силових вимірювань складається із двох етапів: (i) зближення поверхонь зонда та субстрату при переміщенні сканера від деякого заданого положення відносно осі Z до положення  $Z = 0$  та (ii) їхнього наступного віддалення від положення сканера  $Z = 0$  до заданого значення Z. При цьому записують два силові графіки, що відповідають зближенню зонда та субстрату з відстані  $Z = 90-180$  нм до  $Z = 0$  нм та наступному їхньому віддаленню (рис. 15). Характер обох графіків для пар поверхонь аміномодифікована слюда – зонд та свіжосколота (немодифікована) слюда – зонд у

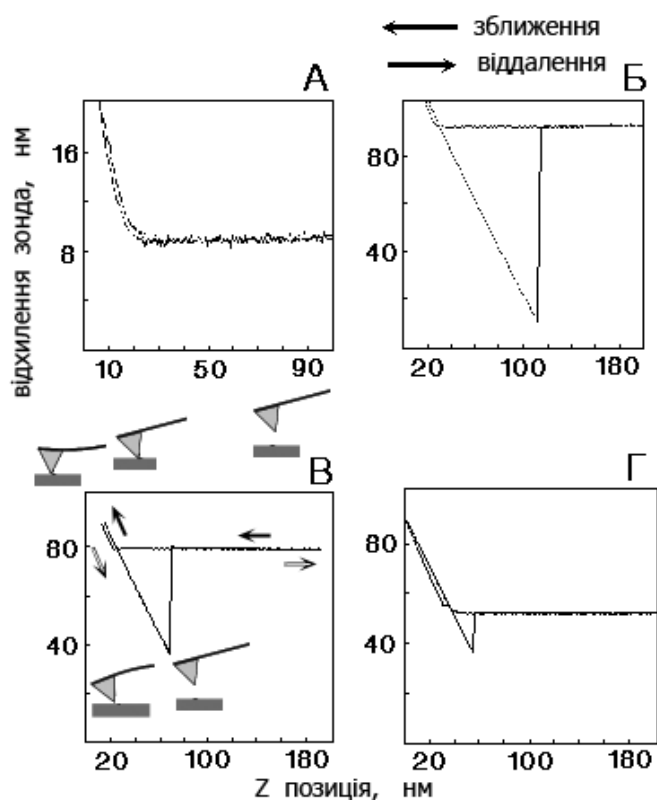
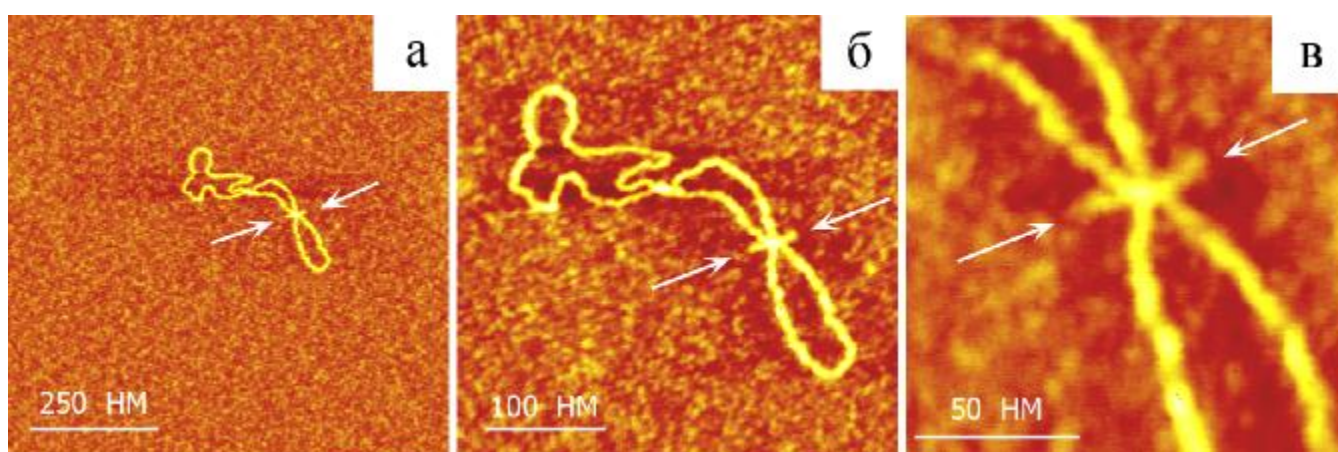


Рис. 15. Силові графіки, або залежності “відхилення зонда – відстань”, для пар поверхонь, що взаємодіють, аміномодифікована слюда – зонд та немодифікована свіжосколота слюда – зонд у водних розчинах за різних іонних умов: а – свіжосколота слюда - зонд, ТЕ буфер; (б-г) – амінослюда - зонд; б - ТЕ буфер, pH 7,6; в -  $10\times$ ТЕ буфер, pH 7,6; г - 7 mM NaOH, pH 11,2

буферних розчинах за різних іонних умов вказує на особливості міжмолекулярних сил між поверхнями зонда та субстрату, що взаємодіють.

Аміногрупи, що покривають поверхню слюди після її модифікації за допомогою АПТЕС, є позитивно зарядженими за рН 7,6. Це призводить до адгезивного ефекту між позитивно зарядженою амінослюдою та негативно зарядженим зондом (рис. 15б) завдяки електростатичній взаємодії між аміногрупами модифікованої слюди та гідроксигрупами зонда. Сила адгезії між амінослюдою та зондом зменшується у 1,5-2 рази при зростанні іонної сили у 10 разів (рис. 15в) з наступним ще значнішим екрануванням заряду аміногруп за рН 11,2 (рис. 15г). Крім стандартної амінослюди (АП1-слюди) аналогічні силові вимірювання з тими ж самими кантилеверами було проведено для АП2-слюди (час обробки якої в парах АПТЕС становив 2 години при збереженні всіх інших параметрів протоколу модифікації), для якої було знайдено зростання сили адгезії та, отже, поверхневої щільності позитивного заряду порівняно з АП1-слюдою. Ми випробували значну кількість протоколів аміномодифікації слюди та нітриду кремнію в парах АПТЕС, але найвищу якість АСМ-зображень плектонемічної суперспіральної ДНК було досягнуто для стандартної та модифікованої амінослюди. Зазначимо, що нам також не вдалося отримати якісні АСМ-зображення ДНК, іммобілізованої на АП2-слюді. Цей факт наочно демонструє надзвичайну залежність якості АСМ-зображення ДНК, адсорбованої на слюді, навіть від невеликих змін протоколу модифікації слюди.

