Наноматериалы на основе биополимеров

МФК-2020

Лекция 9 (по ДНК лекция 2).

**Самособирающиеся структуры на основе ДНК как основа ДНК-нанотехнологи.**

**Слайды 2-3.**

После первой вводной лекции о нуклеиновых кислотах и их свойствах переходим непосредственно к созданию материалов на их основе. У этого направления есть свое название - ДНК нанотехнология. Это технология, которая стремится использовать уникальные свойства молекулярного узнавания в ДНК и других нуклеиновых кислотах для создания управляемой структуры из нуклеиновых кислот (НК). Таким образом, ДНК используется\может использоваться в качестве конструкционного материала, а не как носитель генетической информации. Зачем нужно использовать НК таким способом?

Цель нанотехнологии состоит в том, чтобы поместить определенные атомы и молекулы, где мы хотим их, и когда мы хотим. Почему выбрали НК? При использовании НК возможно реализовать динамический и функциональный контроль материала. Применение материалов на основе ДНК может привести к программируемому химическому синтезу и станут возможными наноразмерные системы, которые отзывчивы к окружающей их среде. Также это принципиально новая основа в вычислительной технике.

Само понятие ДНК-нанотехнология было введено в журнале Nature (http://www.nature.com/nnano/focus/dna-nanotechnology/index.html ). Выделяют в ДНК-нанотехнологии два направления: структурное и функциональное.

**Слайд 4.**

ДНК может быть использована в качестве материала как для создания поверхностей с повторяющимся и произвольным рисунком, так и для воплощения трехмерных объектов.

В основе создания регулярных поверхностей на основе ДНК лежит использование преформированных блоков (мотивов). Комбинируя устойчивые, разветвленные ДНК-мотивы можно произвести запрограммированные наномеханические машины и фиксированные или модифицированные шаблонные поверхности. Подбор олигонуклеотидных последовательностей для синтеза мотивов осуществляется таким образом, чтобы одна последовательность содержала несколько участков комплементарных другим последовательностям. Три таких попарно-комплементарных последовательности дают Y-подобное соединение или соединение «три руки», четыре – Х-подобное или соединение «четыре руки». (на рис. слайда каждая из последовательностей комплементарна двум другим: зеленая комплементарна красной и синей. Представлен мотив четыре руки. Этот мотив эквивалентен образующейся в природе структуре Холидея. Слева полноатомная моодель такого мотива, в которой цвета сохранены как на схеме слева. Участки 1,7,5,3 образуют подвижный стык, участки 2,4,6,8 — это двойные спирали, которые фиксируют мотив). Место сочленения (или стык) обеспечивает гибкость блока, а «руки» - участки двойной спирали – жесткость.

**Слайд 5.** Направленная сборка блоков обеспечивается наличием у двойных спиралей выступающих одноцепочечных концов, способных образовать между собой двойную спираль по принципу комплементарности (рис слайда 5), что позволяет в стучае блока «четыре руки» сформировать молекулярные сетки разной пористости и форм отверстий (размер поры определяется количеством пар нуклеотидов в «руках» блока).

**Слайд 6-8.** Непосредственное образование нового материала происходит после реакции восстановления фосфодиэфирной связи между двумя основаниями, находящимися рядом в двойной спирали, сформированой одноцепочечными концами (рис слайда 6, визуализация атомносиловой микроскопией). Такая реакция катализируется ферментом ДНК-лигазой в присутствии аденозин трифосфата. Механизм формирования фосфодиэфирной связи представлен на слайде 7. Образованная связь является ковалентной, что делает полученный материал устойчивым к внешнему воздействию: нагреванию, высокой соли и т.д.

Такие преформированные блоки с чередующимися липкими концами подходят для синтеза протяжённых плоских поверхностей регулярного рельефа [Winfree E.; Liu F.; Wenzler L. A., Seeman N. C. (1998). «Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals». Nature 394: 529–544] и сеток [Yan et al Nature, 2003].

**Слайд 9-10.** Существует возможность запрограмировать изменение поверхности, что возможно при получении новых одноцепочечных выступающих из дуплекса концов. Чтобы получить новые одноцепочечные концы, используют последовательности ДНК, которые узнают ферменты - эндонуклеазы рестрикции ферменты, узнающие определенную последовательность и вносящие разрыв в фосфодиэфирную связь в цепи ДНК. Так же перестройки возможны за счет использования последовательностей рибозимов или дезоксирибозимов (DNAzyme). Это НК с особой структурой, которые в присутствии кофакторов (например ионов Mg2+ и т.д.) вносят разрыв в цепь НК в строго определенном, заданном месте. ДНК-лигазу можно использовать для востановления материала после пересборки (см.анимацию <https://www.dnalc.org/view/15487-DNA-ligation-3D-animation-> ).

