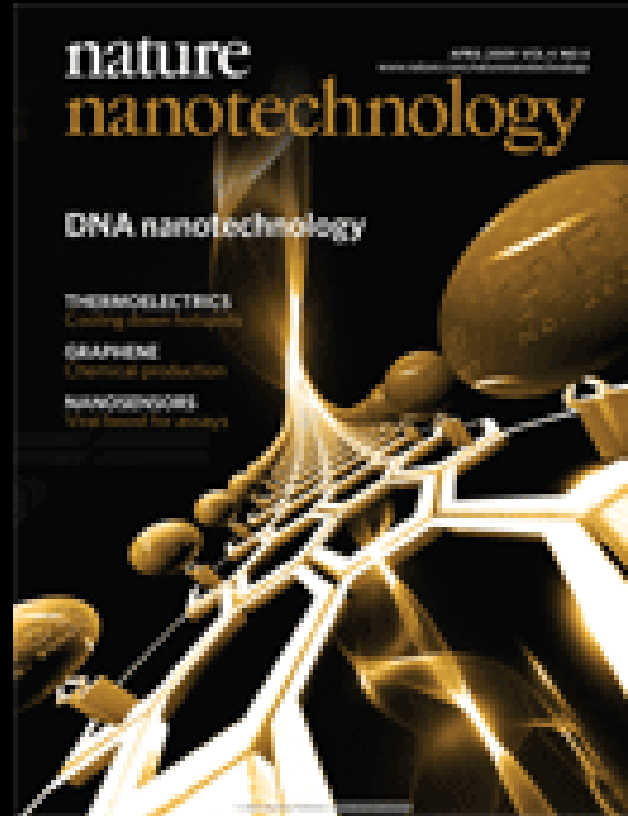


Нанотехнологии с использованием нуклеиновых кислот (ДНК, РНК).

Доцент
кафедры ХПС
Хим. Фак-та

Зверева М.Э.

zvereva@genebee.msu.ru



**ДНК нанотехнология –это использование ДНК в качестве
конструкционного материала для различных целей.**

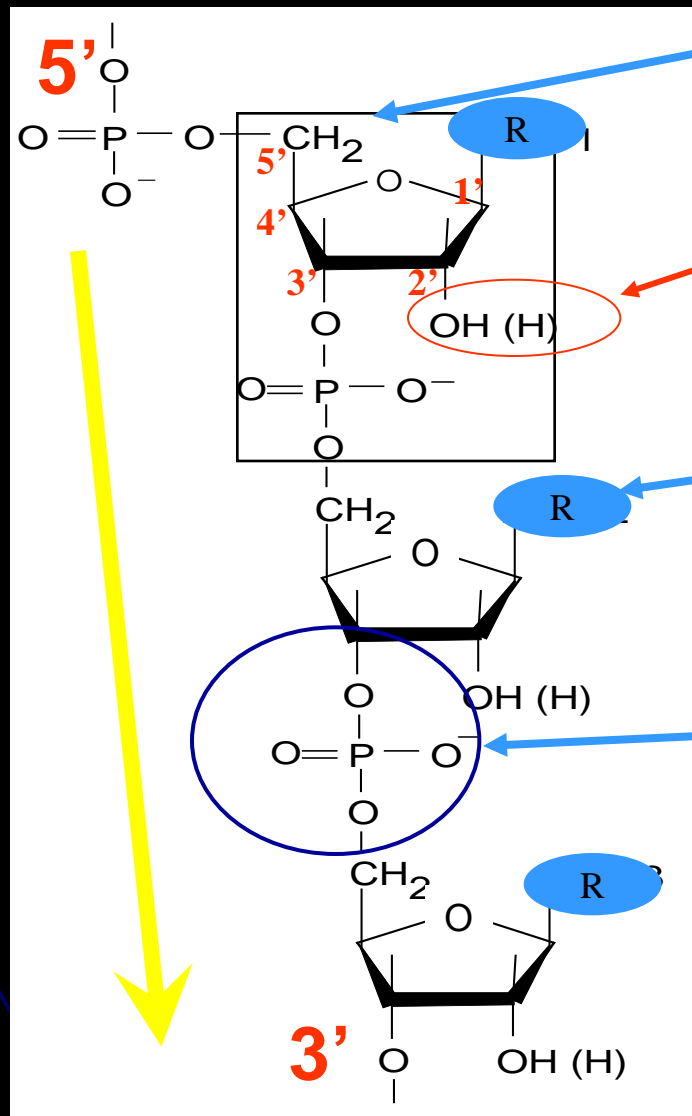
План лекции:

- 1. Введение
 - 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты?
 - 1.2. Способность к самосборке ДНК.
 - 1.3. Плавление двойной спирали ДНК.
- 2. ДНК в нанотехнологии
 - 2.1. Материалы на основе ДНК
 - 2.2. Реализация направленного движения («нанороботехника»). Каталитические НК.
 - 2.3. «ДНК-электроника»
 - 2.4. Вычисления на основе ДНК. «Сложные диагностикумы».
 - 2.5. Изменение экспрессии генов с помощью НК.

Введение: 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты?

Структура полинуклеотидной цепи

С химической точки зрения ДНК — это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков — нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара (дезоксирибозы) и фосфатной группы. Связи между нуклеотидами в цепи образуются за счёт дезоксирибозы и фосфатной группы.



нуклеотид

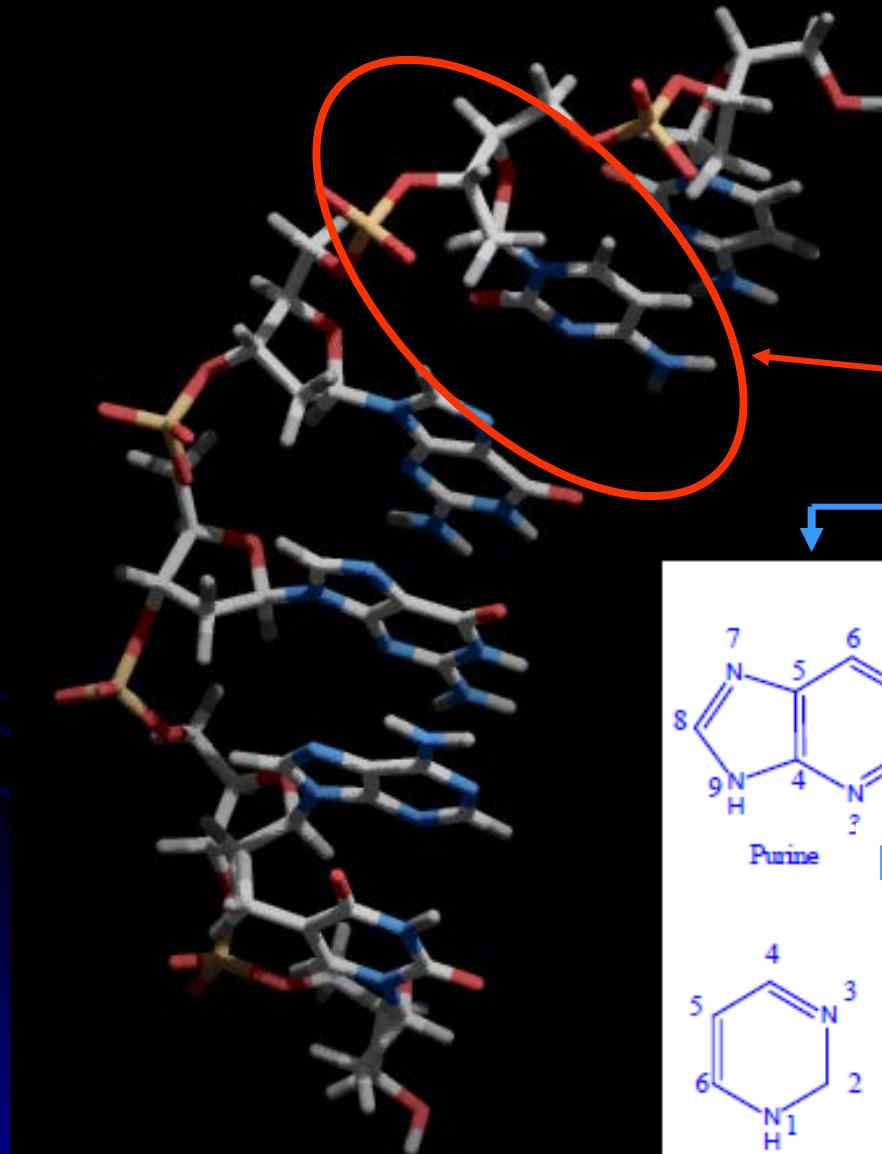
H - ДНК
ОН - РНК

гетероциклическое
(азотистое)
основание

Межнуклеотидная
связь это
фосфодиэфирная
связь (3' - 5')

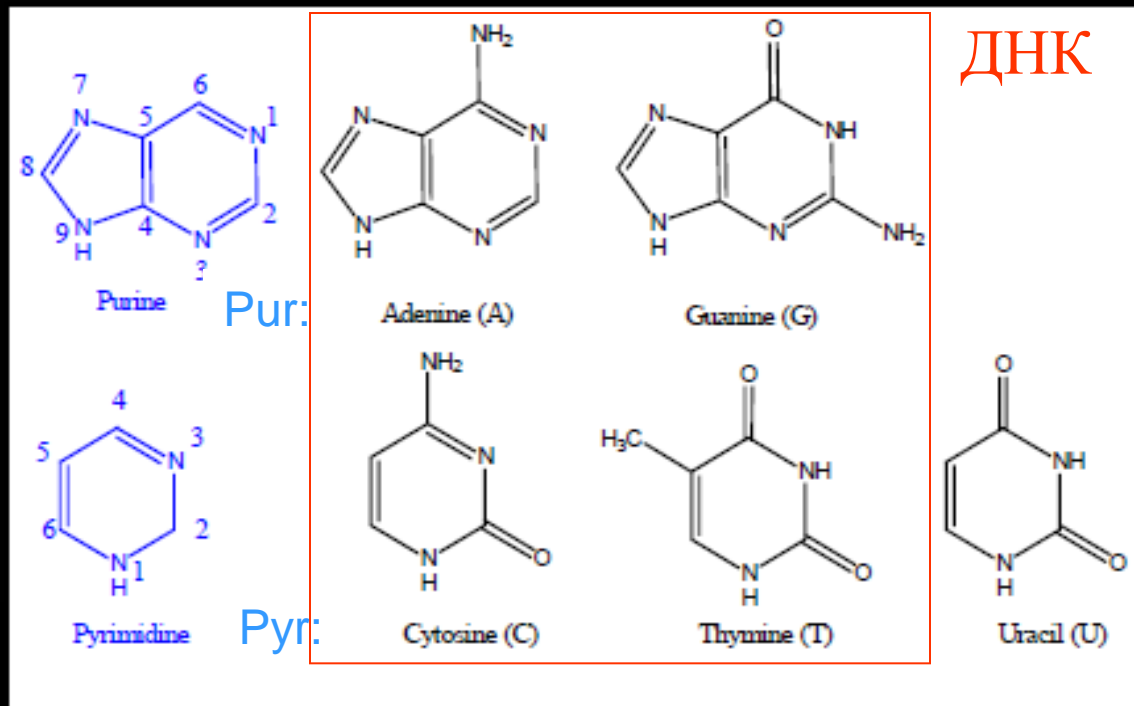
Введение: 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты (НК)?

Первичная структура НК



✓определяется последовательностью нуклеотидных звеньев (нуклеотидов), связанных между собой ковалентными связями в полинуклеотидной цепи

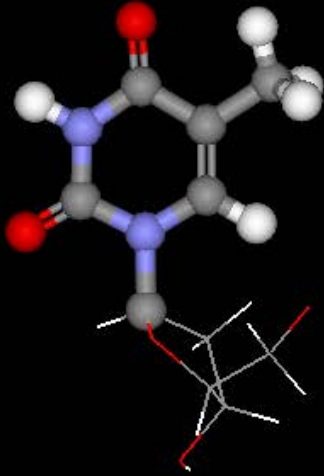
✓нуклеотид – это углеводный остаток, и фосфатная группа + гетероциклическое основание.



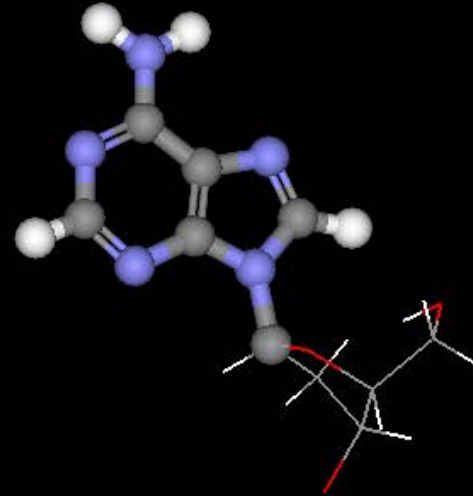
Введение: 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты?

Гетероциклические основания

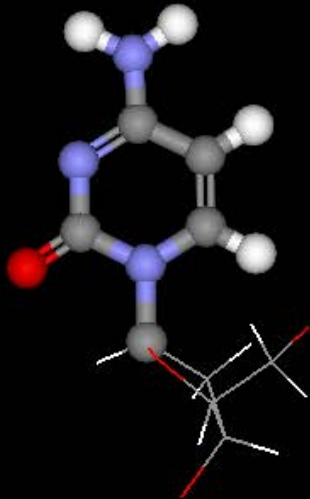
T



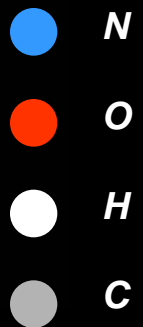
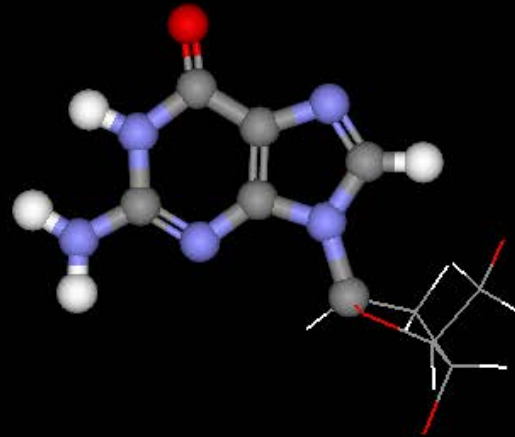
A



C



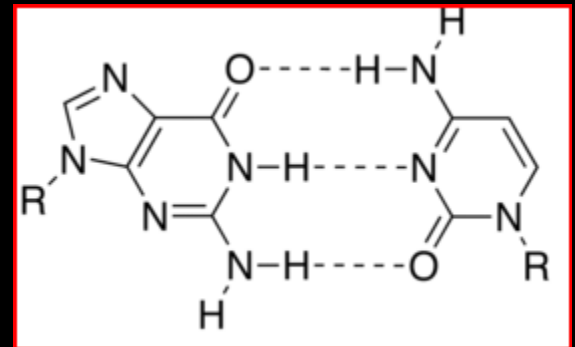
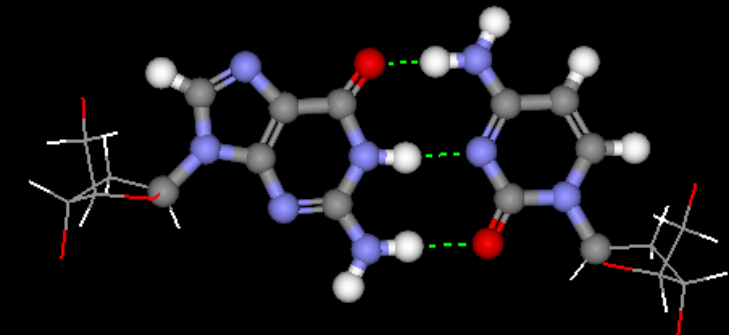
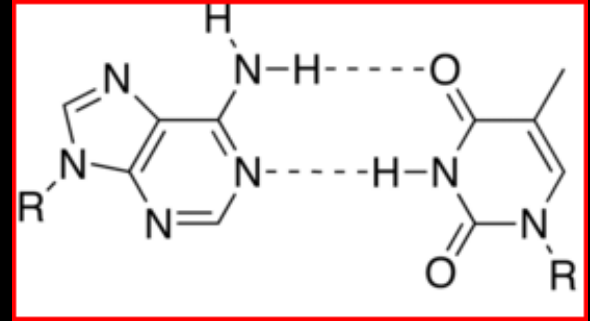
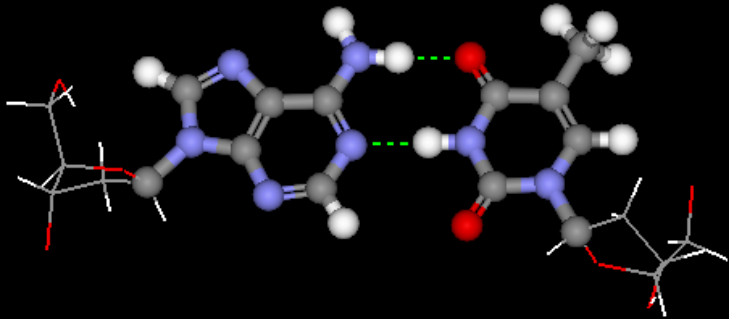
G



Введение: 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты?

Комплементарные пары оснований (водородные связи по типу Уотсон-Крика)

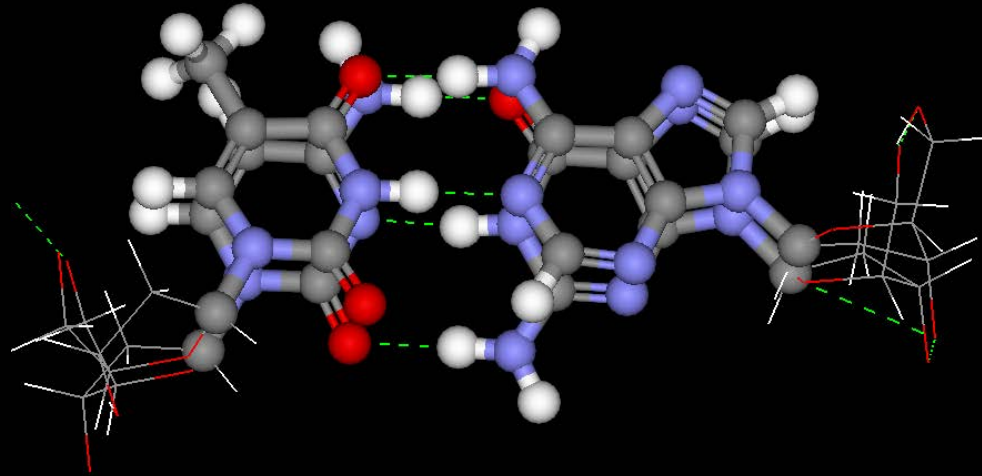
➤ Образование водородных связей между
пурином и пиримидином (А-Т и G-C)



➤ Основной тип связей при образовании двойной спирали

Введение: 1.1. Что такое нуклеиновые кислоты?