Переваги поєднання методики іммобілізації ДНК на амінослюді з можливостями АСМ (над традиційними методами електронної та кріоелектронної мікроскопії) дозволили нам візуалізувати таку неканонічну структуру, як хрест, що утворений інвертованими повторами, суперспіральної ДНК рUC8. Зображення ссДНК рUC8 на стандартній амінослюді, отримане за допомогою вібруючого варіанта АСМ у повітрі (рис. 16), показує, що хрест виглядає як різко окреслені виступи на нитці



**Рис. 16.** АСМ-зображення суперспіральної плазміді рUC8 (довжина становить 2665 п.н.) у повітрі. Розмір кадру: (а) – 858 нм × 858 нм; (б) – 372 нм × 372 нм; (в) – 134 нм × 134 нм. Стрілками показано хрестоподібну структуру

ДНК з довжиною пліч (тобто шпильок), яку можна оцінити безпосередньо із АСМ-зображення. Аналіз наших експериментальних результатів показує, що в утворенні

шпильки беруть участь 11-12 пар нуклеотидів, а термодинамічний аналіз інвертованих повторів підтвердив, що хрест утворено 52 нуклеотидами. Для порівняння зазначимо, що паліндромні ділянки, у яких за допомогою методів двовимірного електрофорезу та обробки нуклеазами були зареєстровані хрестоподібні структури у ДНК фага  $\phi$ X 174, плазмід pBR322, ColE1, pAO3, становлять 9-13 п.н. у спіральних ділянках кожної з шпильок хреста, а їхні петлі містять 3-5 нуклеотидів (Lilley, 1980; Lyamichev et al., 1984). Вільна енергія  $\Delta G$  шпильки, яка утворює хрест у ДНК pUC8, становить -17,8 ккал/моль.

З метою з'ясування зв'язку між шпильковими структурами (які було візуалізовано нами для плазмід pUC8 у вигляді утвореного ними хреста) та вірулентності мікроорганізмів нами були досліджені два ізоляти патогенних мікобактерій туберкульозу з повністю секвенованим геномом – лабораторний штам *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv та високопатогенний ізолят CDC1551. Було знайдено, що обидва ізоляти містять по 8 довгих інвертованих термодинамічно стабільних повторів довжиною 48-62 нуклеотиди та з вільною енергією  $\Delta G = -38,9 - -56,2$  ккал/моль, з яких 6 шпильок повністю збігаються. В той же час у геномі CDC1551, на відміну від H37Rv, на 5'-кінці (матричного ланцюга ДНК) локалізована високостабільна шпилька довжиною 58 нуклеотидів. Припускається, що локалізація високостабільної шпильки з  $\Delta G = -53,9$  ккал/моль в області 5'-кінця матричного ланцюга ДНК ізоляту CDC1551 може призводити до різного ступеня стабілізації РНК-транскриптів або різної ефективності термінації транскрипції для РНК-полімерази штаму CDC1551 порівняно з ізолятом H37Rv. Це, в свою чергу, незважаючи на те, що ступінь гомології ДНК двох ізолятів мікобактерій становить понад 98 %, може служити однією із причин різної вірулентності штамів.

З метою візуалізації біооб'єктів безпосередньо у фізіологічному середовищі були досліджені інтактні ціанобактерії та визначені їхні лінійні розміри. Для збільшення сили взаємодії клітина – субстрат ціанобактерії *Synechocystis* PCC 6803 були іммобілізовані на стандартній амінослюді у TES буфері. Із АСМ-зображень було визначено, що середній розмір ціанобактерій у буферному розчині становить приблизно 70 нм  $\times$  90 нм, а їхня висота дорівнює  $\sim$  20 нм.

Модифікація зондів аміногрупами, як і у випадку аміномодифікації слюди, призводить до появи піка на графіку віддалення залежності сила – відстань (рис. 17).

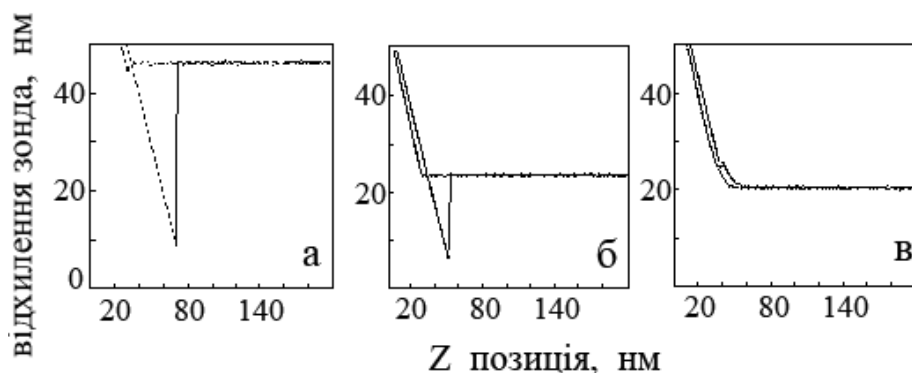


Рис. 17. Залежності відхилення зонда – відстань для пари поверхонь амінозонд – свіжосколота слюда у водних розчинах: а – силові графіки у ТЕ буфері; б – у 10 $\times$ ТЕ буфері; в – за рН 11,2

Після аміномодифікації зондів в парах АПТЕС, як і для амінослюди, виникає знач-

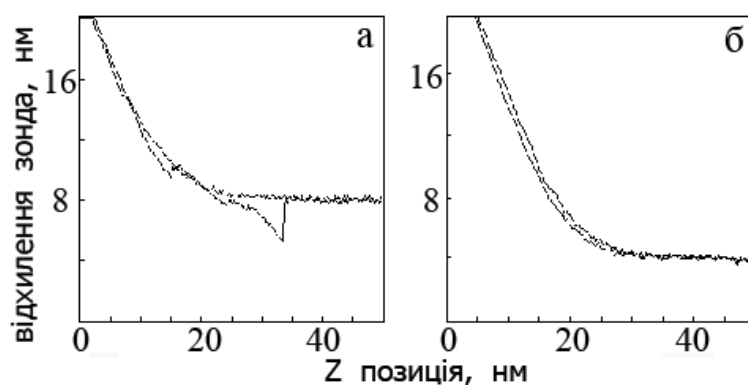
на (до 4,6 нН) сила адгезії. Цей адгезивний ефект, як і для аміномодифікованої слюди, обумовлений, в основному, електростатичною взаємодією між позитивно зарядженими аміногрупами зонда та негативно зарядженими силанольними групами слюди. Наші дані показують, що збільшення іонної сили в 10 разів призводить до зменшення сили адгезії між амінозондом та слюдою в 1,7-2 рази. Розкид значень сил адгезії може бути пояснений різним радіусом заокруглення зондів, а також утворенням на їхній поверхні аміношарів з різною щільністю аміногруп.

