

Давыдова О.К.

(аспирантка кафедры общей биологии ОГУ, сотрудник института микро- и нанотехнологий ОГУ),

Никиян А.Н.

(кандидат физико-математических наук, сотрудник института микро- и нанотехнологий ОГУ),

Дерябин Д.Г.

(доктор медицинских наук, профессор кафедры общей биологии ОГУ)

ФОРМИРОВАНИЕ УПОРЯДОЧЕННЫХ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ДНК В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ В ПРИСУТСТВИИ АЛКИЛРЕЗОРЦИНОВ

Описано формирование упорядоченных линейных надмолекулярных структур высокополимерной ДНК, происходящее в водных растворах в присутствии низкомолекулярных лигандов из группы алкилрезорцинов (АР). С использованием атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии визуализированы последовательные этапы подобного процесса, начинающегося с образования мицеллоподобных структур на обособленных нитях ДНК и завершающегося их объединением в кабельные структуры, окруженные единым алкилрезорциновым «чехлом». На основании представленных результатов, а также ранее полученных данных об изменении физико-химических свойств ДНК в присутствии АР предложена модель взаимодействия между этими молекулами.

Выяснение физико-химических механизмов структурной организации биологических систем, процессов формирования функциональных надмолекулярных структур, а также разработка подходов к их управляемому созданию являются важными фундаментально-прикладными задачами современной молекулярной биологии. Их решение является условием для обоснования новых подходов в таких перспективных областях, как биоинженерия, молекулярная электроника и биотехнология.

В этом контексте значительное внимание привлекают к себе способы создания упорядоченных структур дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), что объясняется не только важной ролью данной молекулы как носителя генетической информации, но и ее уникальными физико-химическими свойствами, которые в перспективе могут быть использованы для создания принципиально новых наноустройств и наноматериалов. Так, работы по созданию упорядоченных ДНК-содержащих структур на протяжении ряда последних лет проводятся в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН под руководством д.х.н. Ю.М. Евдокимова [1]. При этом в основу подобных технологий авторами положено взаимодействие ДНК с различными поликатионами, что позволяет сблизить молекулы биополимера за счет устранения эффекта электростатического отталкивания. Возникающее же в результате этого фазовое исключение молекул ДНК из водно-полимерных растворов переводит их в жидкокристаллическое состояние, что получило свое использование при создании оригинальных биодатчиков [2].

На этом фоне значительно менее изученными оказываются иные типы взаимодействий,

потенциально также участвующие в упорядоченном расположении молекул ДНК в биологических системах. В полной мере сказанное может быть отнесено к относительно слабо изученным гидрофобным взаимодействиям между молекулами ДНК и низкомолекулярными лигандами, также позволяющим обеспечить фазовое исключение ДНК из водных растворов. В частности, указанная возможность относительно недавно была продемонстрирована на примере взаимодействия ДНК с катионными амфифилами N-триметилалкильного ряда с формированием на протяжении биополимера упорядоченно расположенных мицеллоподобных структур [3, 4].

Предметом настоящего исследования стало изучение взаимодействия ДНК с еще одной группой амфифильных низкомолекулярных лигандов – алкилрезорцинов (АР), биологическая активность которых определяется переходом бактериальных клеток в метаболически неактивное «покоящееся» состояние. При этом принципиально важным представляется наблюдение о существенных морфологических перестройках нуклеоида бактерий, сопровождающих их переход в покоящееся состояние и проявляющихся в формировании упорядоченных электронноплотных тяжистых структур.

Совокупность накопленных фактов стала основой для проведения настоящего исследования, целью которого явилось динамическое изучение морфологии структур ДНК, образующихся в водных растворах в присутствии АР.