**Слайд 11.** Возможность получить новые одноцепочечные концы

 и изменить структуру проиллустрирована на схеме с включение в блок последовательности рибозима (слева) и результатом перестройки до и после добавления кофактора (визуализация атомносиловой микроскопией (АСМ)). Иллюстрация слайда:

Seeman's Laboratory: seemanlab4.chem.nyu.edu/DNAzyme.html

**Слайд 12.** Возможно усиление определенных блоков при сборке структуры в заранее запланированном месте поверхности дополнительными дуплексами. Пример надпись DNA на сетке, реализованная с помощью такого подхода [Park et al: Angewandte Chemie, 2006] (визуализация АСМ) .

**Слайд 13.** В зависимости от чередования последовательностей, формирующих блок возможна реализация образования ДНК-лент, различной ширины. Примером может служить работа [Nature Nanotechnology 4, 249 - 254 (2009), Wilner], где при использовании гексагональной основы формировали ленты шириной 20 и 40нм.

**Слайд 14.** Рассмотрим возможное применение ДНК-поверхности в качестве подложки для сборки комплексов и основы для расположения других наночастиц в пространстве. Для этого различные объекты (биомолекулы, наноцастицы металлов и т.д.) дополнительно модифицируют одноцепочечным ДНК-адаптором. Нуклеотидная последовательность адаптера определяет к какому месту ДНК-поверхности будет присоединен данный объект. На ДНК-поверхности заранее планируют выступающие свободные одноцепочечные участки, способные к образованию двойной спирали. Такое позиционирование позволяет изучать пространственно-зависимые взаимодействия между различными объектами, к примеру, биомолекулами и лигандами или для самоорганизации сложных каскадов мультиферментов, катализирующих последовательные превращения веществ.

**Слайд 15.** Так в работе [Nature Nanotechnology (2009) 4, 211 - 212, Hao Yan и др.] конечный выход двух последовательных реакций катализируемых последовательно глюкоза-оксидазой и пероксидазой хрена зависел от расстояния между этими двумя ферментами на котором они были закреплены на ДНК-поверхности. Продукт второй реакции детектировали по изменению окраски, характерной для данного соединения. Олигонуклеотидный линкер к ферментам присоединяли через аминогруппу аминокислотного остатка лизина, входящего в состав белков.

Направленное расположение молекул на ДНК поверхности повышает стереоселективность химических реакций. Химические реакции с единичными молекулами могут проходить в определенном ДНК-подложкой месте. Высокие выходы и селективность последовательного расщепления и формирования связи в этих экспериментах позволили продемонстрировать возможность химической модификации после сборки ДНК-наноструктур и их потенциальное использование в качестве локально адресуемой твердой подложки. В частности, химические реакции между функциональными группами, расположенными на разных точках на ДНК-поверхности, открывают новый тип химического синтеза, в котором монодисперсные макромолекулы могут быть синтезированы в параллельном процессе, где селективность определяется положением и ориентацией реагирующих молекул на ДНК-подложке, а не обычным последовательным синтезом и массовым использованием защитных групп.

**Слайды 16-17.** Возможна сборка полых ДНК нанотрубок, состоящих как из трех спиралей, так и 4, 6, 20-ти, от 0, 1 до 1 мкм в диаметре [Yin et al , Science (2008) ]. Такие ДНК-нанотрубки могут служить основой для расположения в пространстве наночастиц металлов. Разработаны методы коньюгации наночастиц металлов с олигонуклеотидами, можно выделить наночастицы металлов соединенные с определенным количеством коротких последовательностей ДНК (олигонуклеотидов). Это позволяет закреплять наночастицы металла в пространстве с помощью позиционирования (комплементарные взаимодействия) в собранной на основе ДНК-структуре.

**Слайды 18-19.** Возможно создание любых структур из наночастиц металлов на основе такого подхода. ДНК-сборка позволяет поместить дискретное число наночастиц в 2-х и 3-х мерном пространстве с точностью миллимикрона. На слайде 18 приведен пример нанопроводов металлов, полученных таким способом. Для получения металлической сетки необходимо осуществить на первом этапе формирование ДНК-сетки и выделить наночастицы металлов, конъюгированные только с одной молекулой ДНК, если же присоединенных молекул ДНК будет несколько и не будет пре-сформированной поверхности, то такая наночастица металла станет пространственным кластером и эффективной сборки сетки не произойдет. В Duke University выпускают гриды (расходный материал для структурных исследований методом криоэлектронной микроскопии) с порами в 6 микрон, полученные таким способом на основе ДНК-сеток (см. слайд 19).

**Слайд 20.** Создание сеток из наночастиц металлов возможно также за счет прямого попарного взаимодействия коньюгированных с наночастицами металлов олигонуклеотидами. В этом случае необходимо выделять частицы, несущие несколько олигонуклеотидов с определенными последовательностями.

**Слайд 21-22.** Защищенные ДНК-структуры могут быть использованы в коллоидных растворах наночастиц металлов для предохранения от агрегации частиц и повышения сроков хранения таких растворов. Было показано, что ДНК-шпильки на поверхности наночастиц металлов препятствуют их агрегации. Также модификация ДНК может обеспечивать контроль сборки сложносоставных наночастиц металлов.