На наступному етапі аміномодифіковані АСМ-зонди були функціоналізовані, тобто було підтверджено, що аміногрупи амінозондів є реакційними, та вони можуть бути кон'юговані з біомолекулами при використанні добре відомої хімії іммобілізації амінів. Для функціоналізації амінозондів були використані нековалентне зв'язування ДНК та ковалентна взаємодія з глютаральдегідом (ГА). Ковалентне зв'язування аміногруп амінозонда з карбонільними групами ГА призводить до утворення Шиффової основи (Кнарр, 1991). В результаті відбувається зменшення поверхневої щільності позитивного заряду амінозонда та, отже, сили адгезії для системи амінозонд + ГА – слюда.

Взаємодія негативно заряджених фосфатних груп молекул ДНК з позитивно зарядженими аміногрупами амінозонда призводить до їхньої нейтралізації та зникнення ефекту адгезії. В цьому випадку силові криві для амінозонда з іммобілізованою ДНК у ТЕ буфері подібні до силових графіків для пари немодифікований зонд – свіжосколота слюда. Силові графіки амінозонд + ДНК у ТЕ буфері, що записані з інтервалом в декілька секунд, показують, що молекули ДНК, які адсорбовані на амінозонді, є лабільними: під впливом прикладеної сили з'являються один або декілька піків адгезії (рис. 18). В процесі силових вимірювань ці піки можуть зникати

**Рис. 18. Залежності відхилення зонда – відстань для аміномодифікованого зонда, функціоналізованого ДНК.**

**(а, б) – амінозонд + ДНК – свіжосколота слюда, ТЕ буфер. Графіки одержано з інтервалом у декілька секунд**



та з'являтися знову. Нековалентне зв'язування амінозонд – ДНК та ковалентна взаємодія амінозонд – глютаральдегід показали можливість функціоналізації модифікованих амінозондів, що може знайти застосування в дослідженнях структурних особливостей поверхонь клітин, визначенні їхніх мікромеханічних властивостей, моніторингу клітинної динаміки *in vitro*.

Силові графіки системи амінозонд – амінослюда демонструють наявність значного адгезивного ефекту, незважаючи на те, що обидві поверхні несуть сумарний позитивний заряд. Істотно більш високі значення роботи сил адгезії (тобто площі під кривою віддалення) для пари амінозонд – амінослюда при приблизно однаково-

му піковому значенні сили адгезії з парою амінозонд – слюда вказують на утворення значно більшої кількості міжмолекулярних зв'язків між амінозондом та амінослюдою порівняно з парою поверхонь амінозонд – слюда.

З метою з'ясування механізму іммобілізації ДНК на модифікованій аміноповерхні нами були отримані зображення ДНК на амінослюді за високої іонної сили  $I = 900 \text{ mM Na}^+$  та  $\text{pH } 9$ . Незважаючи на елімінацію електростатичних сил взаємодії між аміногрупами на поверхні слюди та негативно зарядженими фосфатними групами ДНК за  $I = 900 \text{ mM Na}^+$ , на поверхні амінослюди все ще існують сайти для зв'язування нуклеїнових кислот. Ці дані дозволяють припустити, що у зв'язуванні молекул ДНК як з аміноповерхнею модифікованого зонда, так і з поверхнею модифікованої слюди беруть участь не тільки електростатичні сили, але можливим є утворення водневих зв'язків між аміногрупами аміноповерхні з електронегативними сайтами ДНК. Оскільки вандерваальсові сили не залежать від  $\text{pH}$  (Butt, 1991), взаємодію ДНК з амінозондом (як і у випадку амінослюди за  $\text{pH } 9$ ,  $I = 10 \text{ mM Na}^+$ ), на нашу думку, обумовлено суперпозицією електростатичних та вандерваальсових сил.

На основі методики аміномодифікації АСМ-зондів розроблено загальну схему їхньої функціоналізації та отримано зонди, функціоналізовані бичачим сироватковим альбуміном (БСА), які можуть бути використані для вивчення процесів молекулярного впізнавання (рис. 19). Процедура модифікації та функціоналізації АСМ-зонда включає три етапи. Спочатку шляхом модифікації в парах похідного аміно-