При проведении исследования использовали коммерческий препарат высокополимерной линейной ДНК, выделенной из селезенки быка и очищенной до гомогенного состояния (соот-

ношение оптической плотности $D_{260/280} = 1,8$), а также линейные фрагменты ДНК фага λ , расщепленные эндонуклеазой Hind III и имеющие длины 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 и 23130 нуклеотидных пар («Сибэнзим», Россия). В качестве химических аналогов бактериальных ауторегуляторов из группы алкилрезорцинов [5, 6] использовали метилрезорцин (МР, мол. вес = 124), гексилрезорцин (ГР, мол. вес = 194) со степенью очистки 99,9%, а также структурно и функционально близкий им 2-(4-гидроксифенил)этан-1-ол – тирозол (Т, мол. вес = 138), являющийся ауторегуляторным d_1 -фактором дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [7]. Рабочие концентрации данных веществ в исследуемых растворах составляли 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} М при стандартной концентрации ДНК, равной 10^{-4} М (по нуклеотидам), так что ее молярное соотношение с АР в различных пробах составляло 1:10, 1:1 и 10:1. Предынкубация смеси ДНК с АР осуществлялась в течение 5 недель при 4°C . В качестве контролей использовали только ДНК или только АР в тех же концентрациях, инкубированные при тех же условиях.

Для изучения морфологии структур, образующихся в водных растворах ДНК в присутствии АР, использовали атомно-силовую и сканирующую электронную микроскопию. Приготовление препаратов для атомно-силовой микроскопии (АСМ) проводилось на 1, 2, 3, 4 и 5 неделе инкубации путем нанесения образцов ДНК и комплексов ДНК-АР на свежий скол слюды. Сканирование осуществляли после полного высыхания образцов с помощью зондового микроскопа СММ-2000Т (Зеленоград, Россия) на воздухе, используя кантилевер с радиусом иглы 15 нм. Растровую электронную микроскопию образцов ДНК+АР на кремниевой подложке проводили в электронном микроскопе JSM-20 (JEOL, Япония) в различных точках. При этом один и тот же локальный участок образца сканировался при различных степенях увеличения.

Полученные результаты позволили констатировать, что в контрольных образцах АР каждой из использованных концентраций на всем протяжении эксперимента не были визуализированы какие-либо структуры. В свою очередь, контрольные пробы ДНК были представлены линейными фрагментами, имеющими ширину порядка 30-50 нм, что объясняется эффектом «уширения», зависящим от радиуса кривизны иглы кантилевера.

Иную морфологию имели структуры, образующиеся в водных растворах использованных образцов ДНК в присутствии АР. При этом на ранних сроках инкубации (1-2 неделя) в исследуемых образцах выявлялись линейные фрагменты, неотличимые от описанных выше контрольных проб (рис. 1а). С течением времени (на 2-3 неделе инкубации) в присутствии ГР, среди прочих использованных АР, имеющего наибольшую длину алкильного радикала, фиксировалось образование на нитях ДНК сферических мицеллоподобных структур диаметром около 200 нм, расположенных по длине данного биополимера на расстоянии от 250 до 500 нм между собой (рис 1б). В то же время ни в контрольных растворах ДНК, ни в ее смесях с МР или Т образования подобных структур не было выявлено.

Дальнейшее увеличение времени инкубации смесей ДНК+ГР до 5-6 недель сопровождалось формированием утолщенных разветвленных тяжистых структур, как по своей длине, так и по ширине превышающих размеры исходных ДНК-фрагментов и в точках пересечения объединяемых описанными выше мицеллоподобными наноструктурами. При этом последние имели тенденцию к увеличению до 1 мкм в диаметре, а также приобретали отличную от сферической «неправильную» форму, сопровождая по ходу участки ветвления нитей ДНК (рис. 1в). В те же сроки инкубации значительно менее выраженные, но имеющие аналогичный характер изменения были зафиксированы в пробах ДНК+МР, но не в ДНК+Т.

Итогом этого процесса стало формирование в водных растворах ДНК+АР визуально различных иглоподобных структур, изучение которых в сканирующем электронном микроскопе позволило охарактеризовать их как протяженные «кабельные» структуры толщиной 10-100 мкм, состоящие из ряда параллельно ориентированных нитей ДНК, объединенных единым алкилрезорциновым «чехлом». При этом микроскопия концевых участков данных структур позволила зафиксировать картину выхода нитей ДНК из единого надмолекулярного образования с сохранением за каждой из них своей индивидуальности (рис. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о формировании в водных растворах ДНК в присутствии АР упорядоченных надмолекулярных структур данного биополимера, сопровождающихся его изоляцией от водного окружения. При этом обращает на себя