**Слайд 23.** В отдельное направление (не с использованием блоков) создания любых структур можно выделить метод ДНК-оригами. Впервые этот метод был представлен в работе американского изобретателя Пола Ротмунда в 2006 году [Nature (2006). 440 (7082): 297–302. Rothemund, P. W. K. «Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns».]. Метод основан на взаимодействии длинной цепи ДНК с более короткими ДНК, комплементарными к тем или иным участкам длинной цепи. При переходе одноцепочечный участок –двойная спираль происходит конформационное изменение от «клубка» к «палке». Свободное вращение по фосфодиэфирным связям длинной цепи становиться ограниченным из-за образования водородных связей с основаниями короткой цепи ДНК. Сборка нужных фигур происходит так: на первом этапе рассчитывают, где должны быть двуспиральные участки, а где одноцепочечные, для получения нужной фигуры на основе длинной природной ДНК, после этого направленно синтезируют короткие ДНК-фрагменты (олигонуклеотиды — синтетические короткие ДНК («скрепки»)), комплиментарные, соответственно, рассчитанным участкам. Только после этого длинные и короткие цепи ДНК смешиваются, и смесь нагревается до температуры, при которой расплетаются все случайно образовавшиеся двуцепочечные участки. Далее в процессе охлаждения олигонуклеотиды, которые в смеси присутствуют в избытке, соединяются с намеченными для них участками длинных цепей, заставляя последние изгибаться так, как запланированно. Полученные таким образом фигуры условно можно назвать «двумерными», так как получающийся рисунок по толщине соответствует ширине двойной спирали, что для наиболее распространенной В-форме соответствует около 2.2 нм.

**Слайд 24.** В литературе описано два общих подхода к использованию ДНК-оригами для создания структурных материалов [Nanotechnology 20 (2009) 235305 (5pp). DNA origami as a nanoscale template for protein assembly. Anton Kuzyk и др.]. В одном подходе, собранные структуры ДНК-оригами используется в качестве шаблона для другого материала (сортировка). В другом, композиционный материал собирается одновременно с ДНК-оригами, т.е. методика ДНК-оригами используется для помещения отличных от ДНК молекул в определенное место в пространстве, что определяет новые свойства материалов (аналог получения нанопроводов, что рассматривали выше).

**Слайд 25.** Особое внимание хотелось бы уделить процессам ДНК-самосборки и литографии. ДНК-оригами служит в этом случае основой для литографии или используется совместно с поверхностями для сортировки [Nature Nanotechnology 4, 543 - 544 (2009) Graiger и др, Nature Nanotechnology 4, 557 - 561 (2009), Wallraff и др.]. Так пресс-релиз компании IBM от августа, 2009:

<http://www-03.ibm.com/press/us/en/pressrelease/28185.wss>

утверждает, что комбинация ДНК-оригами и литографии как метода создания чипов позволяет повысить разрешение с 25 до 6 нм.

**Слайд 26.** ДНК-оригами может быть использовано совместно с поверхностью для сортировки нано- объектов [Nature Nanotechnology 5, 121 - 126 (2010), Cha и др.]. Успешная схема такого процесса представлена на слайде. На первом этапе по принципу ДНК-оригами проводили сборку ДНК-треугольников, параллельно модифицируя наночастицы золота олигонуклеотидами, собирали треугольники с наночастицами золота в вершинах. Сортировка на поверхности позволила расположить треугольники регулярно. Конечная цель - повысить разрешение и контролировать затраты в разработке альтернативных традиционным технологиям микротехнологий.

**Слайды 27-30.** Если фермент лигазу добавить в раствор, содержащий ДНК-блоки без выступающих концов (примеры для блоков разной формы и формирование гидрогеля схематично представлены на слайде 27, визуализация струкур гидрогелей на основе разных блоков представлена на слайде 29), то есть все концы будут совместимы между собой, в результате получится трехмерный материал - гидрогель. Это трехмерный материал с контролируемым размером пор (размер зависит от длины «рук» и формы блоков), характеризуется биодеградируемостью, а скорость биодеградации зависит от структуры. Для это материала было предложено применение в качестве контейнера для лекарств [Nature Materials 5, 797 - 801 (2006), Dan Luo и др.] (слайд 28).

**Слайд 30** Отдельно стоит отметить биосовместимость таких гидрогелей, что позволяет проводить включение в них клеток животных и дальнейшее культивирование клеток, что в перспективе приведет к трехмерному культивированию клеток для тканевой инженерии и клеточной терапии [Nature Materials 5, 797 - 801 (2006), Dan Luo и др] .

**Слайды 31-33.** Вскоре после создания «двумерных» структур в технике ДНК-оригами стал возможным переход и к трехмерным структурам («трехмерная техника»). Специальные программы, позволяющие рассчитать последовательности, которые необходимо синтезировать для сборки нужной структуры, к примеру <http://cadnano.org/> (слайд 31) и пример из сборки блока в программе (слайд 32). В трехмерной технике ДНК-оригами могут быть сформированы различные нанострутуры, содержащие изгибы, это могут быть наношестеренки, нанофтулки и т.д. [Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes Science, 325:725–730, 7 (2009) Shih и др.] (схемы и визуализация АСМ представлены на слайде 33).