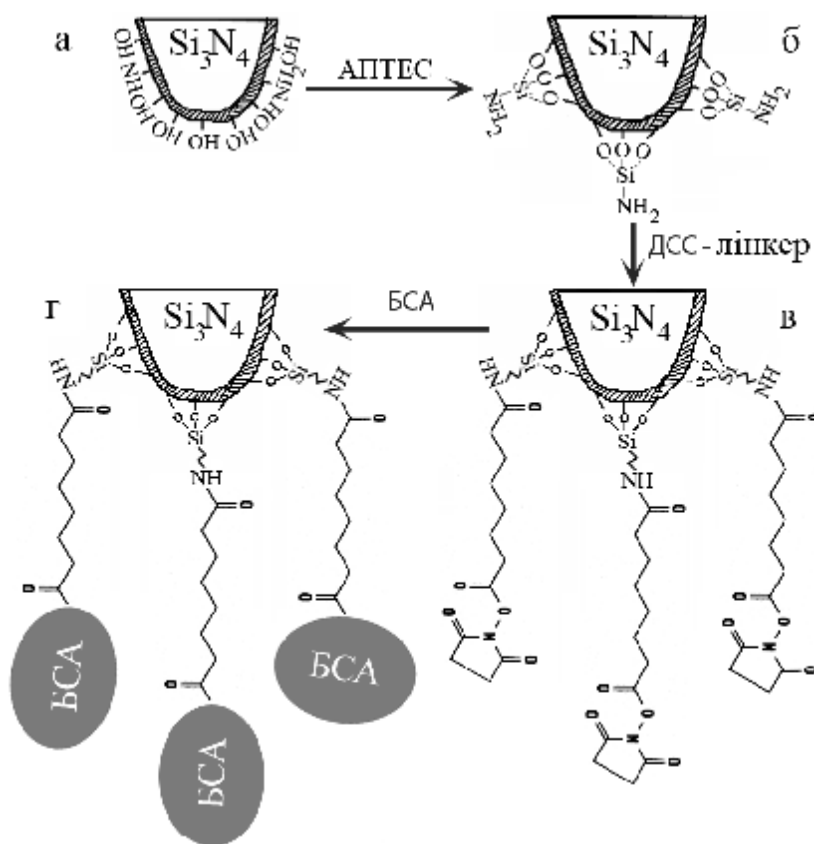


Рис. 19. Схема функціоналізації зондів для атомно-силової мікроскопії. (а) Немодифікований АСМ-зонд з нітриду кремнію. (б) АСМ-зонд, поверхня якого вкрита аміногрупами. На першому етапі в результаті обробки в парах похідного аміносилану (АПТЕС) поверхня зонда модифікована ковалентно приєднаними аміногрупами. (в) Зонд, поверхня якого містить ДСС-лінкер, що має вільний амінореакційний кінець (NHS-ефір). На другому етапі аміногрупи амінозонда реагують з NHS-ефірною групою гомобіфункціонального амінореакційного ДСС-лінкера. (г) Зонд з ковалентно приєднаними молекулами бичачого сироваткового альбуміну (БСА). На третьому етапі амінореакційні групи ДСС-лінкера взаємодіють з лізинними залишками БСА

силану був отриманий амінозонд, з поверхневими аміногрупами якого на другому етапі взаємодіяв амінореакційний гомобіфункціональний лінкер. На заключному етапі зонд з ковалентно приєднаним лінкером ДСС був функціоналізований молекулами БСА. Отримані АСМ-зонди було охарактеризовано на різних етапах модифікації за допомогою АСМ у режимі силових вимірювань (як після кожного етапу модифікації, так і тільки для зонда з приєднаним БСА) – із силових графіків (рис. 20) визначено силу адгезії та роботу сили адгезії.

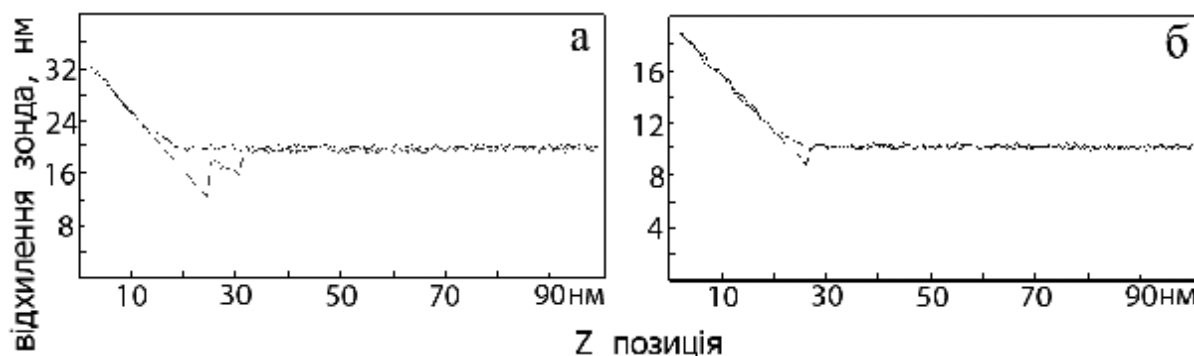


Рис. 20. Силкові графіки аміномодифікованого зонда після (а) функціоналізації амінореакційним гомобіфункціональним ДСС-лінкером та (б) іммобілізації бичачого сироваткового альбуміну

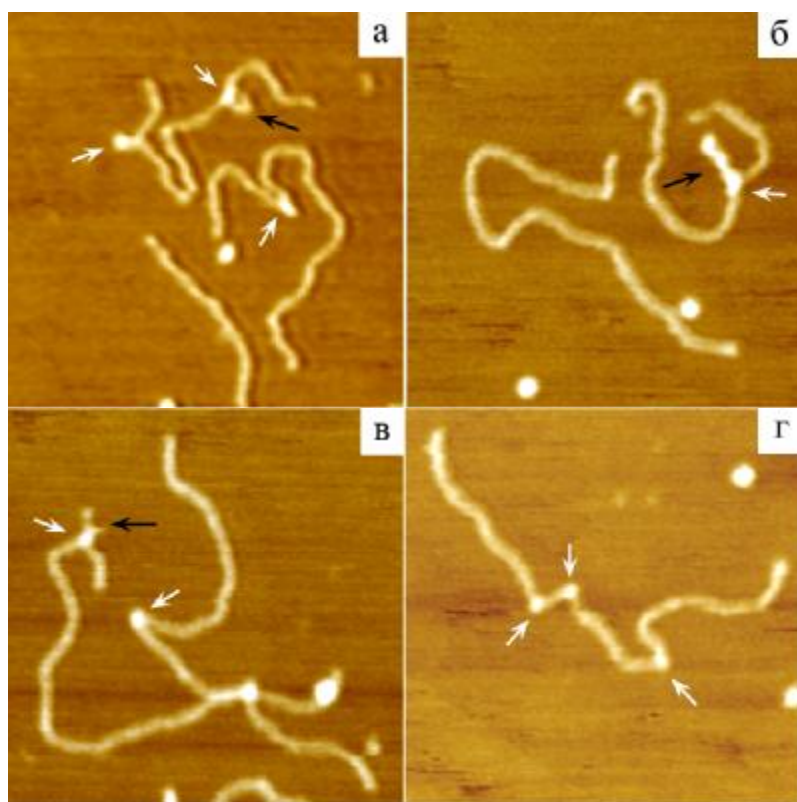
Оскільки поверхні модифікованого та функціоналізованого зондів за своїми властивостями подібні до поверхонь модифікованої та функціоналізованої слюди відповідно, процес функціоналізації був також охарактеризований шляхом візуалізації молекул ДНК та БСА, іммобілізованих на модифікованій та функціоналізованій слюді. Відмітною особливістю аміномодифікації зонда за допомогою АПТЕС (рис. 19) є те, що одна молекула АПТЕС взаємодіє з трьома поверхневими ОН-групами зонда. Тим самим кількість аміногруп на поверхні зонда, обробленого АПТЕС, може бути істотно меншою, ніж для зонда, обробленого, наприклад, за допомогою етаноламіну з наступним утворенням самоасоційованих моношарів (Reiner et al., 2003).