Изогеометричность комплементарных пар

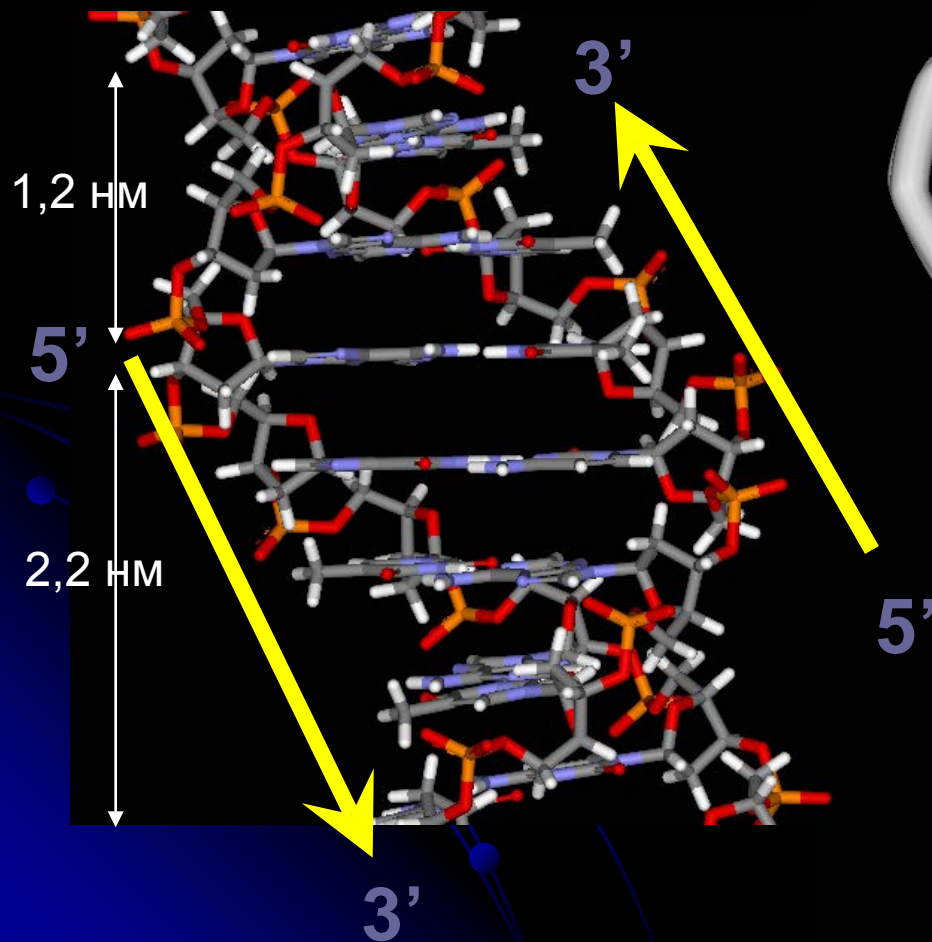


Одинаковая геометрия А-Т и G-C пар обеспечивает формирование ДНК-дуплексов, структура которых регулярна и мало зависит от нуклеотидного состава

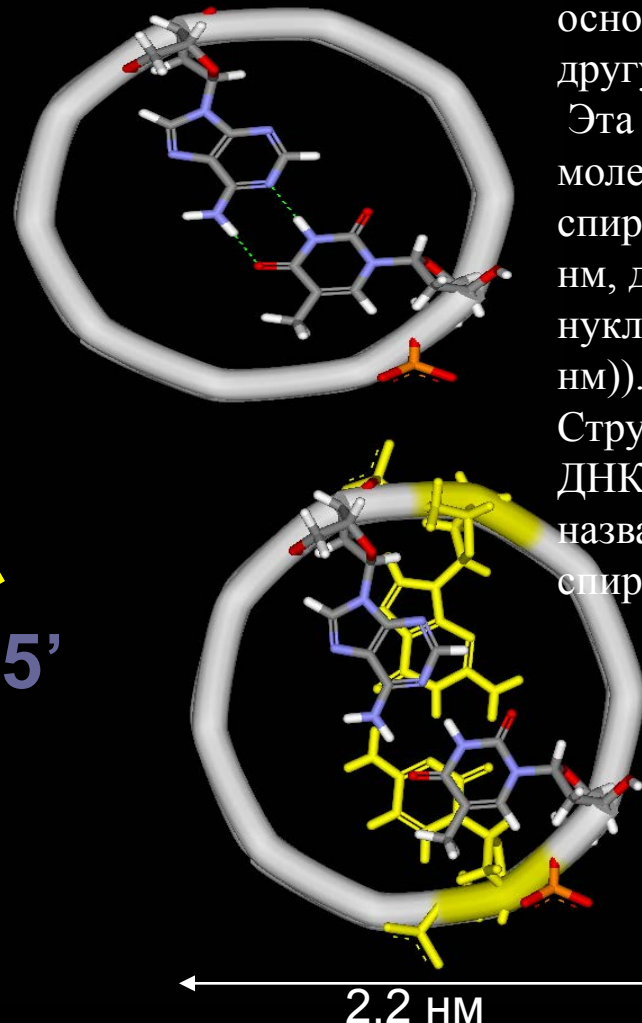
Введение: 1.2. Способность к самосборке.

Двойная спираль ДНК

вид сбоку



вид с торца



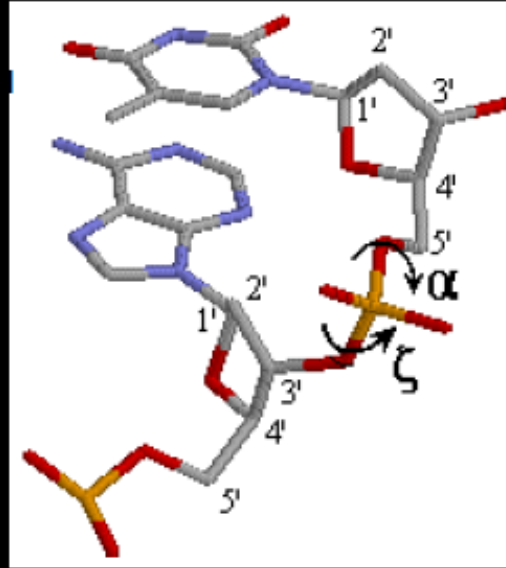
В подавляющем большинстве случаев макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу.

Эта двухцепочечная молекула спирализована (d 2,2 нм, длина одного нуклеотида 3,3 Å (0,33 нм)).

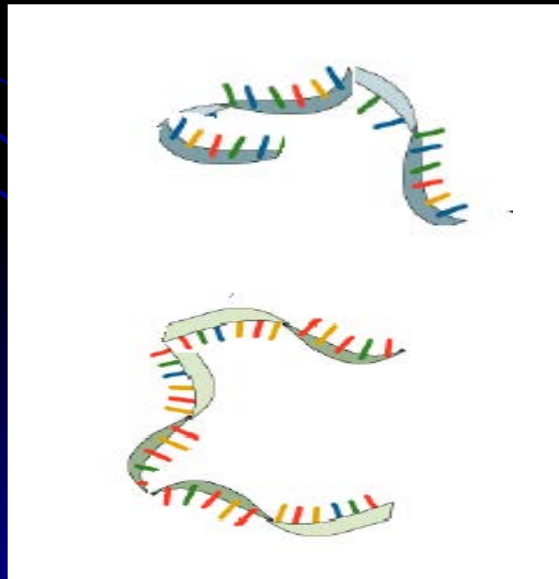
Структура молекулы ДНК получила название «двойной спирали».

Введение: 1.2. Способность к самосборке. Изменение пространственной структуры при переходе от одноцепочечной к двуцепочечной ДНК

«Клубок»



«Стержень»



Введение: 1.2. Способность к самосборке.

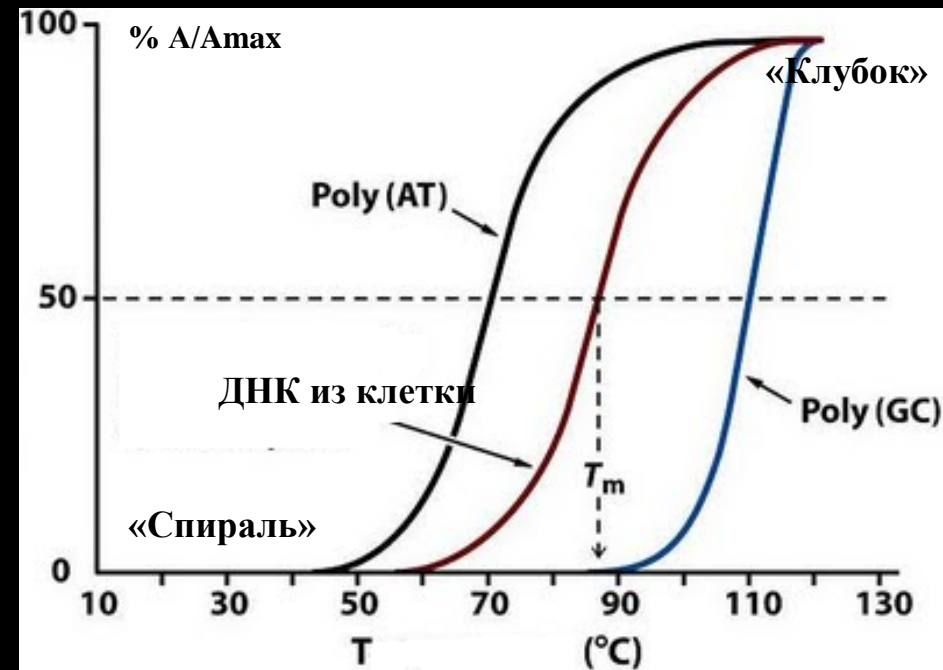
Устойчивость пространственной структуры ДНК

➤ Характеризуется температурой плавления

Плавление НК - процесс перехода регулярной двойной спирали в клубкообразное состояние.

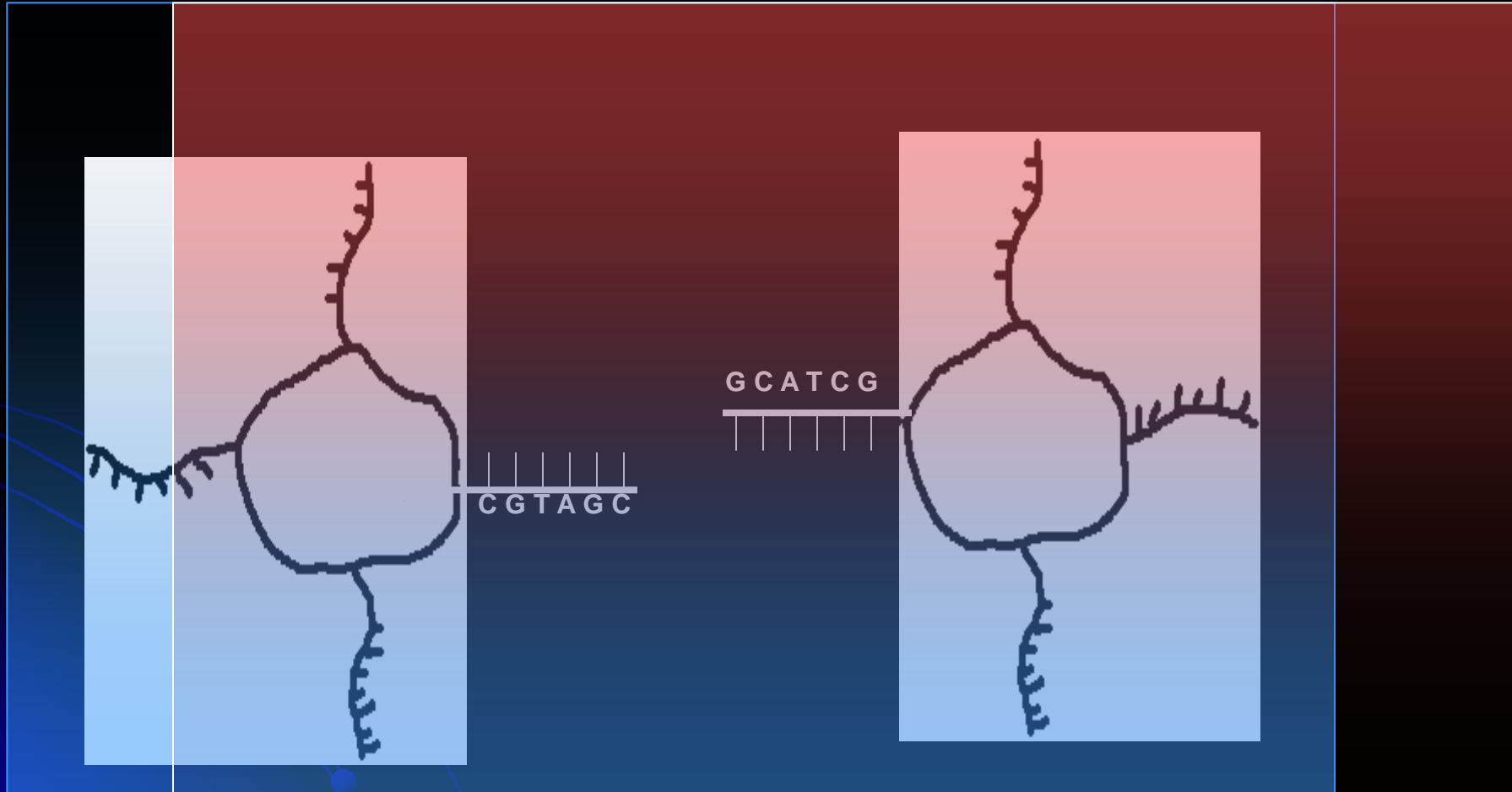
➤ Устойчивость двойной спирали определяют:

- количество А-Т и G-C
- длина дуплекса
- внешние условия: рН, концентрации ионов Na^+ , Mg^{2+}



Введение: 1.2. Способность к самосборке определяется возможностью образования водородных связей.

Плавление – обратимый процесс.



Введение: 1.2. Способность к самосборке.

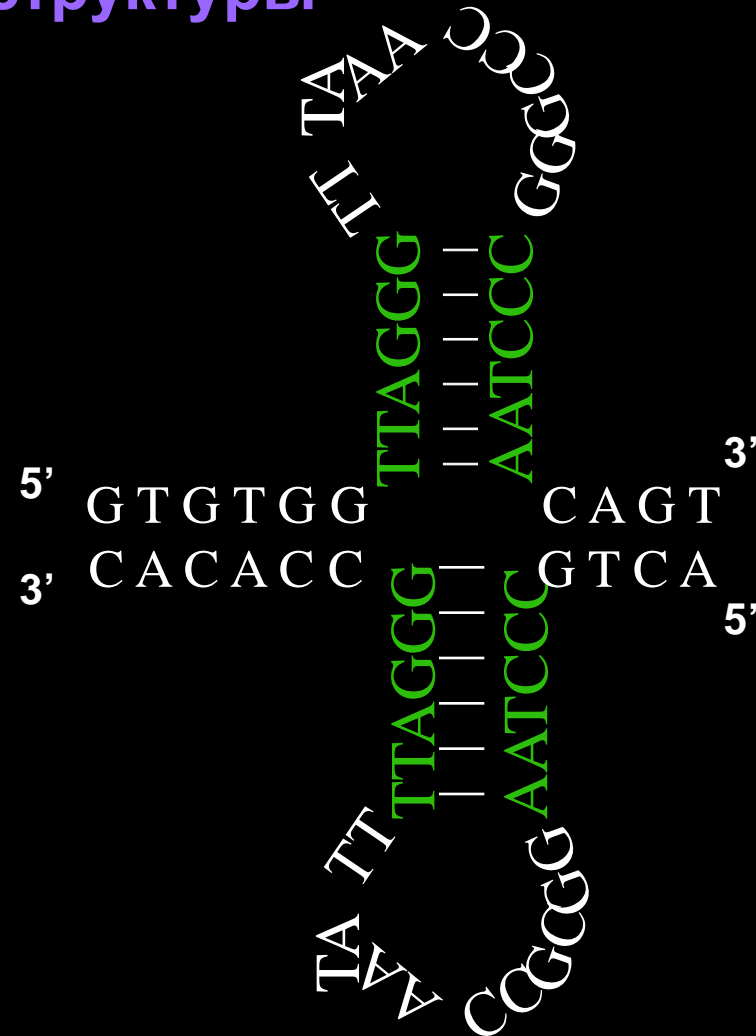
Варианты пространственной структуры



Классический дуплекс (двойная спираль)



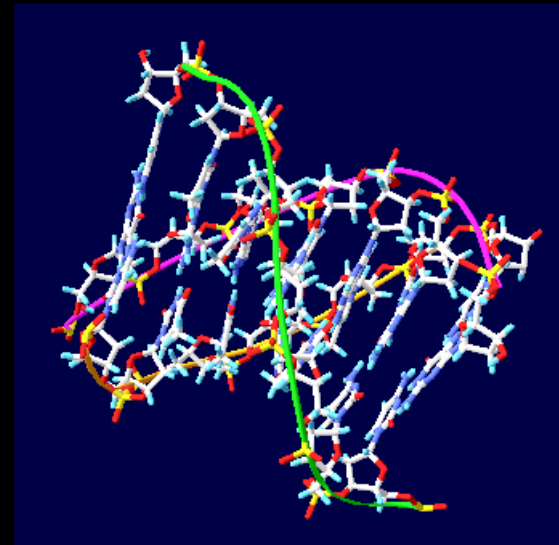
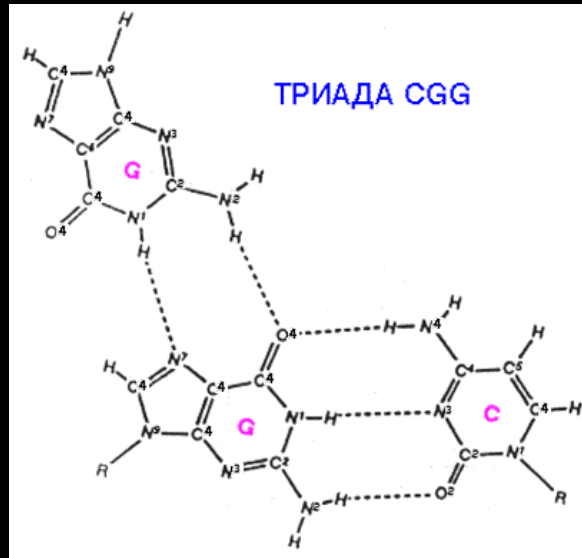
Одноцепочечные ДНК при наличии комплементарных последовательностей образуют «шпильки»



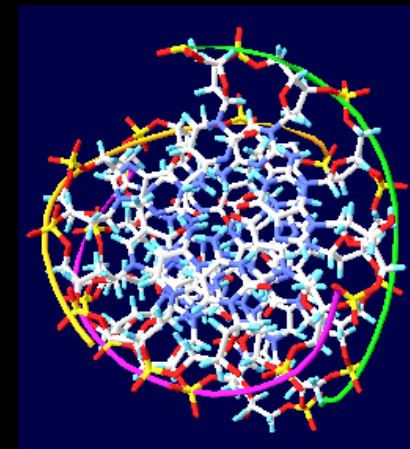
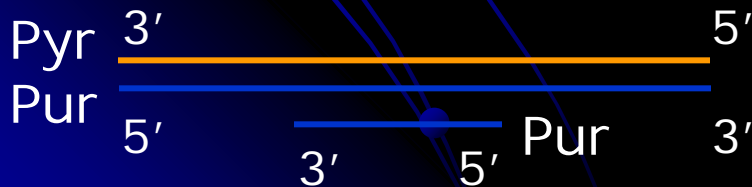
В структуре двуцепочечных ДНК могут возникать «кресты»

Введение: 1.2. Способность к самосборке: неканонические взаимодействия – Отличные от двойной спирали структуры.