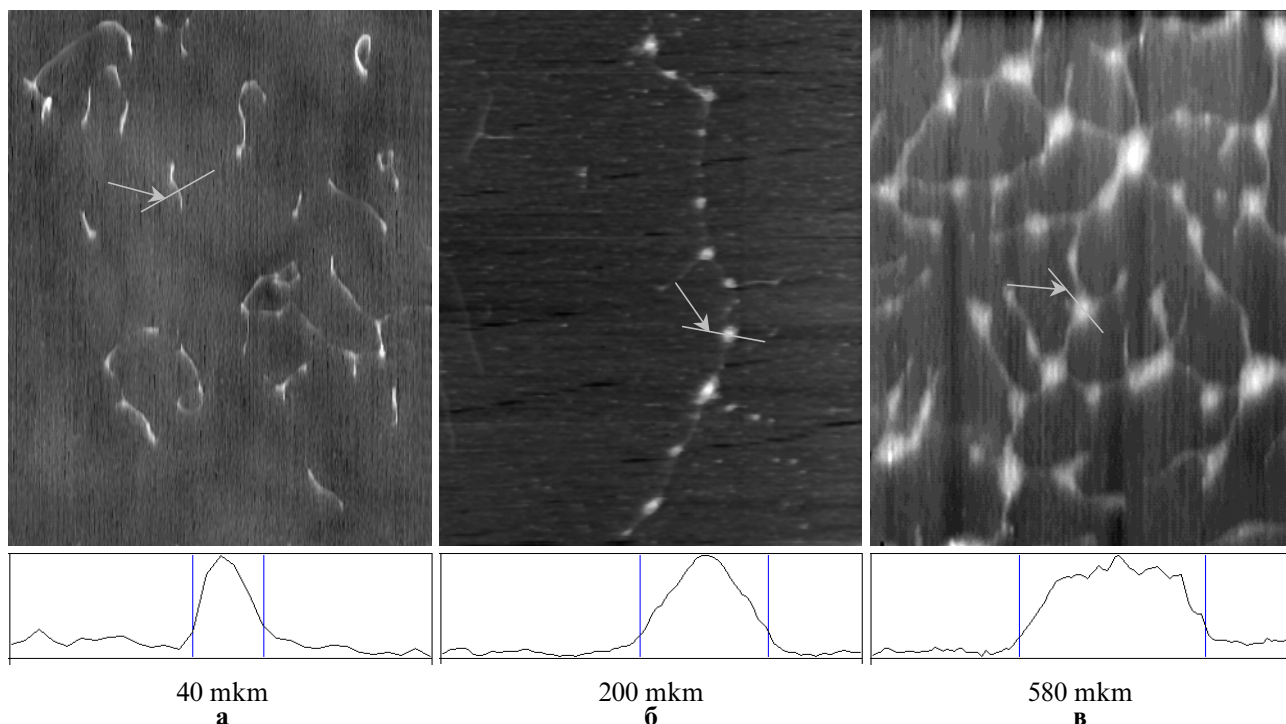


Рисунок 1. Результаты АСМ-сканирования проб ДНК+АР на 1 (а), 3 (б) и 5 (в) неделях контакта. Вверху: АСМ-изображения (6x8 мкм); внизу: профили объектов, измеренные по линиям (показаны стрелками).

внимание невысокая скорость этого процесса, что заставляет исключить участие в нем электростатических сил. На этом фоне среди прочих наиболее вероятными представляются гидрофобные взаимодействия, одним из аргументов в пользу чего является зависимость выраженности регистрируемых эффектов от длины алкильного радикала, формирующего гидрофобный полюс амфифильных молекул АР.