Використання гомобіфункціонального амінореакційного лінкерного агента також спрямоване на зменшення кількості молекул-рецепторів на поверхні зонда. Можливим є варіант, при якому один амінореакційний кінець лінкера (NHS-ефір) взаємодіє з аміногрупою зонда, а другий кінець залишається вільним – з цим реакційним кінцем лінкера можуть взаємодіяти аміногрупи лізинових залишків БСА. Однак також можливе зв'язування обох NHS-кінців лінкера з аміногрупами зонда, що зменшує кількість вільних аміногруп на поверхні амінозонда.

**Візуалізація комплексів ДНК – T7 РНК-полімераза при елонгації транскрипції.** Для дослідження структури комплексів T7 РНК-полімераза – ДНК іммобілізацію біомолекул проводили на свіжосколоту слюду з додаванням іонів магнію. ДНК-матриця для транскрипції була сконструйована таким чином, що містила промотор та область термінації транскрипції T7 РНКП асиметрично локалізованими на кінцях амплікона довжиною 1414 п.н. (його контурна довжина становила  $435 \pm$

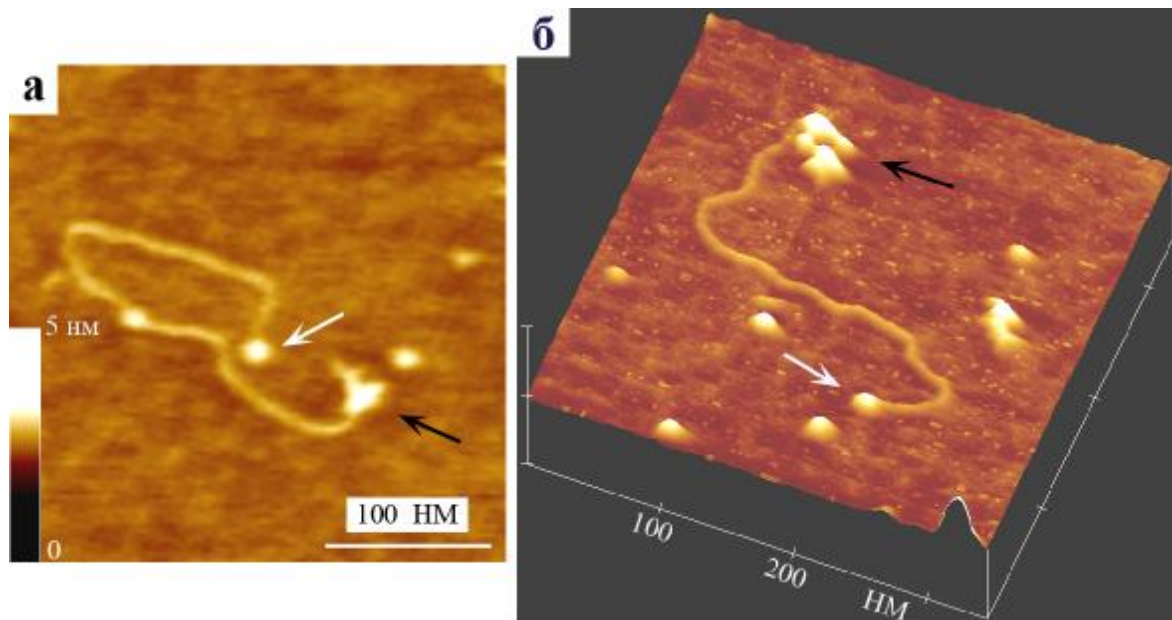
15 нм).

В процесі транскрипції утворюються елонгаційні комплекси, які характеризуються типовими вигинами для комплексів ДНК – білок (рис. 21). Транскрипцію можна розглядати як своєрідне сканування ДНК-матриці РНК-полімеразою. Напрямок сканування задається послідовністю промотору у матричному ланцюгу ДНК (Milligan, 1987). Але для пошуку промотору та виключення можливості пропуску сайту промотору такою високоточною "машиною", якою є РНКП, на нашу думку, цей молекулярний мотор починає сканування з одного з кінцевих фрагментів ДНК. Саме цією обставиною ми пояснюємо доволі велике число візуалізованих кінцевих комплексів, або комплексів, які передують утворенню комплексів ініціації транскрипції. Наші припущення узгоджуються з експериментальними результатами з АСМ-візуалізації дифузії РНКП протягом пошуку промотору (Guthold, 1999) та моделлю переміщення білка вздовж ДНК (швидкого перенесення білка між різними фрагментами ДНК за допомогою механізмів одновимірної дифузії та слабого неспецифічного зв'язування) (Berg, 1981).



**Рис. 21. АСМ-зображення комплексів Т7 РНКП та ДНК. Молекули Т7 РНКП виглядають як сфери діаметром близько 8 нм. Білі стрілки вказують на комплекси, що утворили молекула Т7 РНКП та ДНК, а чорні – на РНК-транскрипти. Транскрипція проведена за кімнатної температури протягом 60 хв. Розмір кадру: (а) – 348 нм × 348 нм; (б) – 306 нм × 306 нм; (в) – 298 нм × 298 нм; (г) – 299 нм × 299 нм. Контурна довжина молекул становить: (а) – 445-450 нм, (б) – 454-457 нм**

Зазначимо, що при взаємодії молекули ДНК з Т7 РНКП утворюються специфічні та неспецифічні комплекси. Специфічне зв'язування (взаємодія з промотором) є відносно нечутливим до зміни іонної сили розчину, але воно залежить від конформації фрагмента ДНК. Неспецифічні комплекси ДНК – Т7 РНКП утворюються за рахунок електростатичної взаємодії позитивно заряджених залишків полімерази з негативно зарядженими фосфатними групами ДНК. Серед доволі великого масиву проаналізованих комплексів ДНК – Т7 РНКП (понад 200) були візуалізовані комплекси, утворені полімеразою саме з термінальними (тобто кінцевими) фрагментами



**Рис. 22.** АСМ-зображення (а) та тривимірне зображення (б) комплексів, що утворили молекули Т7 РНК-полімерази з термінальними фрагментами ДНК-матриці. Біла стрілка вказує на комплекс ініціації, а чорна – на комплекс в області термінації транскрипції. (а) – розмір кадру – 297 нм × 297 нм. Наведено шкалу градацій сірого кольору, яка відповідає діапазону висоти від 0 до 5 нм. Транскрипцію проводили протягом 65 хв. за  $T = 31\text{ }^{\circ}\text{C}$

ДНК (близько 30 комплексів). Типові АСМ- та тривимірне зображення таких комплексів наведено на рис. 22. Наявність декількох молекул Т7 РНКП, що утворили комплекс з поодинокую молекулою ДНК, підтверджує, що після початку транскрипції однією молекулою Т7 РНКП інша молекула ферменту може зв'язатися з термінальним фрагментом ДНК-матриці, що локалізований поряд з промотором Т7 РНКП, для проведення наступної преініціації та елонгації транскрипції.