Триплексы.

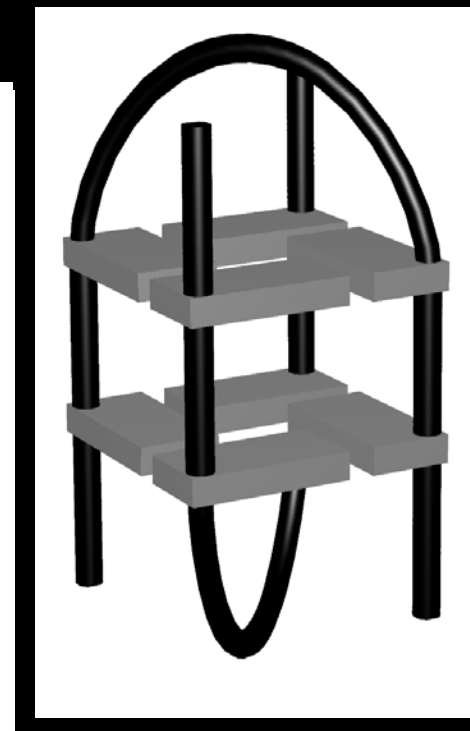
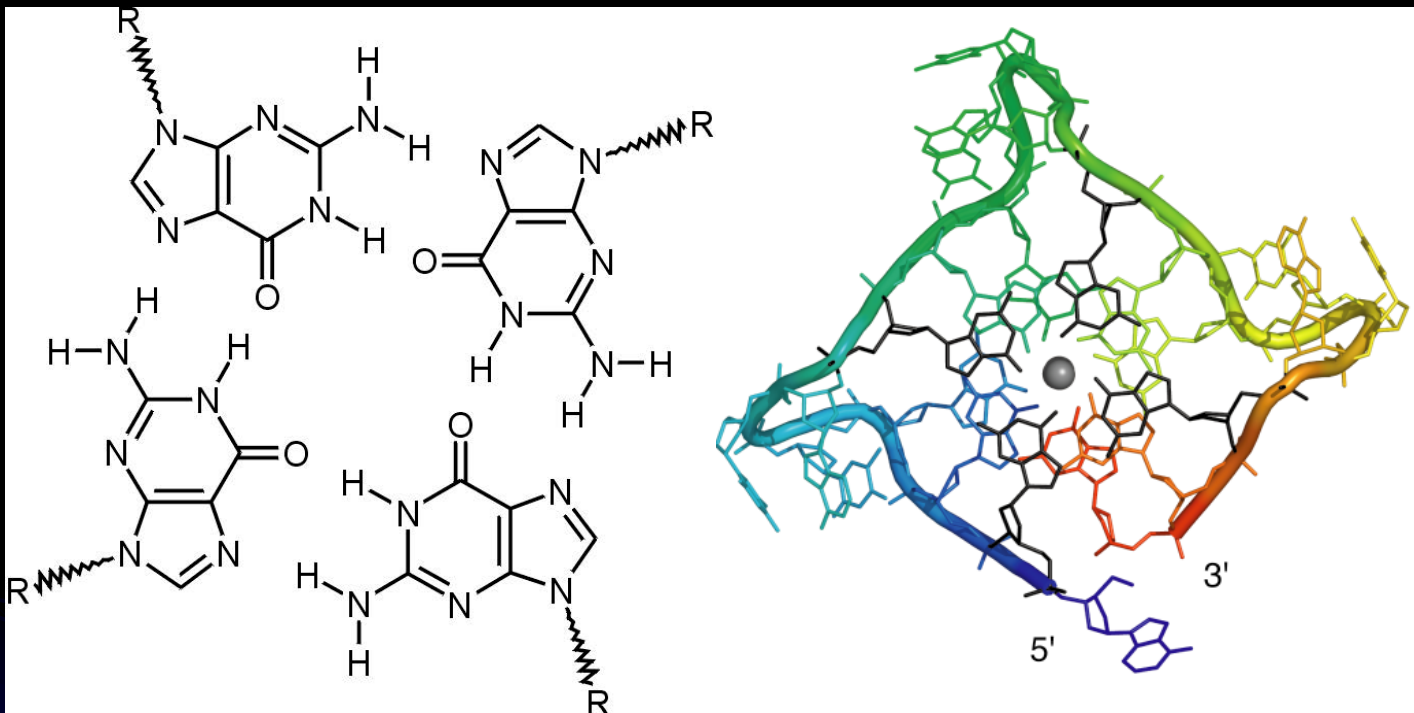


- три цепи
- устойчивы в широком диапазоне pH

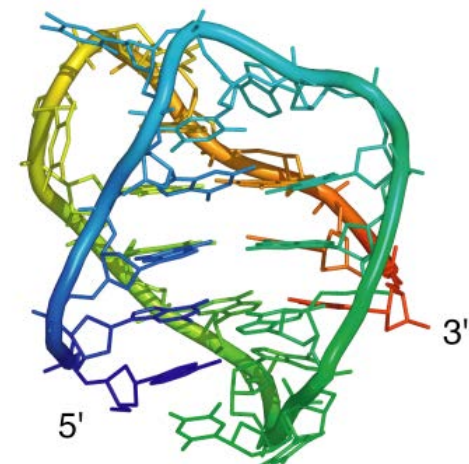


Введение: 1.2. Способность к самосборке: неканонические взаимодействия – Отличные от двойной спирали структуры.

Квадруплексы.



- ✓ Основа квартет- образован четырьмя гуанинами
- ✓ Квартет координируются ионами металлов: K^+ , Na^+
- ✓ Нужно 4-е цепи
- ✓ Очень стабильны, некоторые выдерживают $100\text{ }^{\circ}\text{C}$

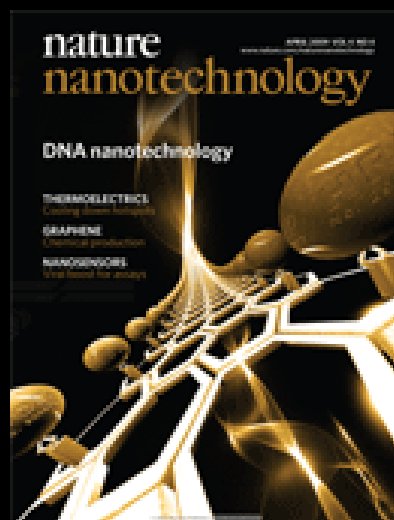


2. ДНК в нанотехнологии



DNA-Based Self-Assembly and Nanorobotics

On Constructing Complex, Fault-Tolerant
Nanostructures And Programmable
Nanorobotic Devices



- ✓ ДНК используется в качестве конструкционного материала для различных целей, а не как носитель генетической информации

Почему?

- Хорошо развит химический синтез и секвенс
- Разработан арсенал методов манипуляции при развитии биотехнологии
- Много информации о свойствах

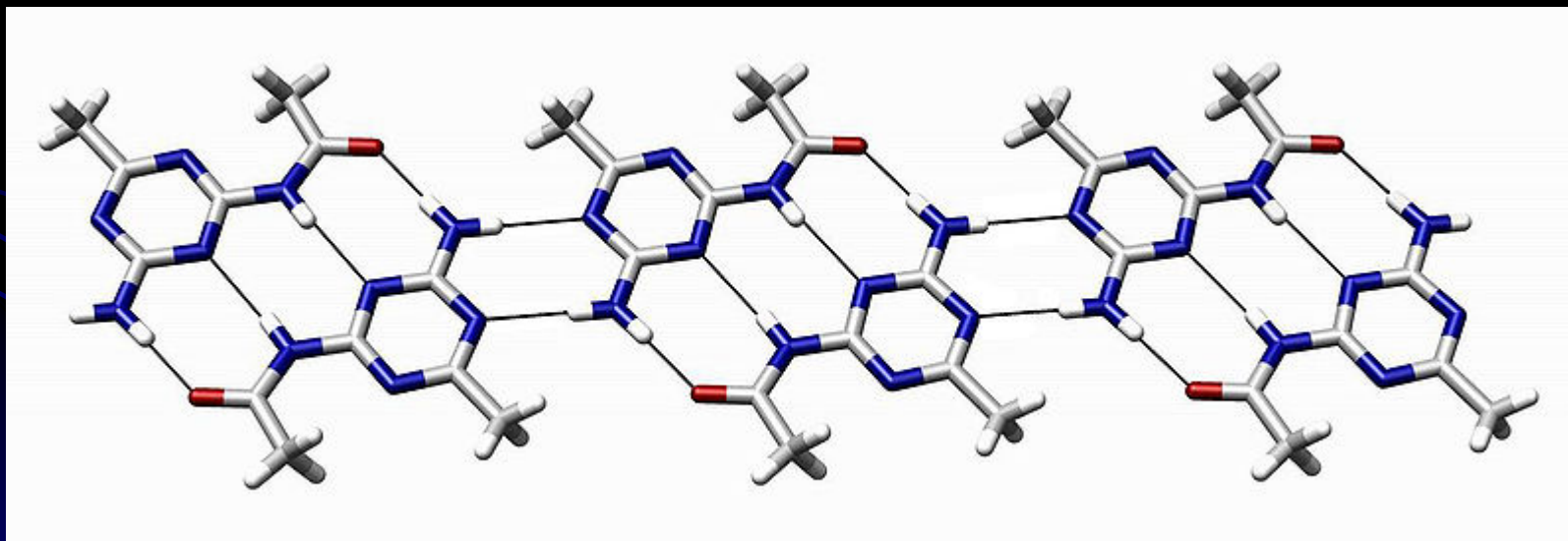
Использование
в живых системах
- биотехнология

Специальный выпуск журнала

Nature, Апрель 2009: <http://www.nature.com/nnano/focus/dna-nanotechnology/index.html>

Какое свойство используется? – Самосборка!

- **Молекулярная самосборка** - это процесс, при котором молекулы принимают определенную пространственную композицию без руководства или управления из внешнего источника.

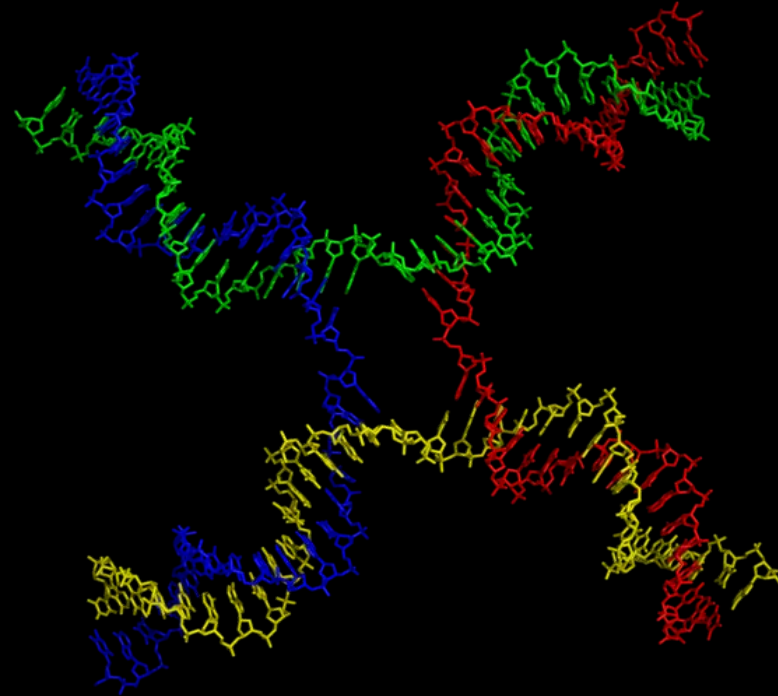
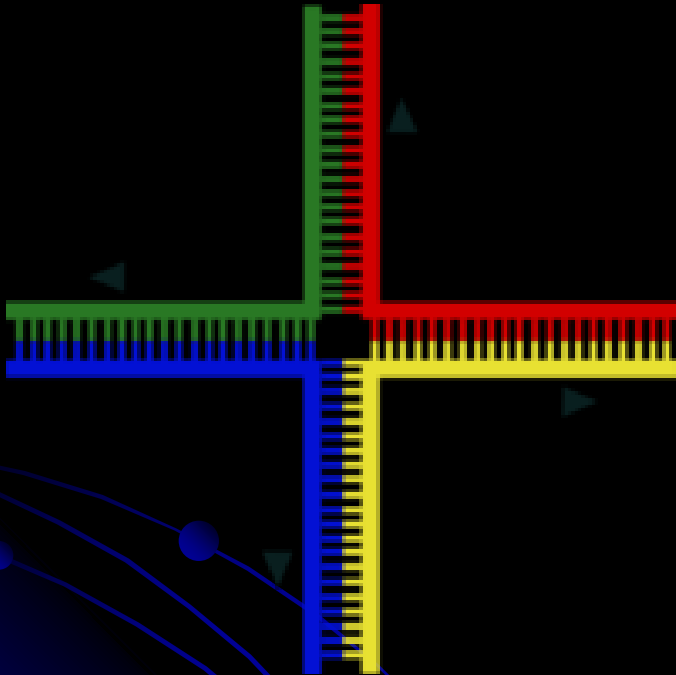


F. H. Beijer, H. Kooijman, A. L. Spek, R. P. Sijbesma & E. W. Meijer
Angewandte Chemie International Edition, 1998 год, том 37, с75-78

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка

- Мотив:**
- Структура Холидея или перекрест – основа блочной сборки, так как дает разветвление

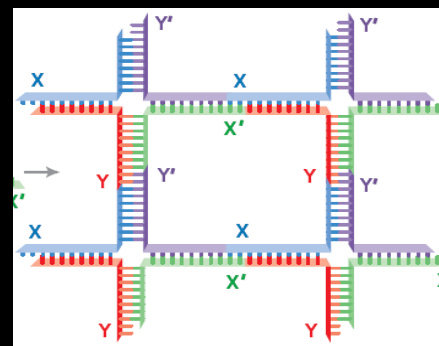
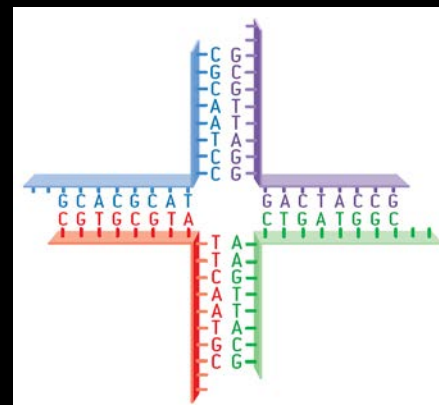
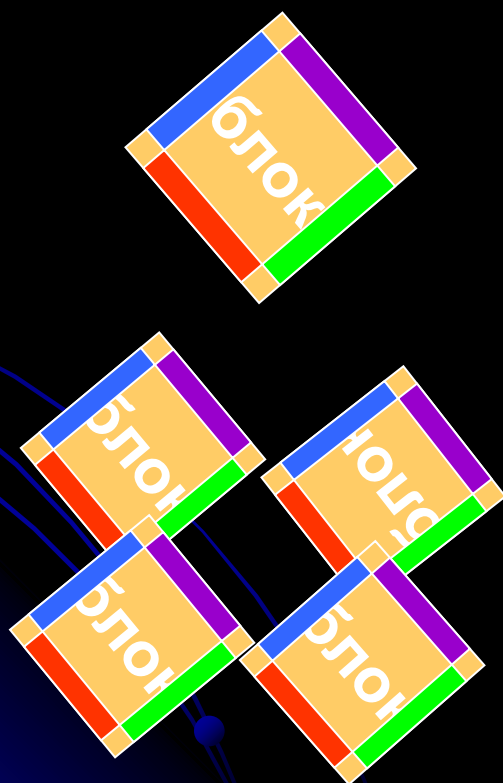
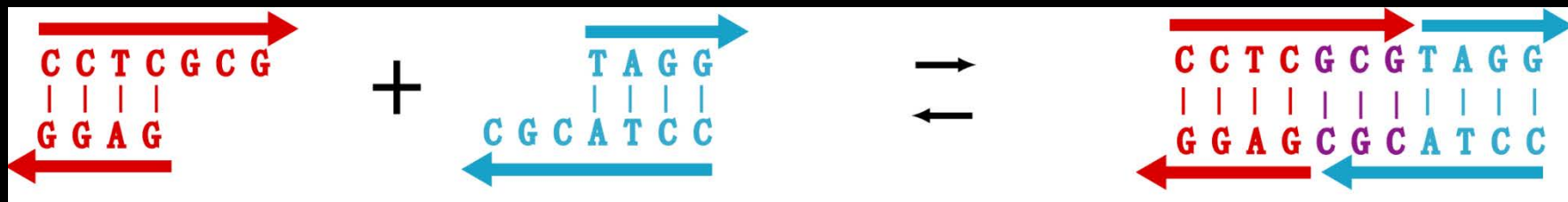


Комбинируя устойчивые разветвленные ДНК-мотивы можно произвести запрограммированные наномеханические машины и фиксированные или модифицированные шаблонные поверхности.