В этом контексте гипотетический характер взаимодействия ДНК с АР, в котором можно выделить три основных этапа, представляется

нам следующим образом. На первом этапе (рис. 3а) происходит первичное взаимодействие между названными молекулами, в основном за счет взаимодействий алкильных радикалов АР с гидрофобными участками ДНК. Предполагается, что подобные участки распределены на данном линейном биополимере неравномерно, в результате чего в некоторых из них постепенно происходит преимущественное накопление АР, локальное превышение содержания которых результируется в образовании на ДНК видимых в АСМ мицеллоподобных наноструктур (рис. 3б). В этой связи следует также указать, что способность к мицеллообразованию вообще является свойством, изначально присущим амфифильным молекулам АР, что ведет к формированию подобных структур в водных растворах при превышении неких пороговых критических концентраций мицеллообразования – ККМ [8]. Однако в данном случае речь должна идти о существенных особенностях этого процесса, происходящего не в растворе, а в отдельных участках линейной молекулы ДНК, которые становятся своеобразными «ядрами конденсации» для молекул АР. На последнем же третьем этапе на поздних сроках инкубации аранжированные низкомолекулярным лигандом (АР) молекулы ДНК начинают взаимодействовать друг с другом, что приводит к формированию

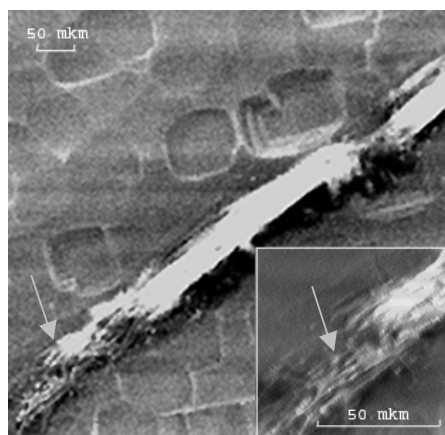


Рисунок 2. Результаты сканирующей электронной микроскопии комплекса ДНК+ГР (5 неделя инкубации). На врезке: выход нитей ДНК из единой «кабельной» структуры (отмечено стрелками).

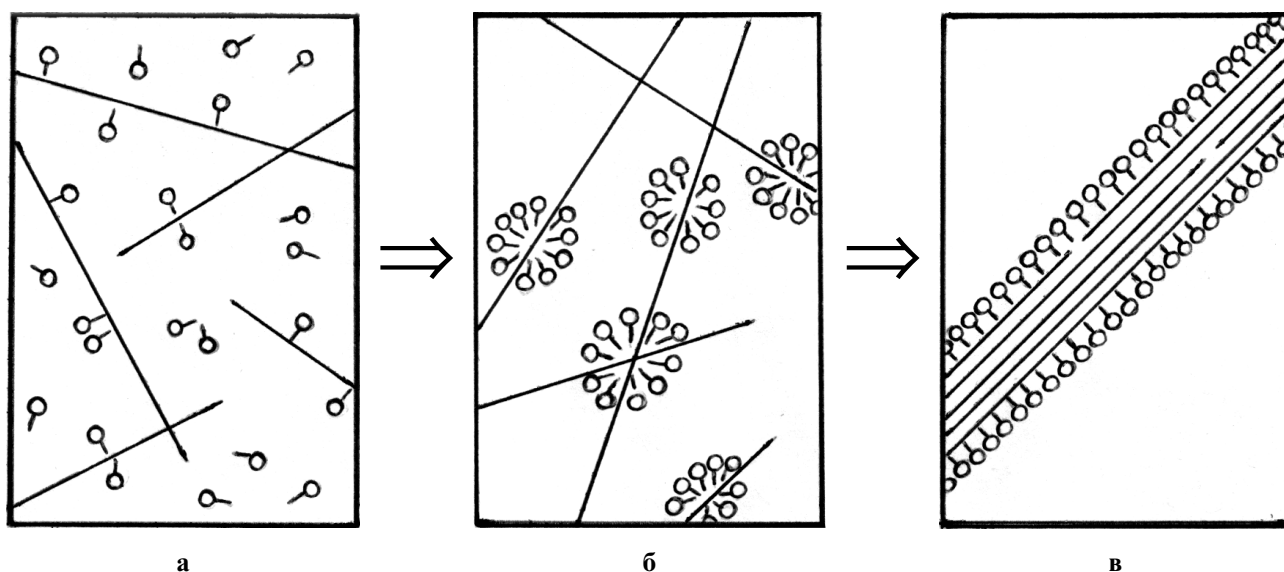


Рисунок 3. Предполагаемые этапы образования комплексов ДНК+АР (пояснения в тексте).