В області термінації транскрипції декілька молекул Т7 РНКП можуть бути зв'язаними з ДНК-матрицею (показано чорною стрілкою на рис. 22). Ці дані узгоджуються з результатами роботи Epstein et al. (2003), в якій показано можливість об'єднання молекул РНКП в процесі елонгації транскрипції – більшість внутрішніх та зовнішніх блоків транскрипції (сигналів паузи та зупинки) зникають, якщо більше ніж одна молекула РНКП ініціює транскрипцію з одного і того ж промотору. Навпаки, при проведенні саме поодинокого циклу транскрипції наявність внутрішніх термінаторів істотно впливає на швидкість елонгації та вихід повновимірних транскриптів.

Нами візуалізовано і РНК-транскрипти, що утворилися після проведення транскрипції. Про те, що в результаті транскрипції синтезуються РНК-транскрипти очікуваної довжини, свідчила наявність відповідної смуги на електрофореграмі після проведення електрофорезу за денатуруючих умов продуктів транскрипції. РНК-транскрипти виглядають як конденсовані структури, як і в попередніх дослідженнях з АСМ-візуалізації РНК (Hansma, 1999), оскільки, на нашу думку, для візуалізації витягнутих неконденсованих молекул РНК необхідно змінити поверхневі властивості субстрату (слюди).

## В И С Н О В К И

У дисертації наведено нове вирішення наукової проблеми створення для досліджень у галузі нанобіотехнології амінозондів (як компонентів біосенсорів) та амінослюди з заданими поверхневими властивостями (як субстрату для іммобілізації біополімерів) шляхом модифікації у газовій фазі. На основі узагальнення даних, отриманих за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ), полімеразної ланцюгової реакції, шляхом розробки підходів до візуалізації та наноманіпулювання поодинокими молекулами доведено, що ДНК, іммобілізована на амінослюді, є еластичною молекулою, яка може бути не тільки розтягнута, але й стиснута, а також компактизується до рівня сфероїдів через три етапи послідовного складання вдвічі.

1. Вперше розроблено технологію отримання амінослюди, субстрату для іммобілізації біополімерів для досліджень за допомогою атомно-силової мікроскопії, з заданими властивостями – регульованою гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду. Поряд з відомою стандартною амінослюдою, отриманою модифікацією в парах аміносилану, за рахунок варіювання умов модифікації слюди отримано модифіковану амінослюду як з підвищеною гідрофобністю та поверхневою щільністю аміногруп, так і зі зменшеною порівняно із стандартною амінослюдою.

2. Вперше розроблено технологію отримання аміномодифікованих АСМ-зондів в газовій фазі на відміну від існуючого підходу аміномодифікації у розчині. За допомогою АСМ в режимі силових вимірювань показано, що значення сили адгезії для пари поверхонь амінозонд – слюда (як і для пари стандартна амінослюда – зонд) зменшувались у ряду  $I = 10 \text{ mM Na}^+ \rightarrow I = 100 \text{ mM Na}^+ \rightarrow \text{pH } 11,2$ . Модифіковані амінозонди функціоналізовано через нековалентне зв'язування з ДНК та ковалентну взаємодію з глютаральдегідом.

3. Розроблено схему функціоналізації АСМ-зондів протеїнами та проведено їхню функціоналізацію бичачим сироватковим альбуміном (БСА). Модифіковані амінозонди з ковалентно приєднаним амінореакційним лінкером та БСА охарактеризовано шляхом силових вимірювань – визначено значення сили адгезії та роботи сили адгезії як після кожного етапу функціоналізації, так і тільки для зонда з приєднаним БСА.

4. Розвинуто новий експериментальний підхід витягування молекул ДНК. Тягнуті лінійні молекули ДНК фага  $\lambda$  та тягнуті суперспіральні молекули ДНК pGEMEX візуалізовані на поверхні амінослюди із зменшеною гідрофобністю та поверхневою щільністю аміногруп. Визначене безпосередньо з АСМ-зображення збільшення контурної довжини тягнених ssДНК pGEMEX довжиною 3993 п.н. означає, що молекули ssДНК витягнута у 1,5-1,7 разу порівняно з В-формою ДНК, що призвело до зростання відстані між нуклеотидами вздовж осі спіралі до  $H = 4,87 - 5,36 \text{ \AA}$ .

5. Доведено, що ДНК являє собою своєрідну молекулярну пружину – молекула ДНК може бути не тільки витягнута, але й стиснута. На модифікованій амінослюді поряд з плектономічно суперспіральними молекулами ДНК були візуалізовані поодинокі молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, ступінь суперспі-

ралізації яких значно вищий у порівнянні з раніше досягнутими експериментально та розглянутими теоретично. Відстань між нуклеотидами вздовж осі спіралі для цих суперспіральных молекул ДНК змінювалася у діапазоні  $1,94 \text{ \AA} < H < 2,19 \text{ \AA}$ . Такі стиснуті суперспіральні молекули ДНК зі зменшеною міжнуклеотидною відстанню вздовж осі дуплекса порівняно з відомими формами ДНК віднесено до нової форми ДНК – S-ДНК, для якої визначений нахил основ та побудована модель. Важливо, що при цьому утворюються як ліві, так і праві надсуперспіральні ДНК.

6. Візуалізацією лінійних та суперспіральных молекул ДНК на чотирьох субстратах з різними поверхневими властивостями доведено, що стискування молекул ДНК обумовлено поверхневими властивостями субстрату – високою гідрофобністю та щільністю заряду модифікованої амінослюди.