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

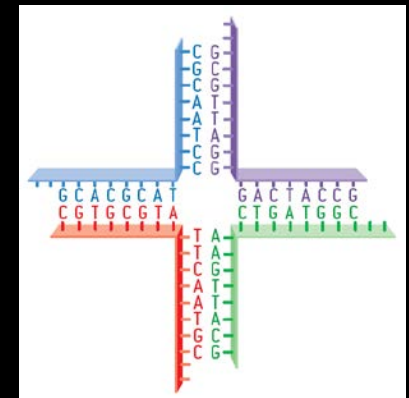
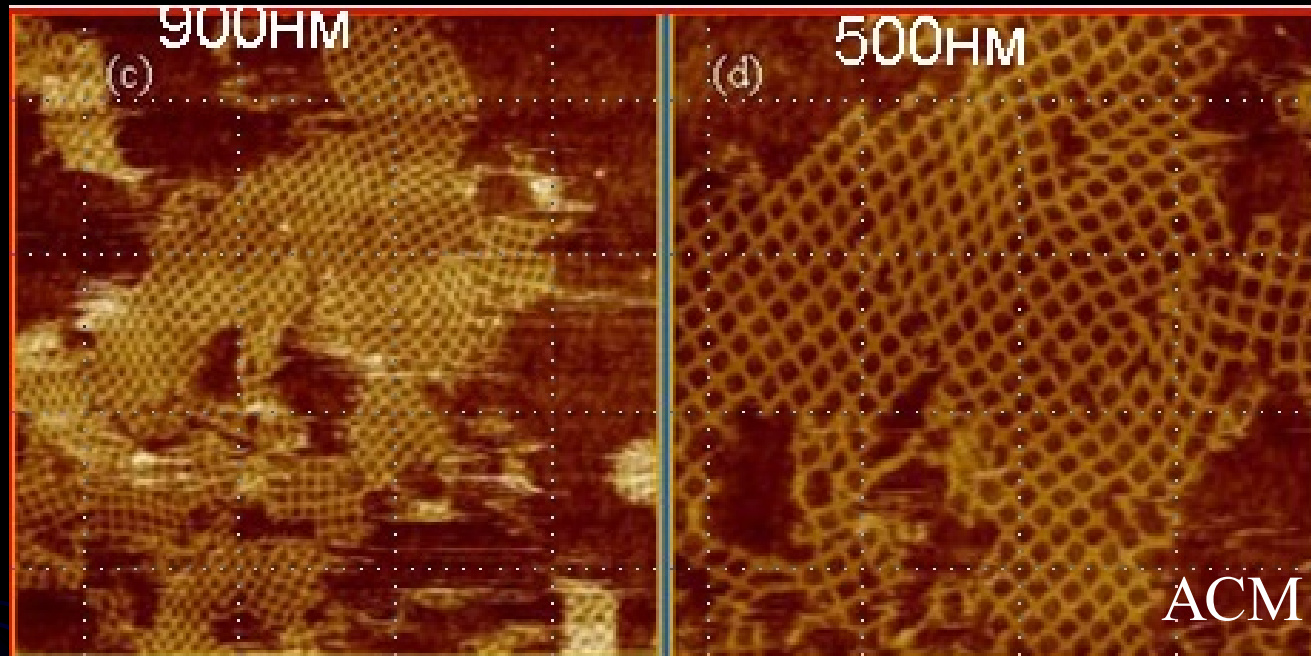
2.1.1. Блочная сборка: Сборка из блоков за счет

взаимодействия выступающих одноцепочечных концов



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка



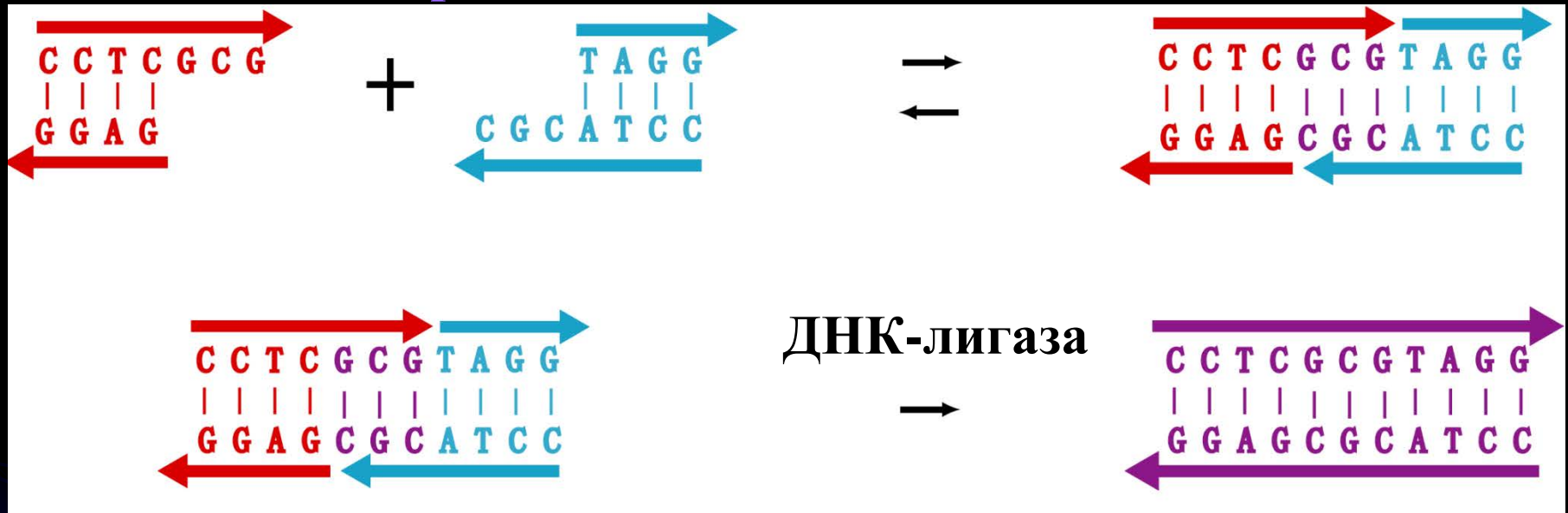
➤ молекулярные сетки разной пористости и форм отверстий (размер поры определяется количеством нуклеотидов в блоке)

Periodic Grid Lattices (Yan et al Nature, 2003)

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка:

Фиксация образованием ковалентной связи

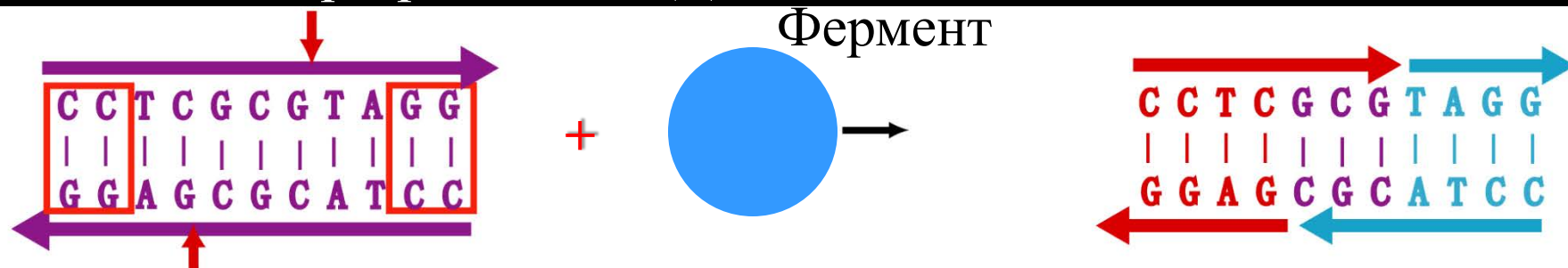


ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка:

Возможность получить новые одноцепочечные концы:

Эндонуклеазы рестрикции – ферменты, узнающие определенную последовательность и вносящие разрыв в цепь ДНК

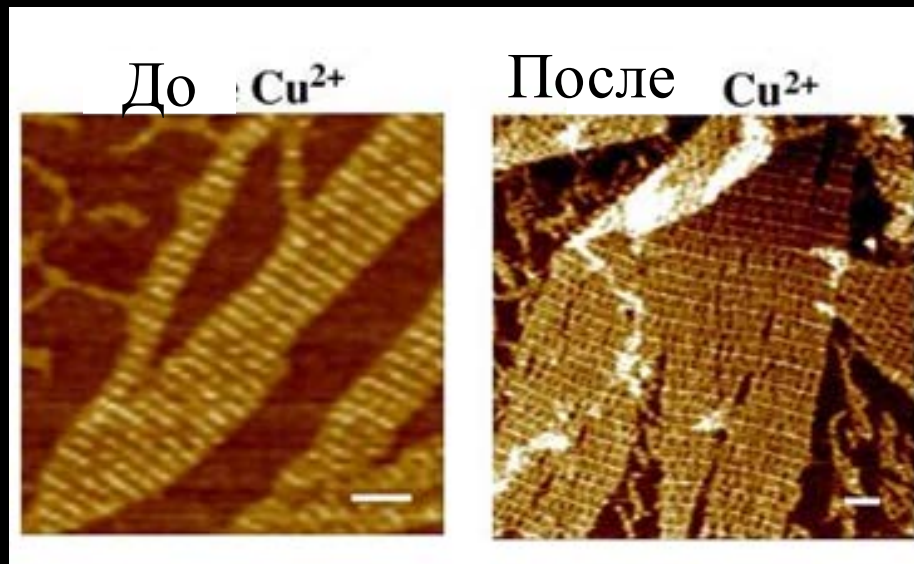
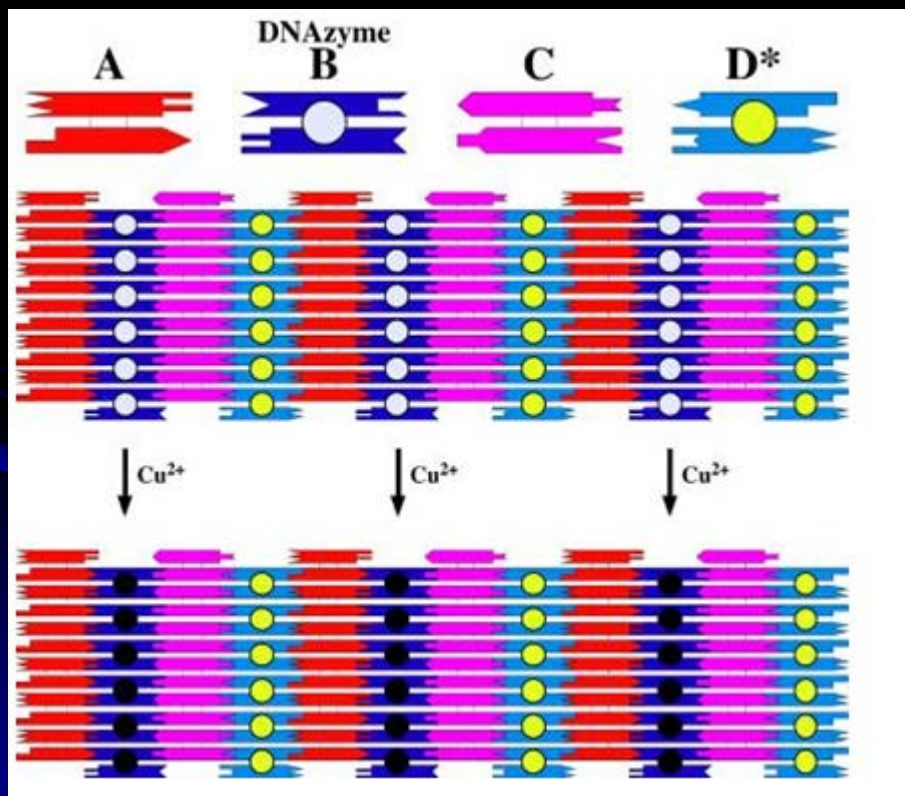


Рибозимы или дезоксирибозимы (DNAzyme) – НК с особой структурой, которые в присутствии кофакторов вносят разрыв в цепь НК в строго определенном и заданном месте

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

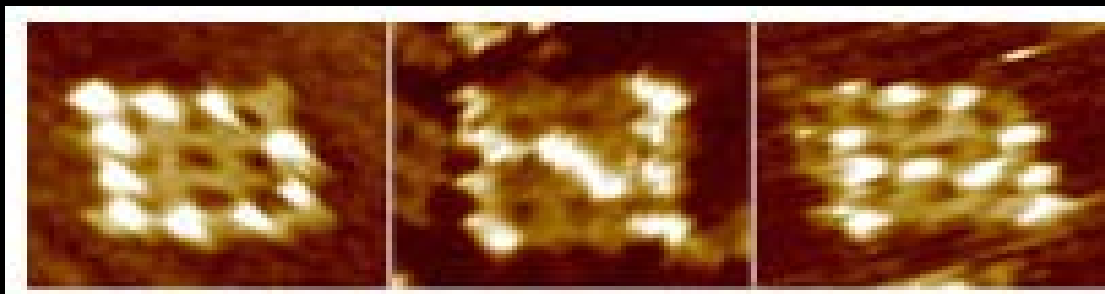
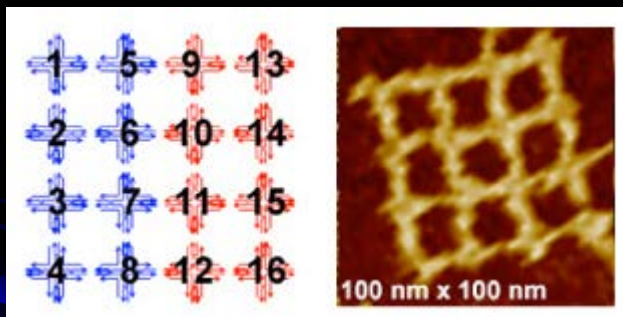
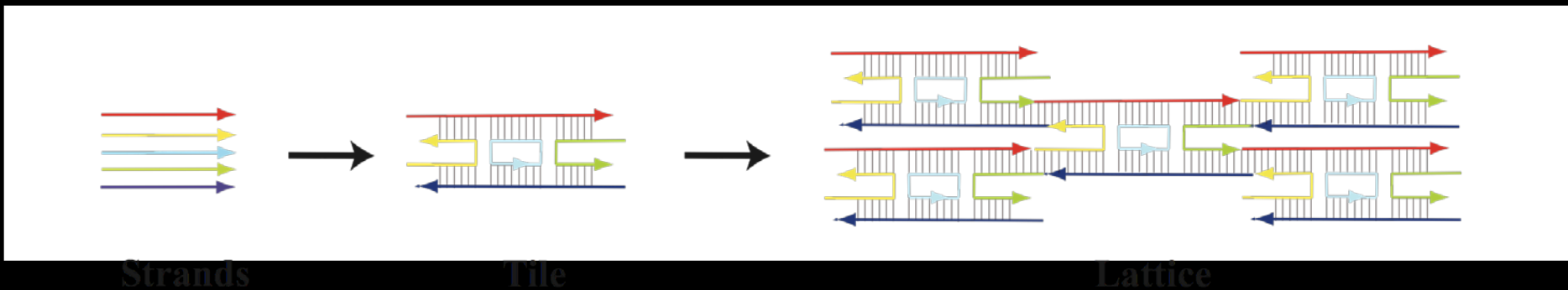
2.1.1. Блочная сборка.

Возможность получить новые одноцепочечные концы и изменить структуру.



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка. Усиление блоков: дополнительные дуплексы



ACM

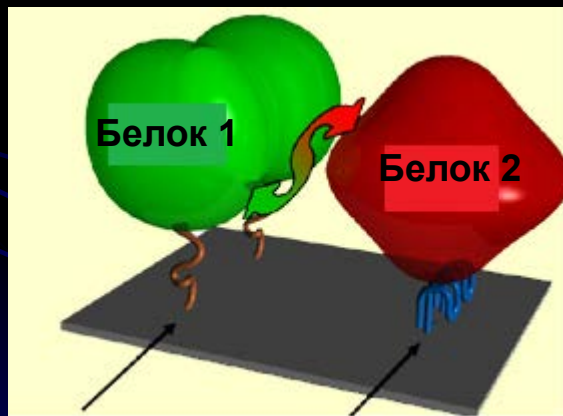
Park et al: Angewandte Chemie , 2006

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

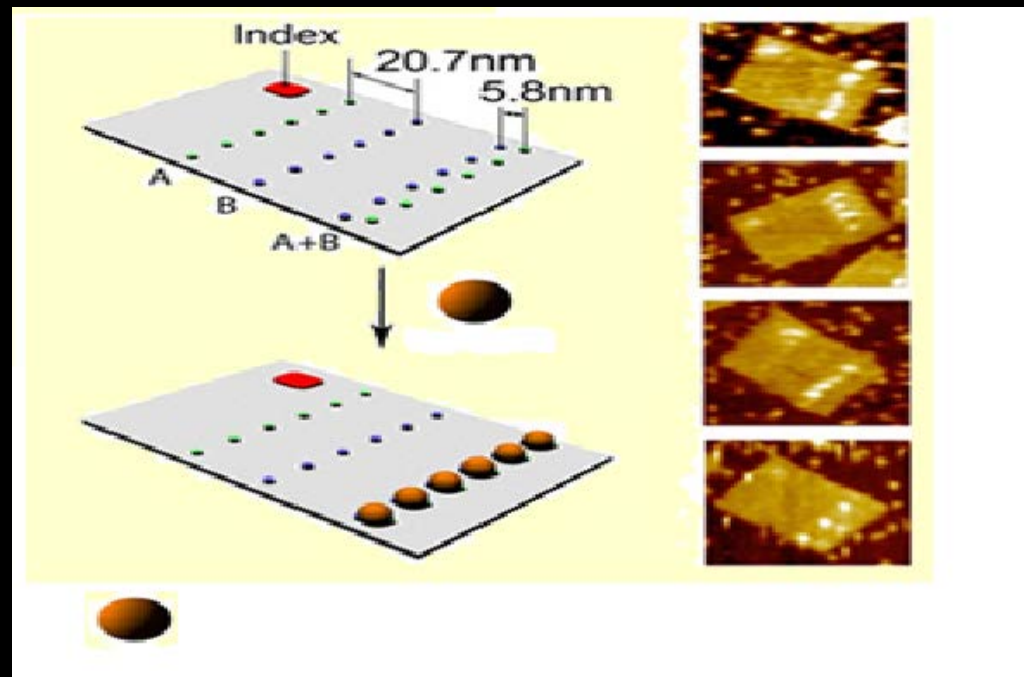
2.1.2. Применение ДНК-поверхности : подложка для сборки комплексов.