упорядоченных тяжистых структур, состоящих из множества параллельно расположенных нитей ДНК (рис. 3в).

Предложенная модель достаточно хорошо объясняет различия во взаимодействии ДНК с различающимися гидрофобностью гомологами АР: метил- и гексилрезорцином, а также согласуется с ранее обнаруженными нами изменениями физико-химических свойств ДНК в присутствии АР. В частности, формирование гипохромизма комплексов ДНК+АР предположительно оказывается связанным с эффектом светорассеяния на мицеллоподобных структурах подобно тому, как это показано для случая взаимодействия ДНК с катионными амфифилами N-триметилалкильного ряда [4]. Объяснимыми оказываются и эффекты повышения температуры плавления и вязкости, а также снижение

электрофоретической подвижности комплексов ДНК+АР, определяемые как объединением их в крупные надмолекулярные структуры, так и нейтрализацией отрицательного заряда фосфатных групп в молекуле ДНК в результате экранирования поверхностно связавшимися низкомолекулярными лигандами.

Формирующиеся в результате этого «кабельные» структуры ДНК обладают рядом особых свойств, что в перспективе может дать возможность для их использования в ряде биотехнологических и нанотехнологических устройств. В частности, одним из возможных прикладных аспектов проведенного исследования может стать разработка нового подхода к решению вопроса упорядоченной укладки нанопроводов, созданных в результате металлизации полимерных молекул ДНК [9].

Список использованной литературы:

1. Нечипуренко Ю.Д., Рябоконт В.Ф., Семёнов С.В., Евдокимов Ю.М. Термодинамические модели, описывающие образование «мостиков» между молекулами нуклеиновых кислот в жидких кристаллах // *Биофизика*. 2003. Т. 48. Вып. 4. С. 635-643.
2. Евдокимов Ю.М. Жидкокристаллические формы нуклеиновых кислот // *Вестник РАН*. 2003. Т. 73. №8. С. 712-721.
3. Петров А.И., Казарян Р.Л., Сухоруков Б.И. Влияние катионных амфифилов N-триметилалкильного ряда с различной длиной алкильного фрагмента на параметры кривых плавления ДНК // *Тезисы VII съезда биофизиков России*. М., 2004. (раздел 2: Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов).
4. Сухоруков Б.И., Петров А.И., Казарян Р.Л., Кувичкин В.В. Влияние углеводородной цепи и структуры ионного фрагмента катионного амфифила на его комплексообразование с ДНК // *Тезисы II съезда биофизиков России*. М., 1999. (раздел 2: Структура и динамика нуклеиновых кислот и их комплексов).
5. Бабушенко Е.С., Эль-Регистан Г.И., Градова Н.Б., Козлова А.Н., Осипов Г.А. Исследование мембранотропных ауторегуляторных факторов метанооксилирующих бактерий // *Успехи химии*. 1991. Т. 60. Вып. 11. С. 2362-2372.
6. Вострокнутова Г.Н., Капрельянц А.С., Светличный В.А., Эль-Регистан Г.И., Шевцов В.В., Островский Д.Н. Мембраноактивные свойства препарата из культуральной жидкости бактерий, обладающего ауторегуляторным действием // *Прикладная биохимия и микробиология*. 1983. Т. XIX. Вып. 4. С. 547-551.
7. Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н., Ненашев В.А., Козлова А.Н., Грязнова М.Н., Золотарева И.Н. Тирозол – ауторегуляторный фактор d, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Микробиология*. 1993. Т. 62. Вып. 4. С. 633-638.
8. Беспалов М.М., Колпаков А.И., Лойко Н.Г., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Варламова Е.А., Курганов Б.И., Эль-Регистан Г.И. Функции аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов при создании метаболического блока в клетке // *Микробиология*. 2000. Т. 69. №2. С. 217-223.
9. Антипина М.Н., Гайнутдинов Р.В., Рахнянская А.А., Сергеев-Черенков А.Н., Толстихина А.Л., Юрова Т.В., Кислов В.В., Хомутов Г.Б. Комплексы ДНК, формируемые на поверхности водной фазы: новые планарные полимерные и композитные наноструктуры // *Биофизика*. 2003. Т. 48. Вып. 6. С. 998-1010.