7. Вперше візуалізовано етапи компактизації поодиноких молекул суперспіральної ДНК pGEMEX, іммобілізованих на модифікованій амінослюдi. Показано, що компактизація поодиноких молекул відбувається через три етапи послідовного складання навпіл із зменшенням довжини осі суперспіралі, тобто з утворенням осей суперспіралі другого та третього порядків.

8. Вперше візуалізовані напівсфероїди та сфероїди – структури, утворені поодинокими суперспіральними молекулами ДНК, – та показано, що тороїди також можуть бути утворені поодинокими молекулами ДНК. На основі аналізу отриманих зображень запропоновано модель можливих конформаційних переходів суперспіральної ДНК *in vitro* за відсутності протеїнів при зростанні рівня компактизації ДНК. Компактизація поодиноких суперспіральных молекул ДНК обумовлена екрануванням негативно заряджених фосфатних груп ДНК, що взаємно відштовхуються, позитивно зарядженими аміногрупами амінослюди.

9. Показано, що новий метод характеристики субстратів, заснований на візуалізації конформації плектонемічно суперспіральных молекул ДНК, є надзвичайно інформативним навіть порівняно з АСМ у режимі силових вимірювань, оскільки дозволяє отримати додаткову інформацію про поверхневі властивості субстрату, на якому іммобілізовані молекули ДНК. Візуалізовано хрестоподібну структуру суперспіральної ДНК pUC8 і показано, що розмір стебла її шпильки становить 11 пар нуклеотидів, а петля містить 4 нуклеотиди.

10. Візуалізовано РНК-транскрипти (у вигляді джгутоподібних конденсованих структур) та комплекси, що утворює РНК-полімераза (РНКП) бактеріофага T7 з ДНК-матрицею (яка містить промотор та термінатор транскрипції T7 РНКП) в процесі транскрипції. Показано, що на одній молекулі ДНК-матриці 2-3 молекули T7 РНКП одночасно утворюють як специфічні комплекси з кінцевими фрагментами ДНК-матриці, так і комплекси в області термінації та в процесі елонгації транскрипції. Візуалізовані комплекси ДНК – T7 РНКП з трьома молекулами білка на одній молекулі ДНК-матриці відповідають етапам ініціації, елонгації та термінації транскрипції.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ**

1. *Лиманский А.П.* Визуализация крестообразной структуры суперспиральной ДНК посредством атомно-силовой микроскопии // *Биофизика*. – 2000. – Т. 45, № 6. – С. 1039-1043.
2. *Лиманський О.П., Лиманська О.Ю.* Атомно-силова мікроскопія: від візуалізації молекул ДНК та клітин до вимірювання сили міжмолекулярних взаємодій // *Біологічний вестник*. – 2001. – Т. 5, № 1-2. – С. 124-132.
3. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированной слюды как субстрата для атомно-силовой микроскопии нуклеиновых кислот // *Біополімери і клітина*. – 2001. – Т. 17, № 4. – С. 292-297.
4. *Лиманський О.П., Лиманська О.Ю.* Вивчення геномної ДНК мікроорганізмів методом атомно-силової мікроскопії // *Цитология и генетика*. – 2002. – Т. 36, № 4. – С. 30-36.
5. *Limansky A., Shlyakhtenko L., Schaus S., Henderson E., Lyubchenko Y.* Aminomodified probes for atomic force microscopy // *Probe Microscopy*. – 2002. – Vol. 2, № 3-4. – P. 227-234.
6. *Лиманский А.П.* Исследование аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии биомолекул // *Біополімери і клітина*. – 2002. – Т. 18, № 1. – С. 62-70.
7. *Лиманський О.П.* Вивчення хрестоподібної структури суперспіральної ДНК плазміди pUC8 за допомогою атомно-силової мікроскопії та комп'ютерного моделювання // *Біополімери і клітина*. – 2002. – Т. 18, № 5. – С. 401-405.
8. *Лиманський О.П., Лиманська О.Ю.* Візуалізація ціанобактерій у водному розчині за допомогою атомно-силової мікроскопії // *Цитология и генетика*. – 2003. – Т. 37, № 1. – С. 68-71.
9. *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.
10. *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.
11. *Лиманський О.П.* Надсуперспіралізація та компактизація суперспіральної ДНК // *Цитология и генетика*. – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 64-71.
12. *Лиманська О.Ю., Лиманська Л.О., Лиманський О.П.* S-форма ДНК – надсуперспіральна макромолекула з  $\sim 2$  Å відстанню між парами нуклеотидів вздовж осі дуплекса // *Біополімери і клітина*. – 2005. – Т. 21, № 6. – С. 515-524.
13. *Лиманский А.П.* Визуализация ампликонов после проведения полимеразной цепной реакции // *Биофизика*. – 2005. – Т. 50, № 6. – С. 1019-1024.
14. *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.

15. Лиманська О.Ю., Лиманська Л.О., Лиманський О.П. Компактизація суперспіральної ДНК на модифікованій амінослюді // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, № 1. – С. 18-28.
16. Лиманський О.П. Аміномодифіковані зонди з ковалентно приєднаними молекулами для атомно-силової мікроскопії // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 70-80.
17. Лиманский А.П. Функционализация аминомодифицированных зондов для атомно-силовой микроскопии // Биофизика. – 2006. – Т. 51, № 2. – С. 225-235.
18. Лиманская Л.А., Лиманский А.П. Компактизация единичных молекул суперспиральной ДНК, адсорбированных на аминослюде // Биоорганическая химия. – 2006. – Т. 32, № 5. – С. 494-510.
19. Лиманський О.П. Візуалізація комплексу ДНК з Т7 РНК-полімеразою за допомогою атомно-силової мікроскопії // Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23, № 1. – С. 3-13.
20. Лиманський О.П. Візуалізація комплексів РНК-полімерази бактеріофага Т7 з ДНК-матрицею при елонгації транскрипції // Укр. біохім. журн. – 2007. – Т. 79, № 1. – С. 94-103.
21. Лиманський О.П. Візуалізація РНК-транскриптів за допомогою атомно-силової мікроскопії // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 41, № 2. – С. 12-18.
22. 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.
23. Пат. 13571 Україна, МКІ С12Q 1/04, С12Q 1/68. Спосіб модифікації слюди, субстрату для атомно-силової мікроскопії: Пат. 13571 Україна, МКІ С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманський О.П., Лиманська О.Ю., Волянський А.Ю., Руденко С.С., Драч М.І., Лиманська Л.О., Клімов О.І. (Україна); Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 200508247; Заявл. 22.08.2005; Опубл. 17.04.2006. – 14 с.
24. Пат. 17942 Україна, МКІ С12Q 1/04, С12Q 1/68. Спосіб витягнення лінійних та суперспіральних молекул ДНК: Пат. 17942 Україна, МКІ С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманський О.П., Лиманська О.Ю., Волянський А.Ю., Руденко С.С., Драч М.І., Лиманська Л.О., Клімов О.І. (Україна); Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 200604603; Заявл. 25.04.2006; Опубл. 16.10.2006. – 8 с.
25. Пат. 17981 Україна, МКІ С12Q 1/04, С12Q 1/68. Спосіб стиснення лінійних та суперспіральних молекул ДНК: Пат. 17981 Україна, МКІ С12Q 1/04С 12 Q 1/68 / Лиманський О.П., Лиманська О.Ю., Волянський А.Ю., Руденко Л.М., Кучма І.Ю., Лиманська Л.О., Пугач Н.Б. (Україна); Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України. – № 200604883; Заявл. 03.05.2006; Опубл. 16.10.2006. – 8 с.
26. Limansky A., Limanskaya O., Kamensky Yu., Vovk O., Vashchenko L. Study of fullerene structure by scanning tunneling microscopy // Proc. 185<sup>th</sup> Meeting of The Electrochemical Society. – San Francisco (USA). – 1994. – P. 215-216.