➤Применение:

позволяют изучать пространственно-зависимые взаимодействия между различными биомолекулами и лигандами

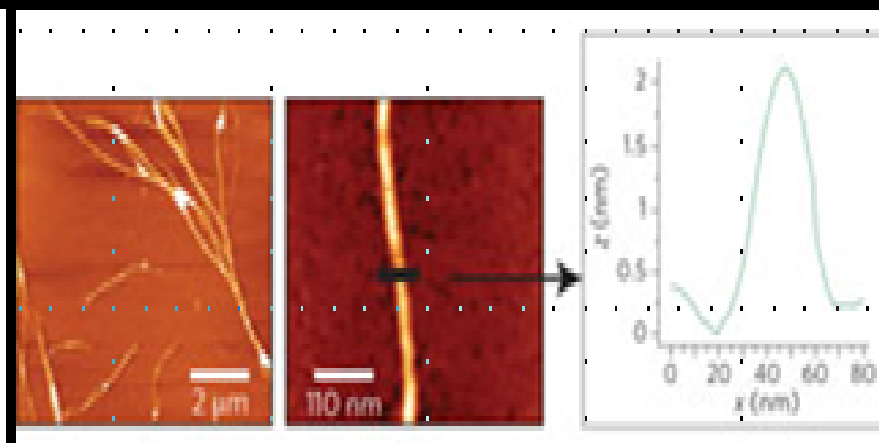
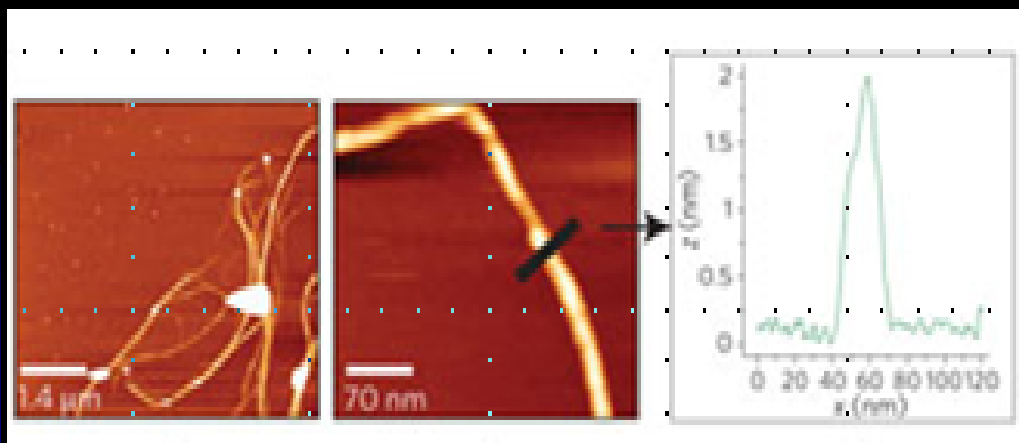
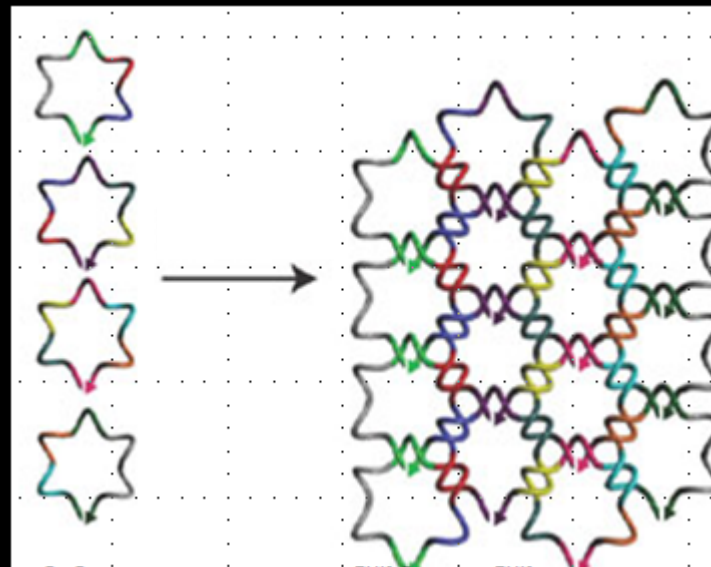
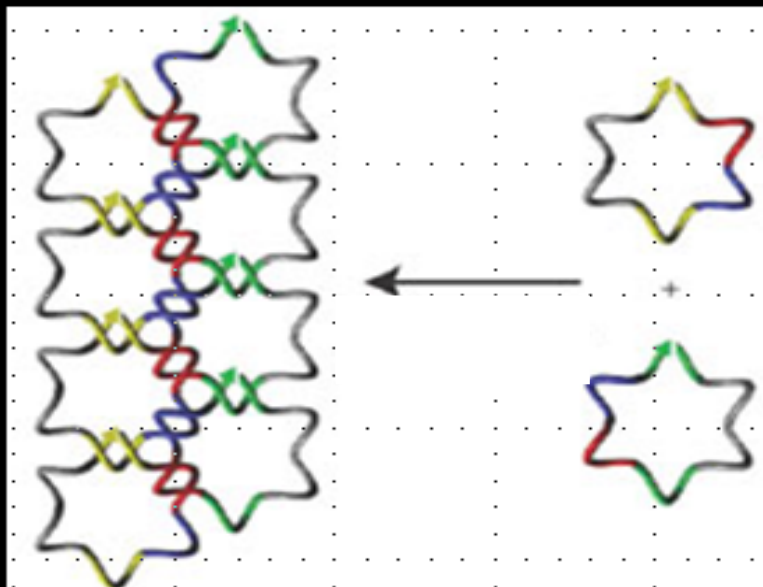


ДНК-адапторы



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

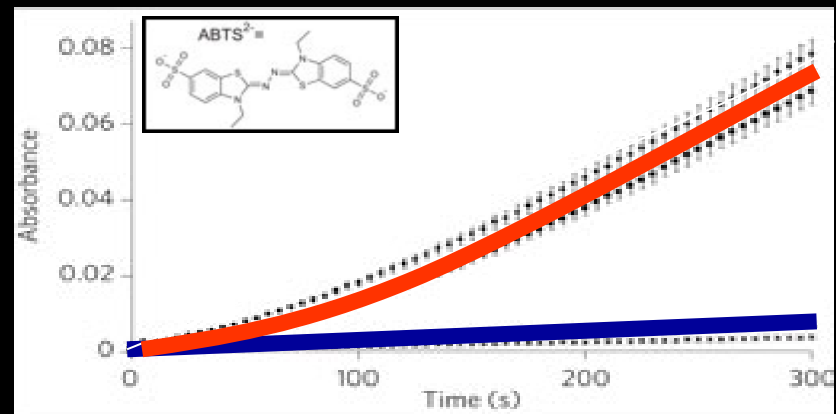
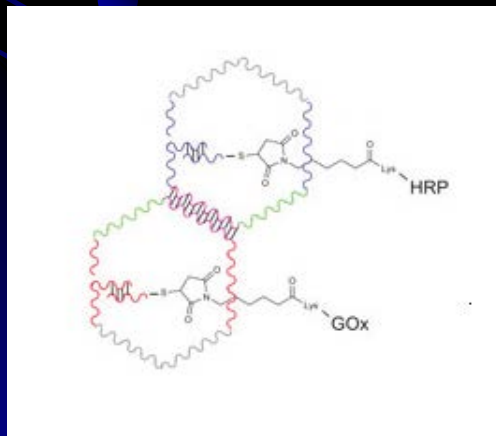
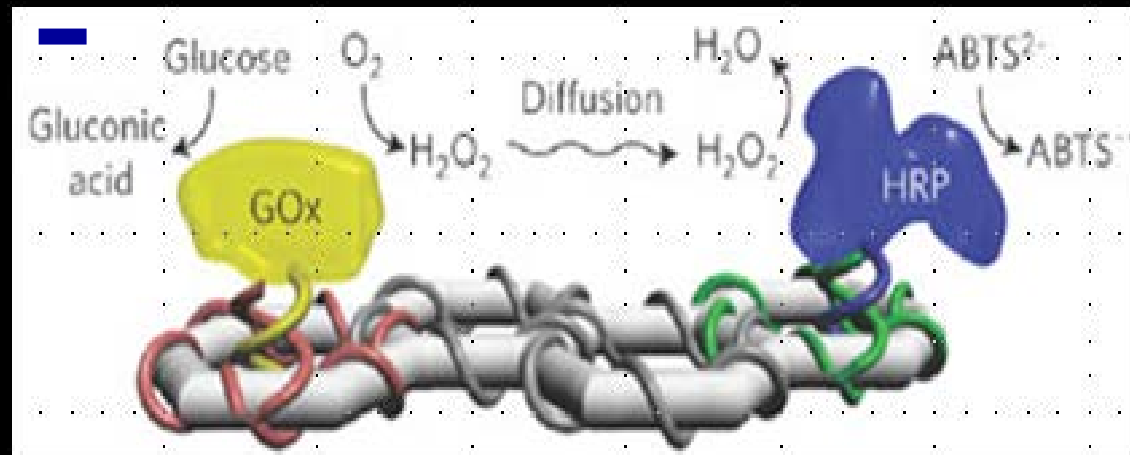
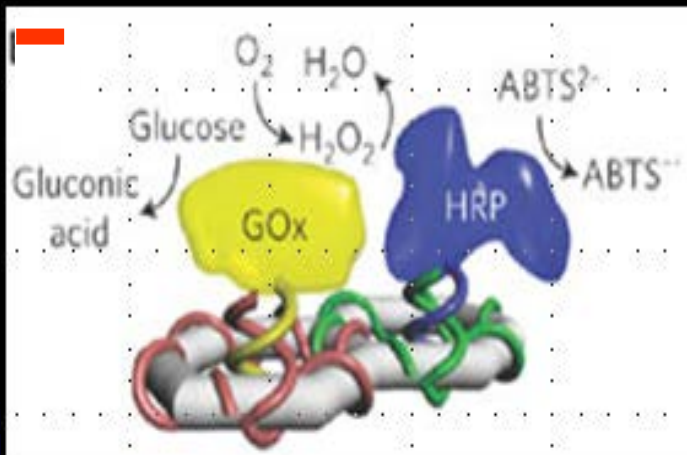
2.1.1. Блочная сборка поверхности: гексагональная основа



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.2. Применение ДНК-поверхности : подложка для сборки комплексов.

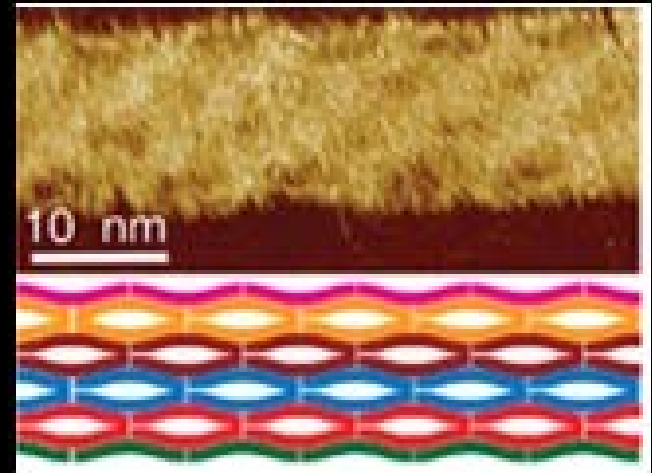
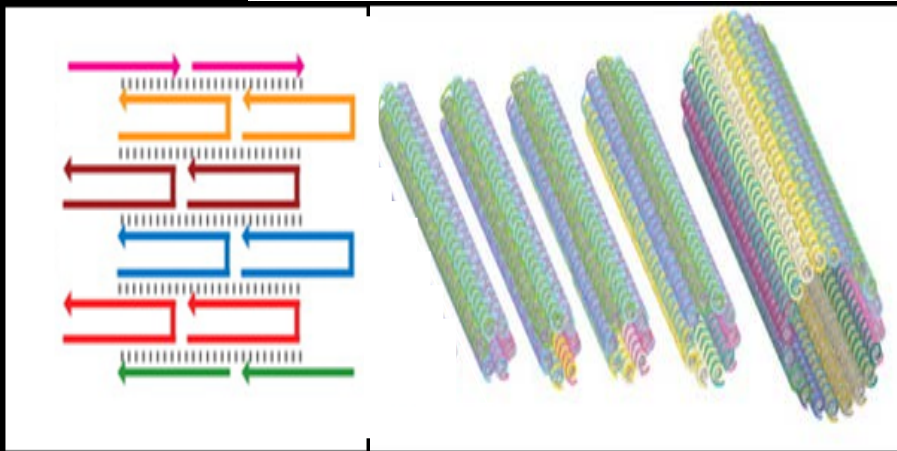
➤ **Применение: для самоорганизации сложных каскадов мультиферментов, катализирующих последовательные превращения веществ**



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка

Днк-нанотрубки



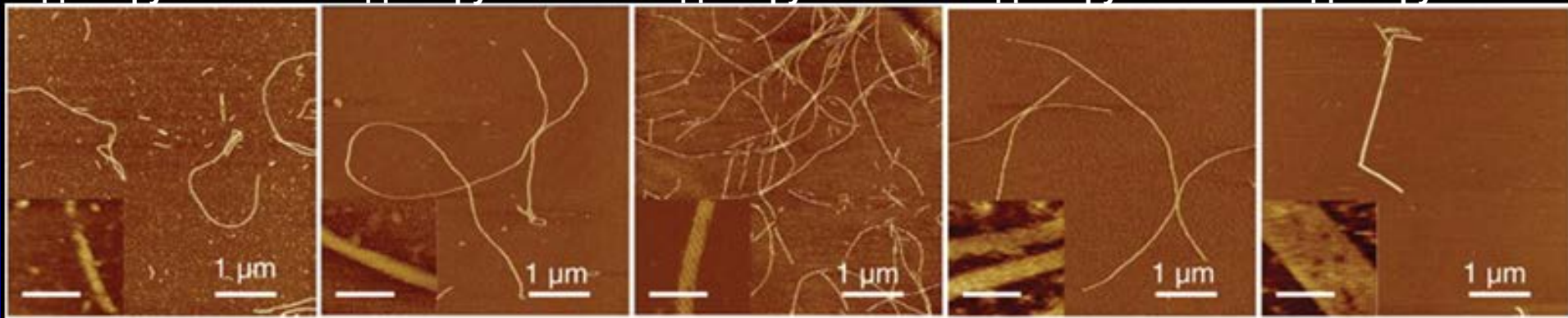
3-х спиральная
ДНК-трубка

4-х спиральная
ДНК-трубка

5-и спиральная
ДНК-трубка

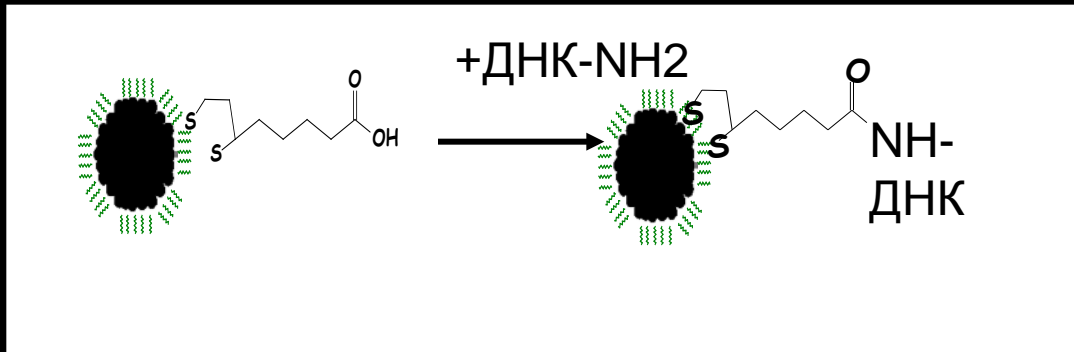
6-и спиральная
ДНК-трубка

20-и спиральная
ДНК-трубка



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Конъюгация с наночастицами металлов.



✓ химические методы
Разработаны

✓ Можно выделить частицы с определенным количеством коротких последовательностей ДНК (олигонуклеотидов)

Пример
Разделения методом
Электрофореза в агарозном геле:

Наночастицы
золота 2нм

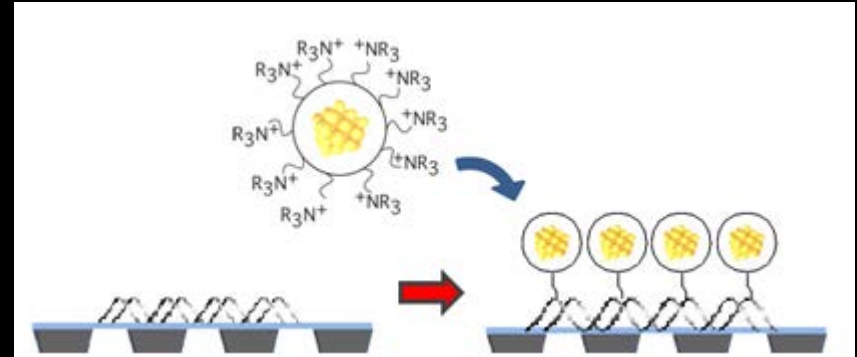
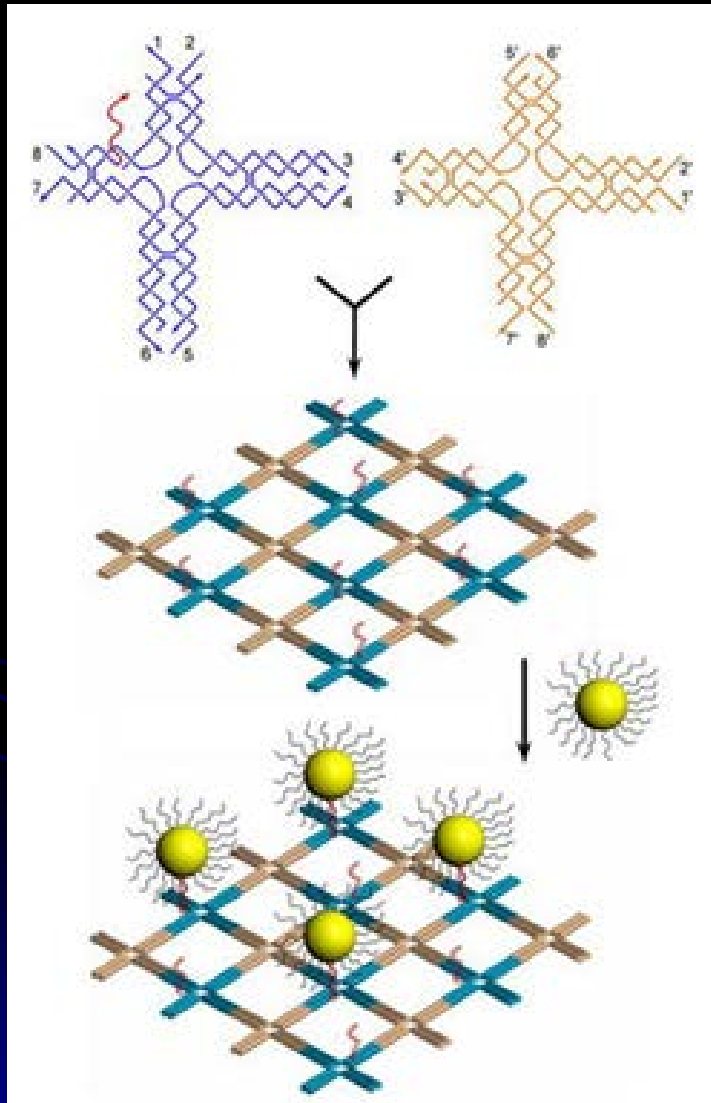


Наночастицы
золота 2нм и

+ 4 олигонуклеотида
+ 3 олигонуклеотида
контроль + 2 олигонуклеотида
+ 1 олигонуклеотид

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Блочная сборка: создание сеток из наночастиц металлов

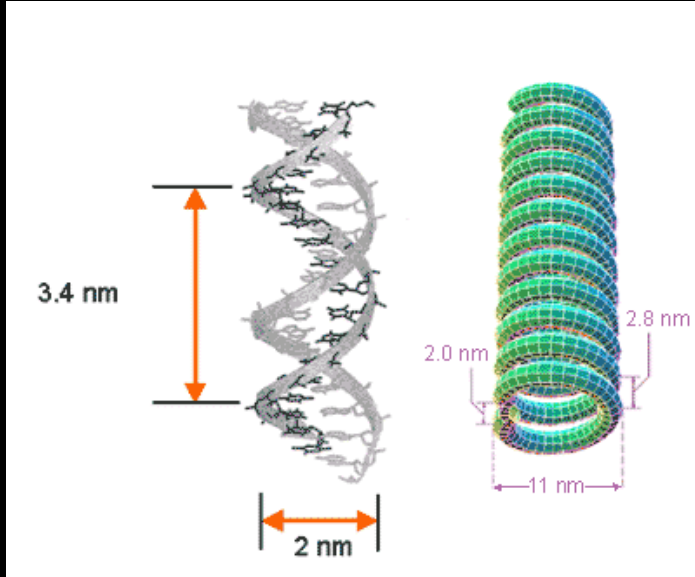


В Duke University выпускают grids с порами в 6 микрон для структурных исследований, полученные таким способом.

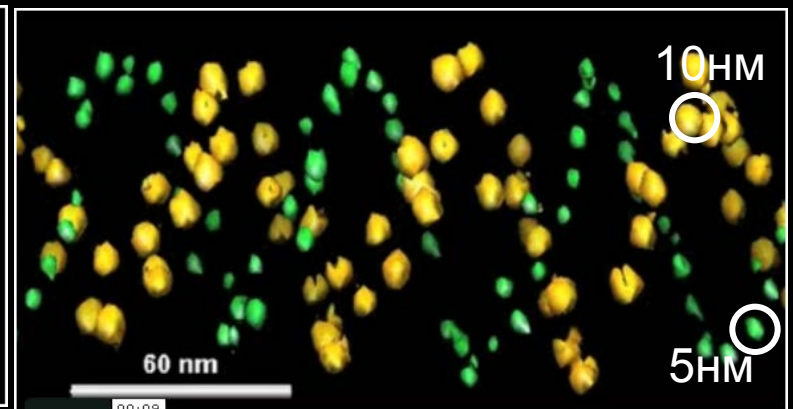
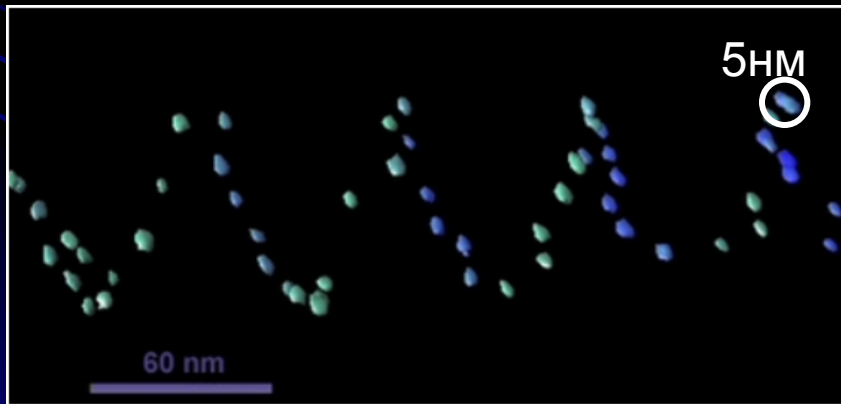
ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Конъюгация с наночастицами.

Создание любых структур из наночастиц металлов



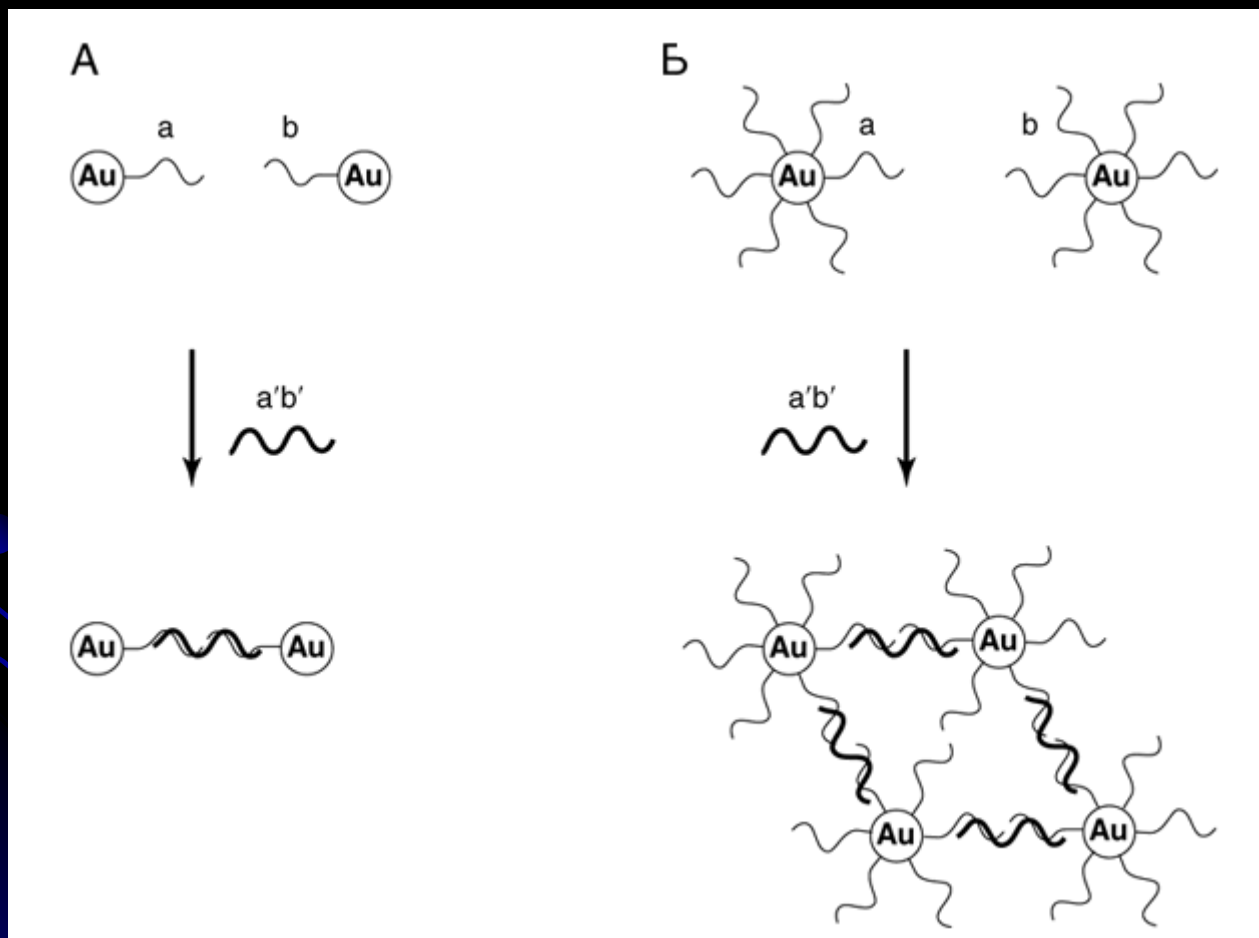
➤ ДНК-сборка позволяет поместить дискретное число наночастиц в 2-х и 3-х мерном пространстве с точностью миллимикрона



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Конъюгация с наночастицами.

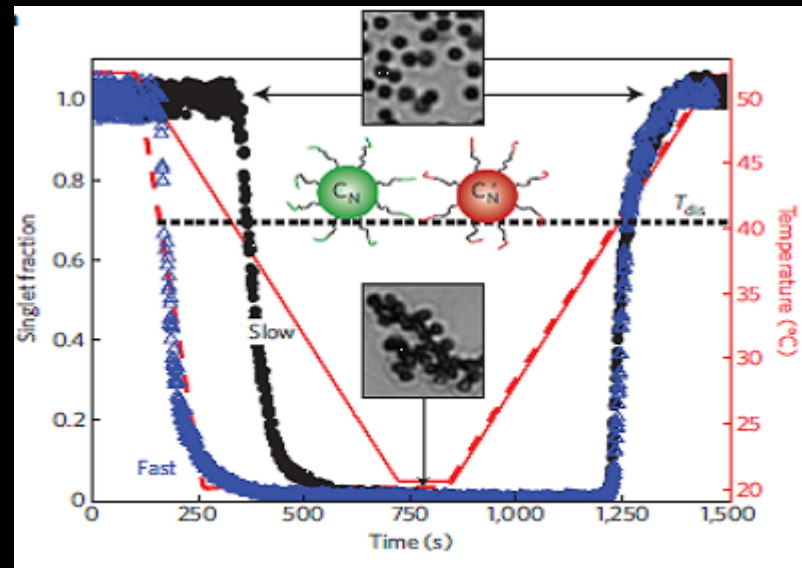
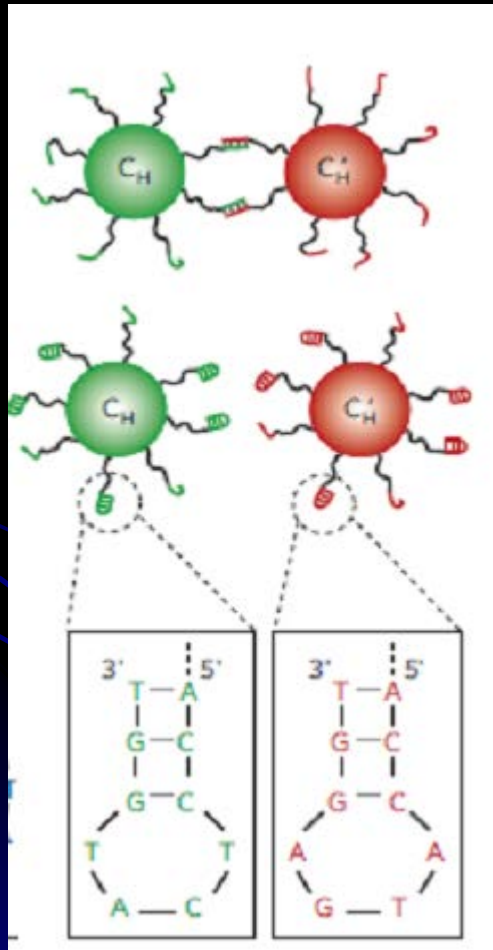
Создание сеток из наночастиц металлов



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Конъюгация с наночастицами.

Защищенные ДНК-структуры в коллоидных частицах



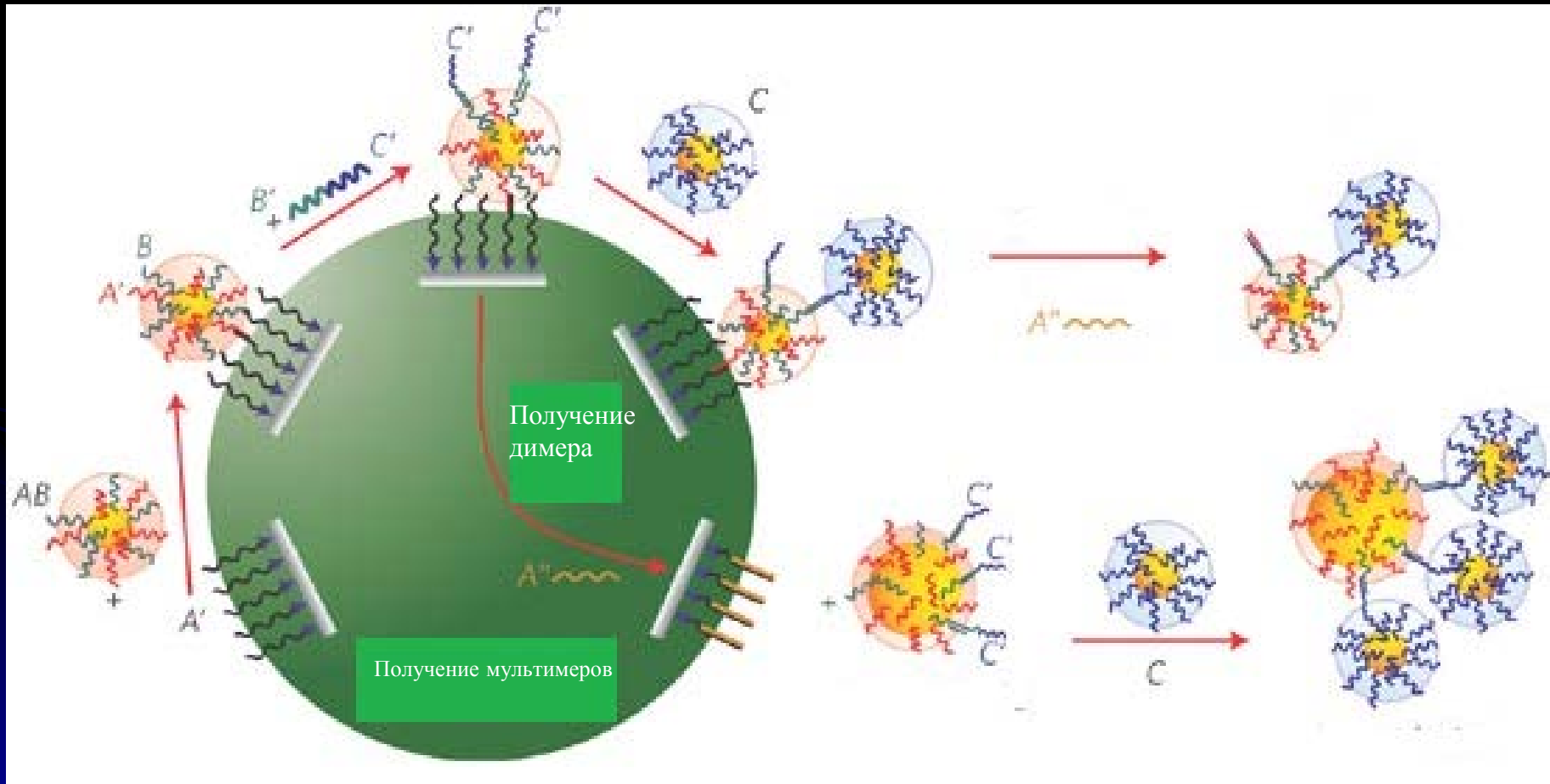
✓ ДНК-шпильки препятствуют агрегации

Nature Materials 8, 590 - 595 (2009)

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. Конъюгация с наночастицами.