27. *Limansky A.* Chemical force microscopy of aminommodified AFM tips and substrates // Proc. International Symp. "Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures". – Tokyo (Japan). – 2001. – 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". – Tokyo (Japan). – 2001. – 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 молодих науковців, аспірантів та студентів з молекулярної біології і генетики. – Київ (Україна). – 2001. – С. 106.
30. *Lymanskiy A.* Cruciform structure in supercoiled DNA: imaging by atomic force microscopy and computer modeling // Proc. 8<sup>th</sup> International Symp. on Molecular Aspects of Chemotherapy. – Gdansk (Poland). – 2001. – P. 192.
31. *Lymanskiy A.* Atomic force microscopy aminommodified tips and substrates for DNA immobilization // Proc. 8<sup>th</sup> International Symp. on Molecular Aspects of Chemotherapy. – Gdansk (Poland). – 2001. – 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. 1<sup>st</sup> FEMS Congress of European Microbiologists. – Ljubljana (Slovenia). – 2003. – P. 442.
34. *Limanskaya O., Limanskii A.* Imaging of S-DNA – new DNA form with  $\sim 2$  Å rise per base pair // Proc. 15<sup>th</sup> IUPAB & 5<sup>th</sup> 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. 15<sup>th</sup> IUPAB & 5<sup>th</sup> EBSA International Biophysics Congress. – Montpellier (France). – 2005. – 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.

## АНОТАЦІЯ

**Лиманський О.П. Модифікація та функціоналізація зондів і субстратів для нанобіотехнології. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2007.

Представлено експериментальні результати розробки та характеристики модифікованих та функціоналізованих біополімерами зондів та субстратів для атомно-силової мікроскопії (АСМ), а також результати досліджень внутрішньомолекулярної компактизації поодиноких молекул ДНК при іммобілізації на субстраті під впливом його поверхневих властивостей. Створено та охарактеризовано за допомогою АСМ у режимі силових вимірювань амінослюда (субстрат для іммобілізації біополімерів) з регульованою гідрофобністю та поверхневою щільністю заряду, а також аміномодифіковані і функціоналізовані біополімерами (ДНК, бичачим сироватковим альбуміном) АСМ-зонди. На основі АСМ-даних доведено, що ДНК представляє своєрідну молекулярну пружину, яка може бути не тільки розтягнута, але й стиснута. Поряд з тягненими лінійними молекулами ДНК фага  $\lambda$  та суперспіральними ДНК pGEMEX (які характеризувалися відстанню між нуклеотидами вздовж осі спіралі  $H = 4,87 - 5,36 \text{ \AA}$ ) візуалізовано поодинокі молекули з надзвичайно високим рівнем компактизації, ступінь суперспіралізації яких значно вищий порівняно з раніше досягнутими експериментально та розглянутими теоретично. Такі стиснуті суперспіральні молекули ДНК, які характеризувалися  $1,94 \text{ \AA} < H < 2,19 \text{ \AA}$ , були віднесені до нової форми ДНК – S-ДНК. Встановлено, що молекули ДНК компактизуються до рівня сфероїдів через три етапи послідовного складання вдвічі із зменшенням довжини осі суперспіралі, тобто з утворенням осей суперспіралі другого та третього порядків.

**Ключові слова:** суперспіральна ДНК, атомно-силова мікроскопія (АСМ), амінослюда, S-ДНК, надсуперспіралізація, компактизація ДНК, адсорбція ДНК, сфероїд, тороїд, силові вимірювання, функціоналізація зонда, хрестоподібна структура.

## 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 характеристики модифицированных и функционализированных биополимерами зондов и субстратов для атомно-силовой микроскопии (АСМ), 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 аminosилана, посредством варьирования условий модификации слюды получена модифицированная аминослюда как с повышенной, так и с пониженной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминокрупп 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  $I = 10 \text{ mM Na}^+ \rightarrow I = 100 \text{ mM Na}^+ \rightarrow \text{pH } 11,2$ . Аминозонды были функционализированы посредством нековалентного связывания с ДНК и ковалентного взаимодействия с глутаральдегидом. 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  $\lambda$  и суперспиральные молекулы ДНК pGEMEX визуализированы на поверхности аминослюды с пониженной гидрофобностью и поверхностной плотностью аминокрупп под действием направленного потока воды. Для тянутых молекул ДНК pGEMEX длиной 3993 п.н. определенное из АСМ-изображения посредством измерения контурной длины расстояние между нуклеотидами вдоль оси спирали составило  $H = 4,87 - 5,36 \text{ \AA}$ .

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  $1,94 \text{ \AA} < H < 2,19 \text{ \AA}$ . 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 pGEMEX, 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 характеристики, 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 pUC8 и показано, что размер ее шпильки составляет 11 пар нуклеотидов, а петля содержит 4 нуклеотида.

**Ключевые слова:** суперспиральная ДНК, атомно-силовая микроскопия (АСМ), 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, 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  $\lambda$  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.