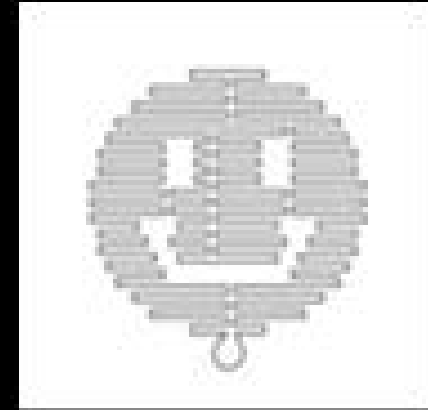
ДНК обеспечивает контроль сборки наночастиц



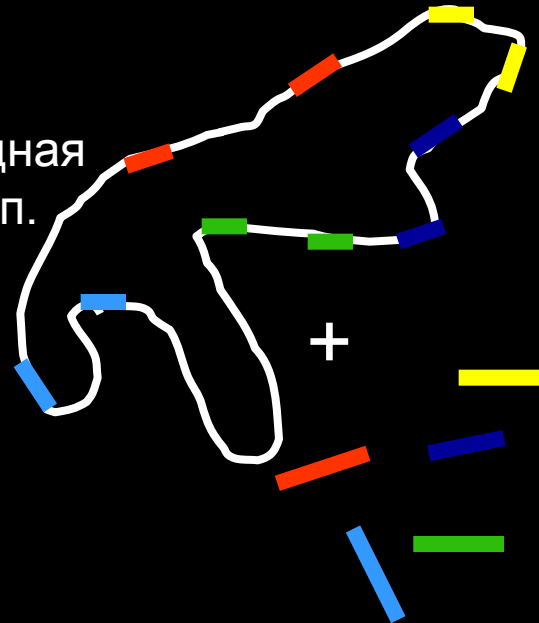
ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.2. ДНК-оригами (альтернатива блокам)

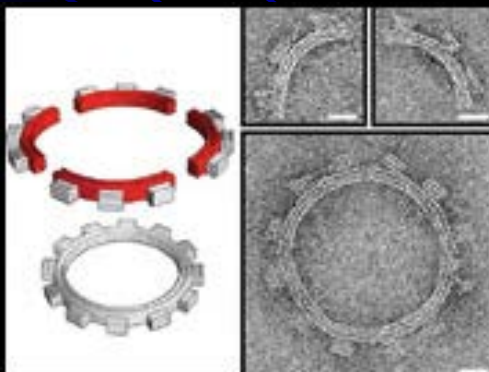
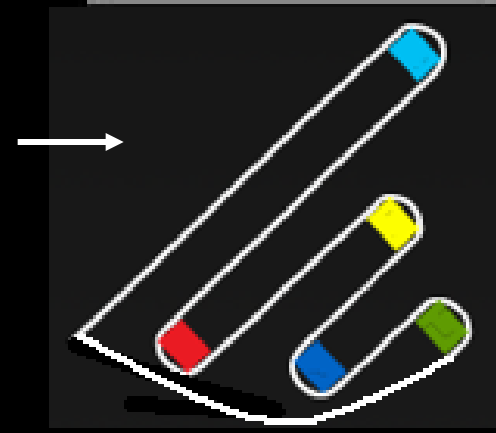
Nature 440: 297–302, (2006), Rothemund и др.



Природная
одноцеп.
ДНК



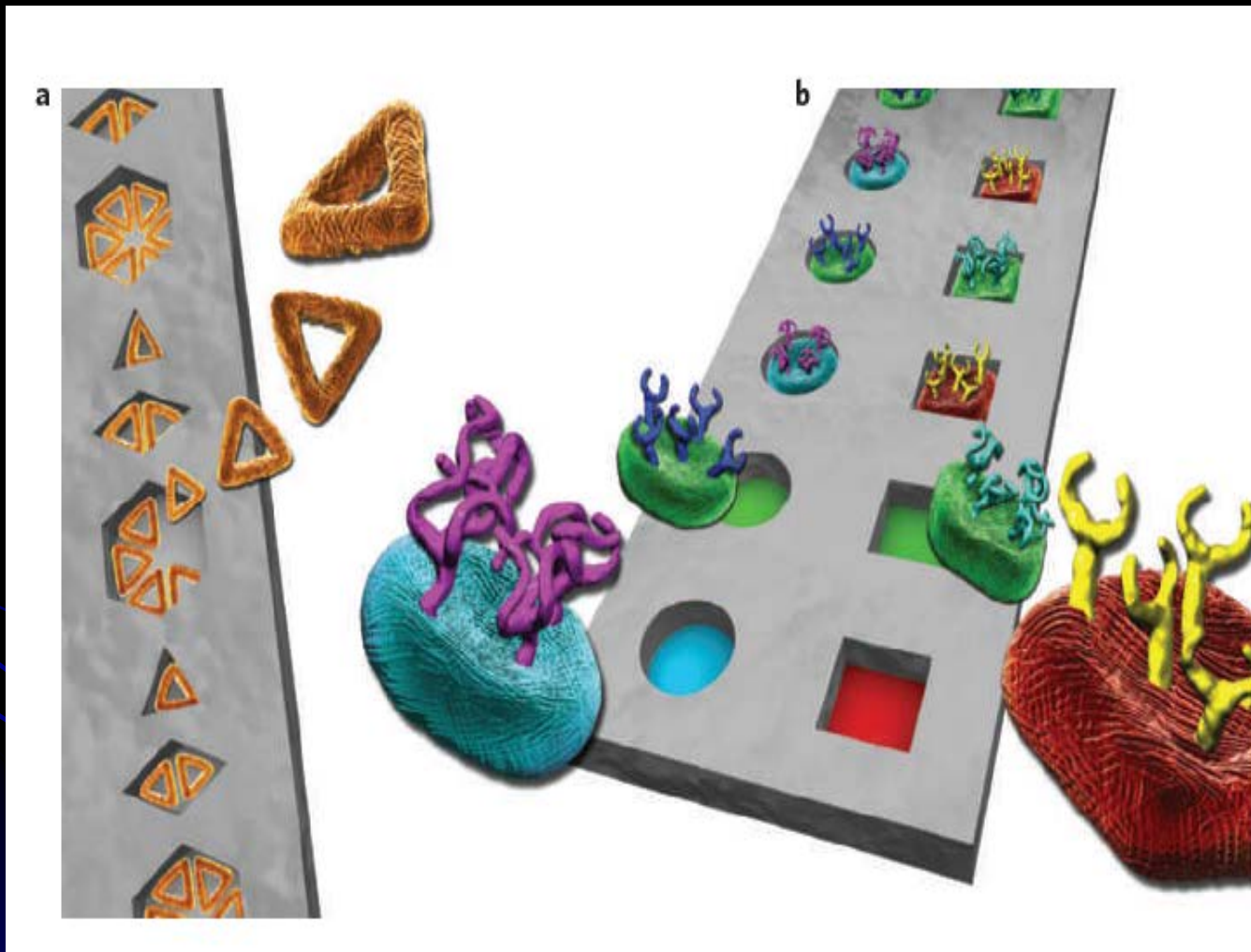
Синтетические
короткие
ДНК (скрепки)



Science 325, 725–730 (2009), Shih и др.

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.2. ДНК-оригами (альтернатива блокам). Основа для литографии или использование совместно с поверхностями для сортировки

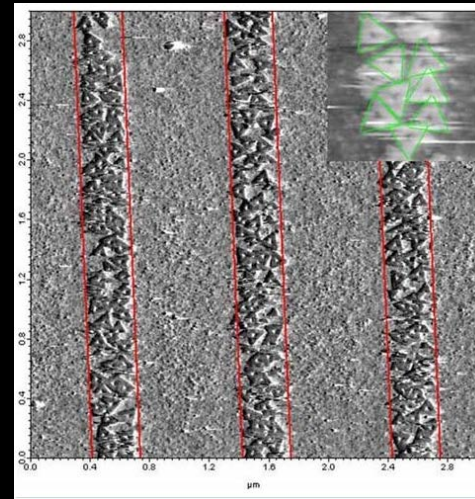
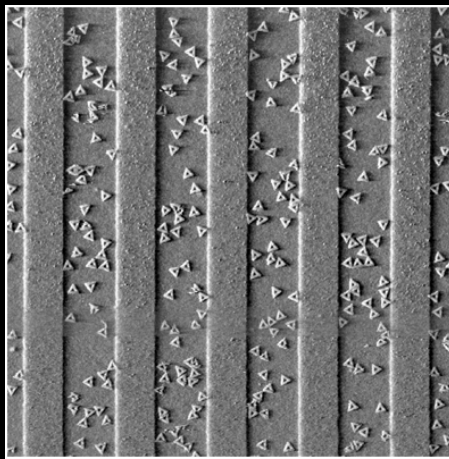


Nature Nanotechnology 4, 543 - 544 (2009) Graiger u др
Nature Nanotechnology 4, 557 - 561 (2009), Wallraff u др.

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. ДНК-оригами. Основа для литографии.

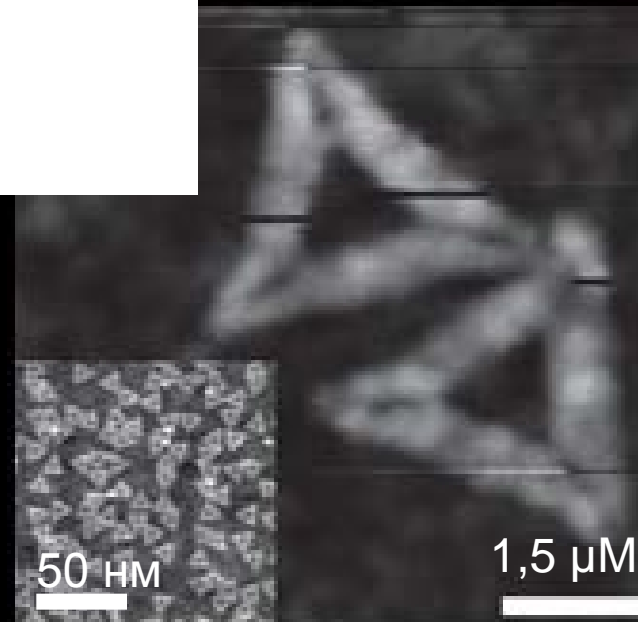
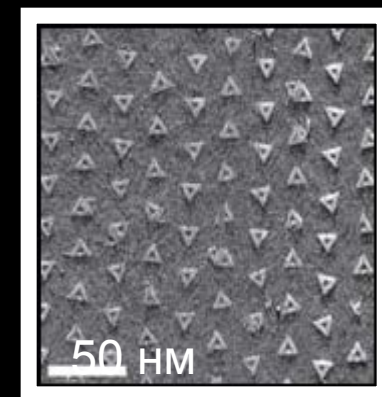
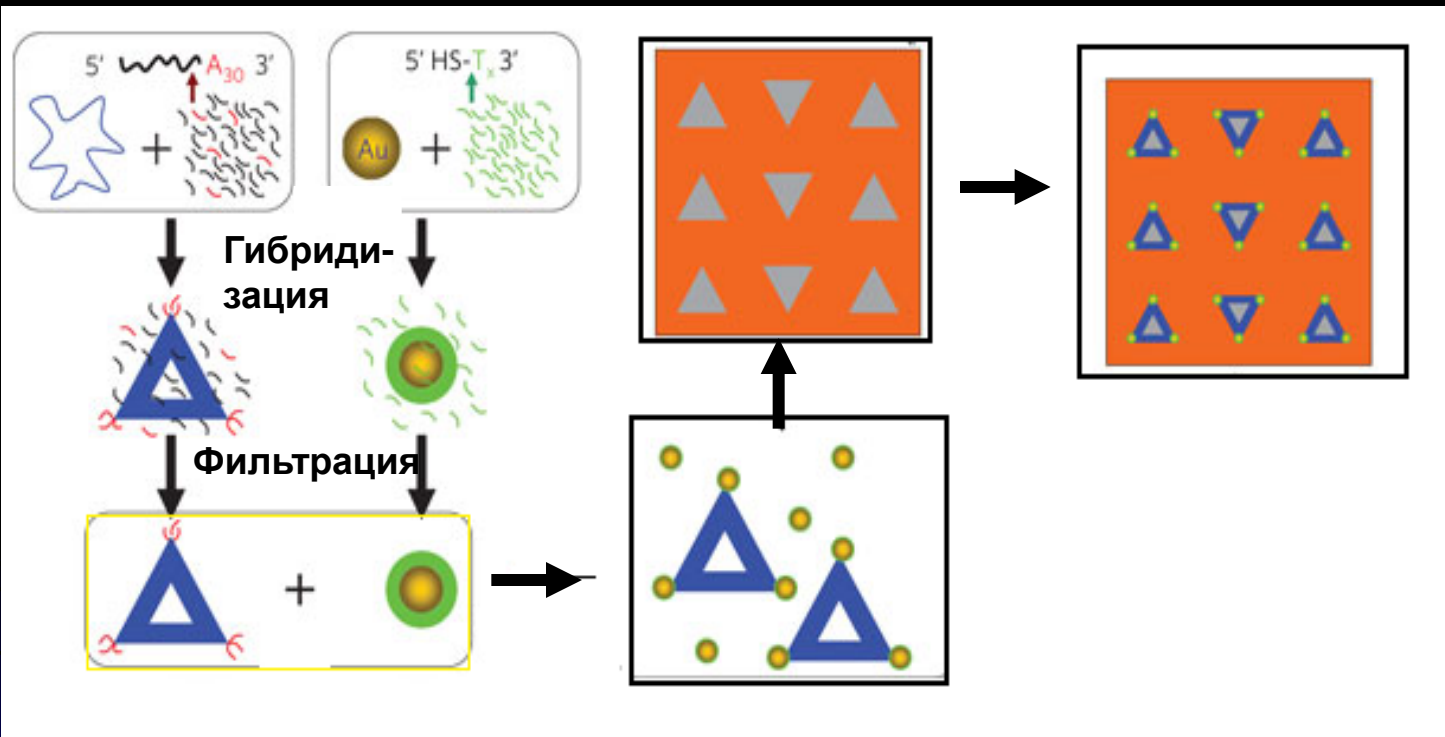
➤ Применение: ДНК-оригами (6нм) + литография (25нм) = метод создания чипов



Пресс-релиз компании IBM от августа, 2009:
<http://www-03.ibm.com/press/us/en/pressrelease/28185.wss>

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

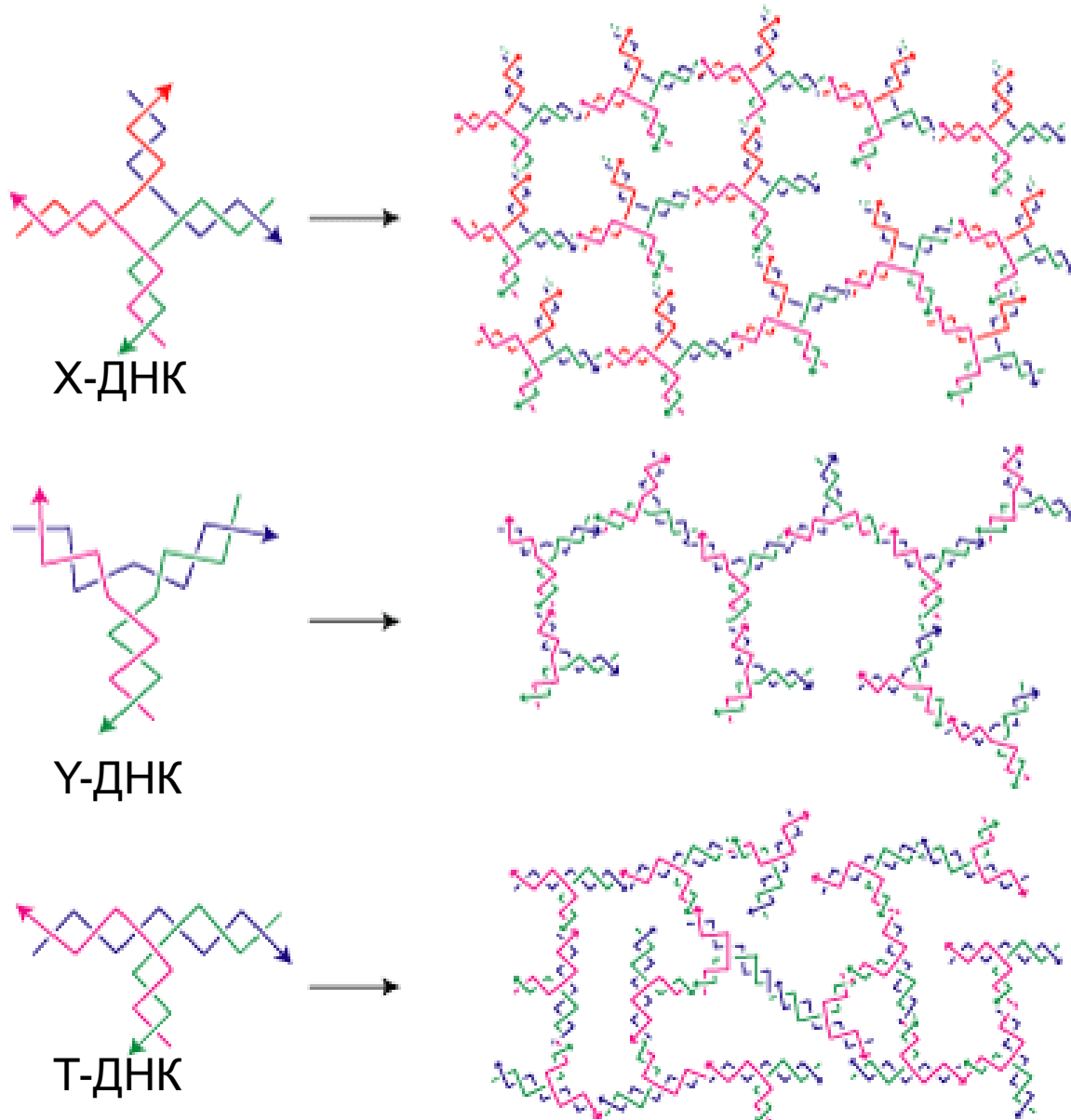
2.1.1. ДНК-оригами использовано совместно с поверхностью для сортировки



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

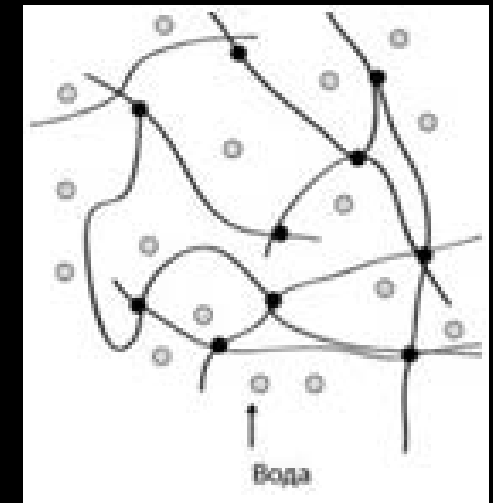
2.1.3. трехмерные материалы.

Гидрогели



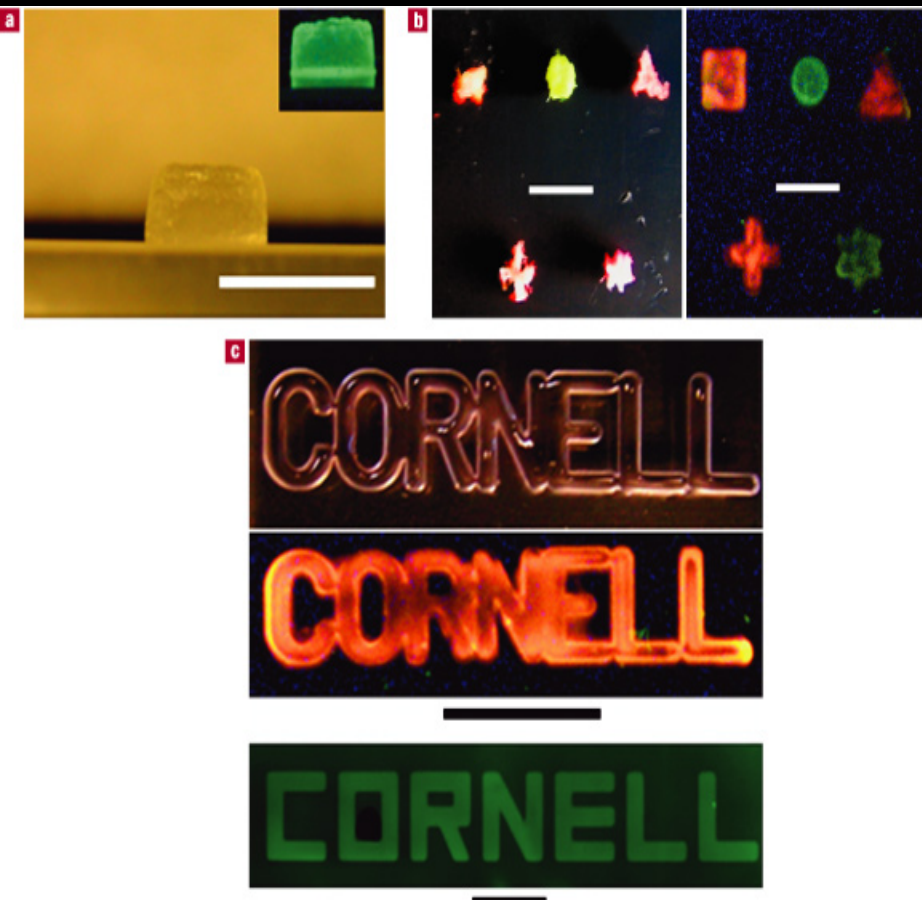
- ✓нет выступающих концов
- ✓все концы совместимы
- ✓обработка ДНК-лигазой

Итог: гидрогели



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. трехмерные материалы - гидрогели



✓ Контролируемый размер пор

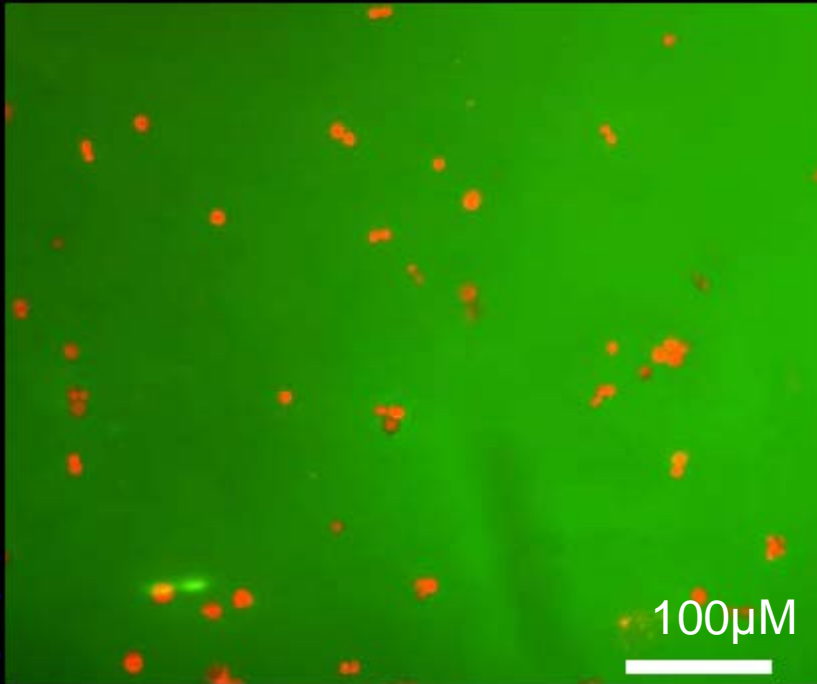
✓ Биodeградируемость

✓ Различная скорость биodeградации в зависимости от структуры

➤ Применение:
Контейнеры для лекарств

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. трехмерные материалы - гидрогели



CHO клетки (красный) и интеркалирующий в ДНК краситель (SYBR) (зеленый)

✓Биосовместимость

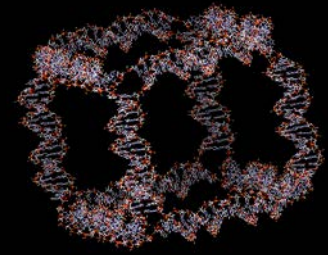
✓включение клеток животных и их культивирование

➤Применение: трехмерное культивирование клеток для тканевой инженерии и клеточной терапии

Nature Materials 5, 797 - 801 (2006), Dan Luo и др.

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК
2.1.1. трехмерные материалы

Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes
Science, 325:725–730, 7 (2009) Shih u др.



(Chen and Seeman, 91)



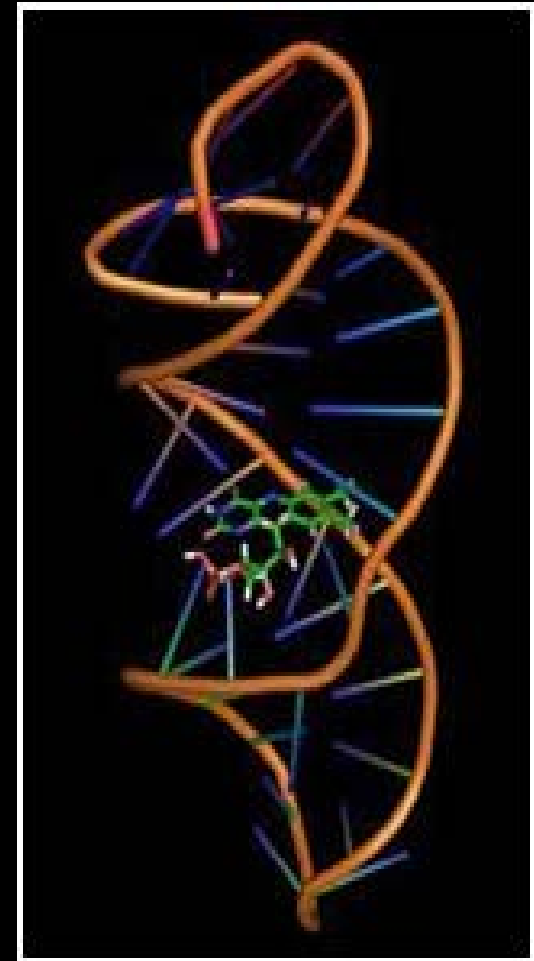
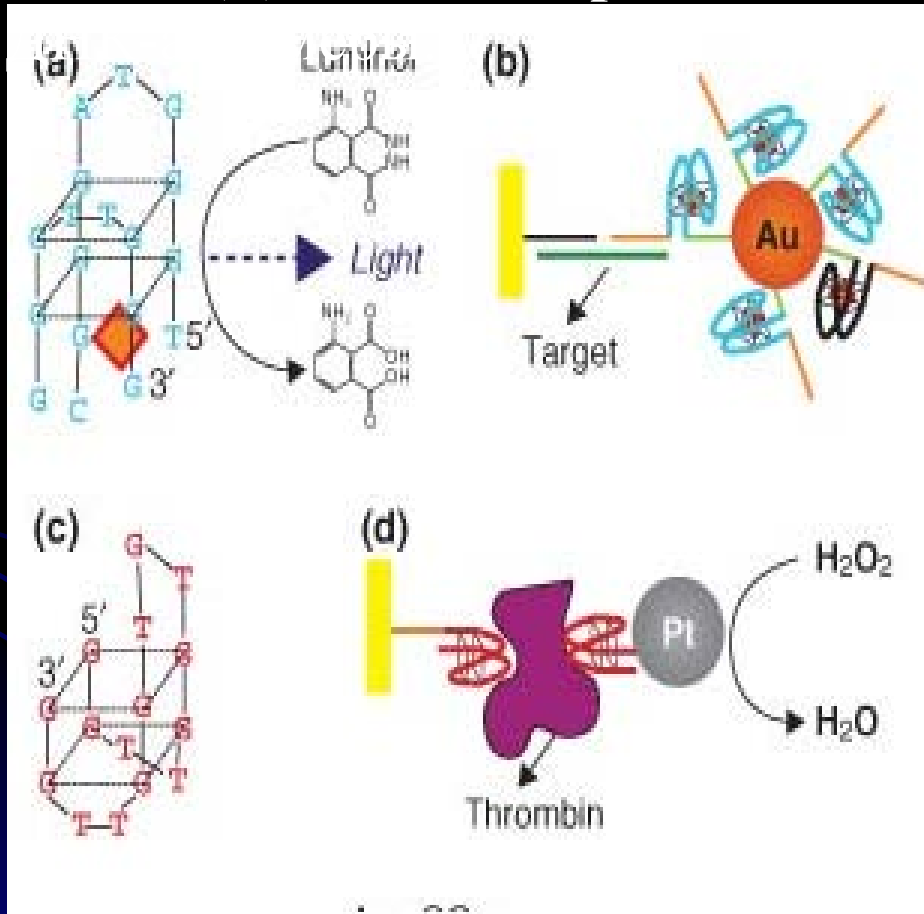
<http://cadnano.org/>

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. дву- и трехмерные материалы.

Структурно-функционализированные ДНК-наноматериалы .

Включение ДНК-аптамеров



Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology

ISSN: 1939-0041

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/121524305>

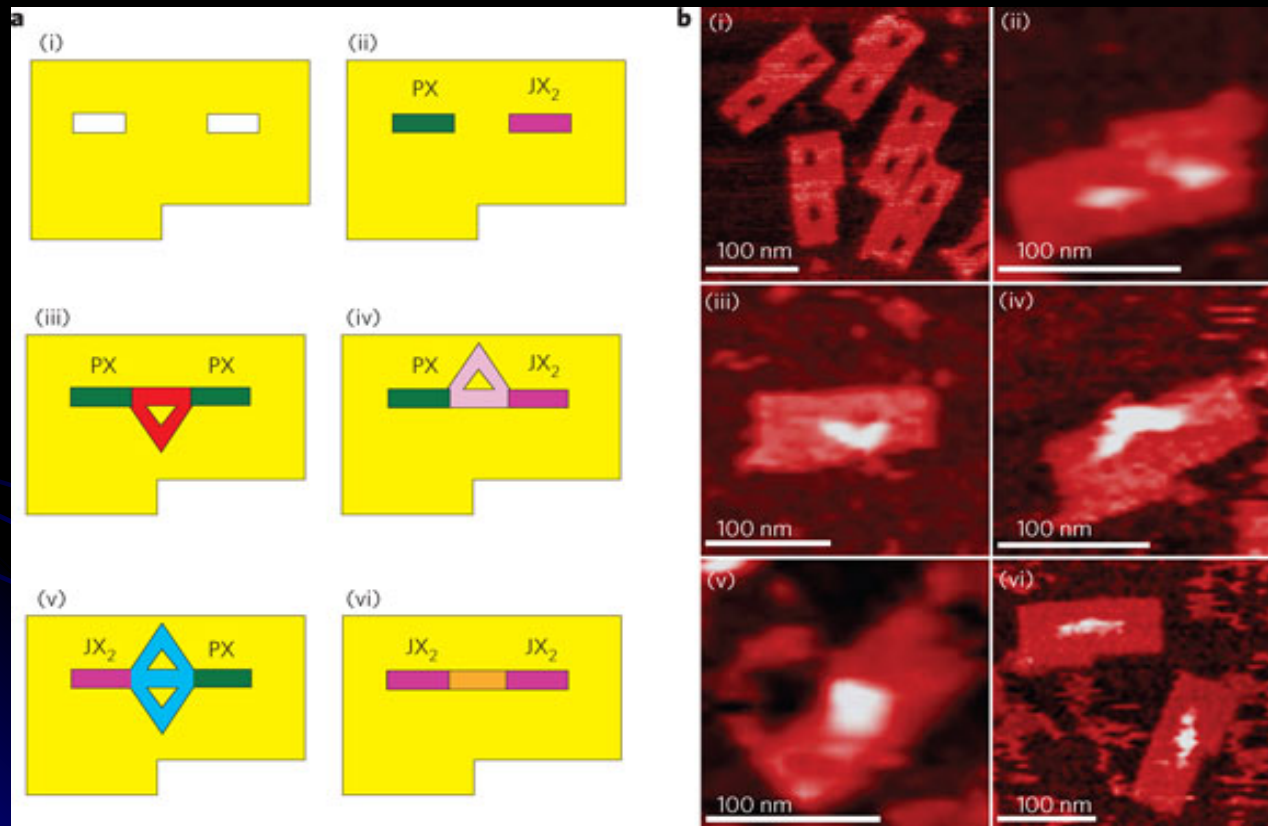
www.molgen.mpg.de/~nabt/background.html

ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК

2.1.1. трехмерные материалы : динамическая форма сборки.

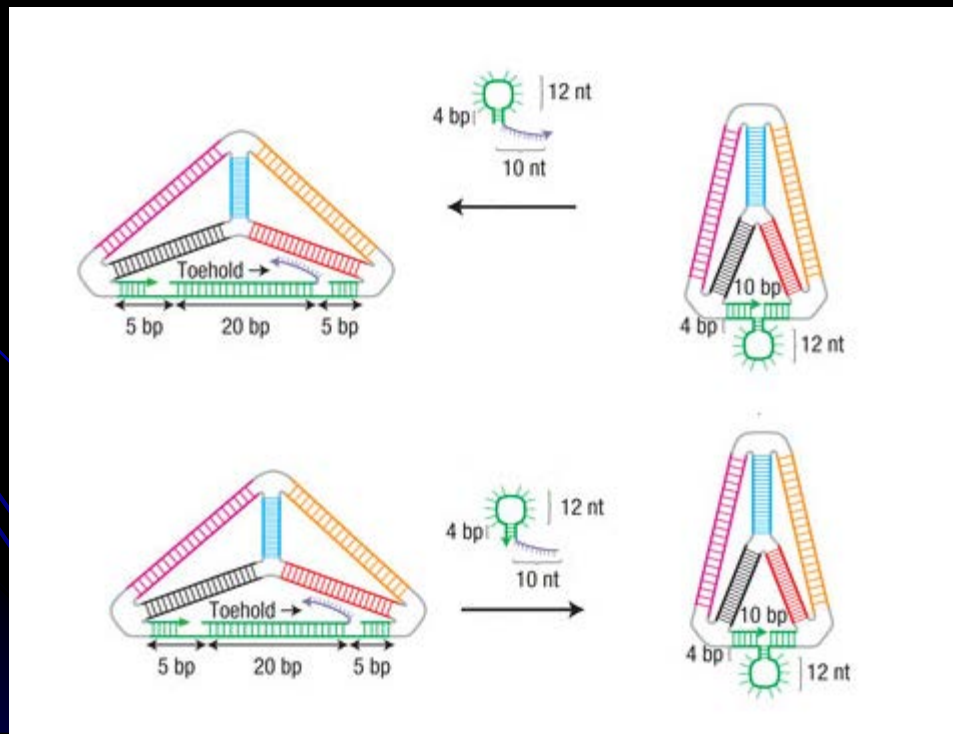
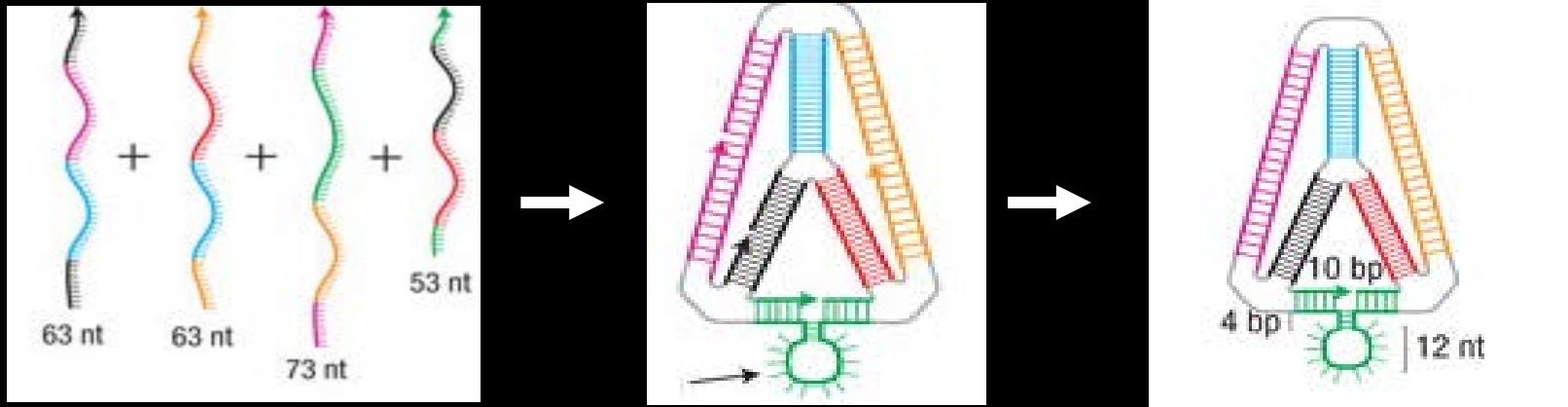
Новый компонент захвачен

между двумя независимо запрограммированными устройствами ДНК.

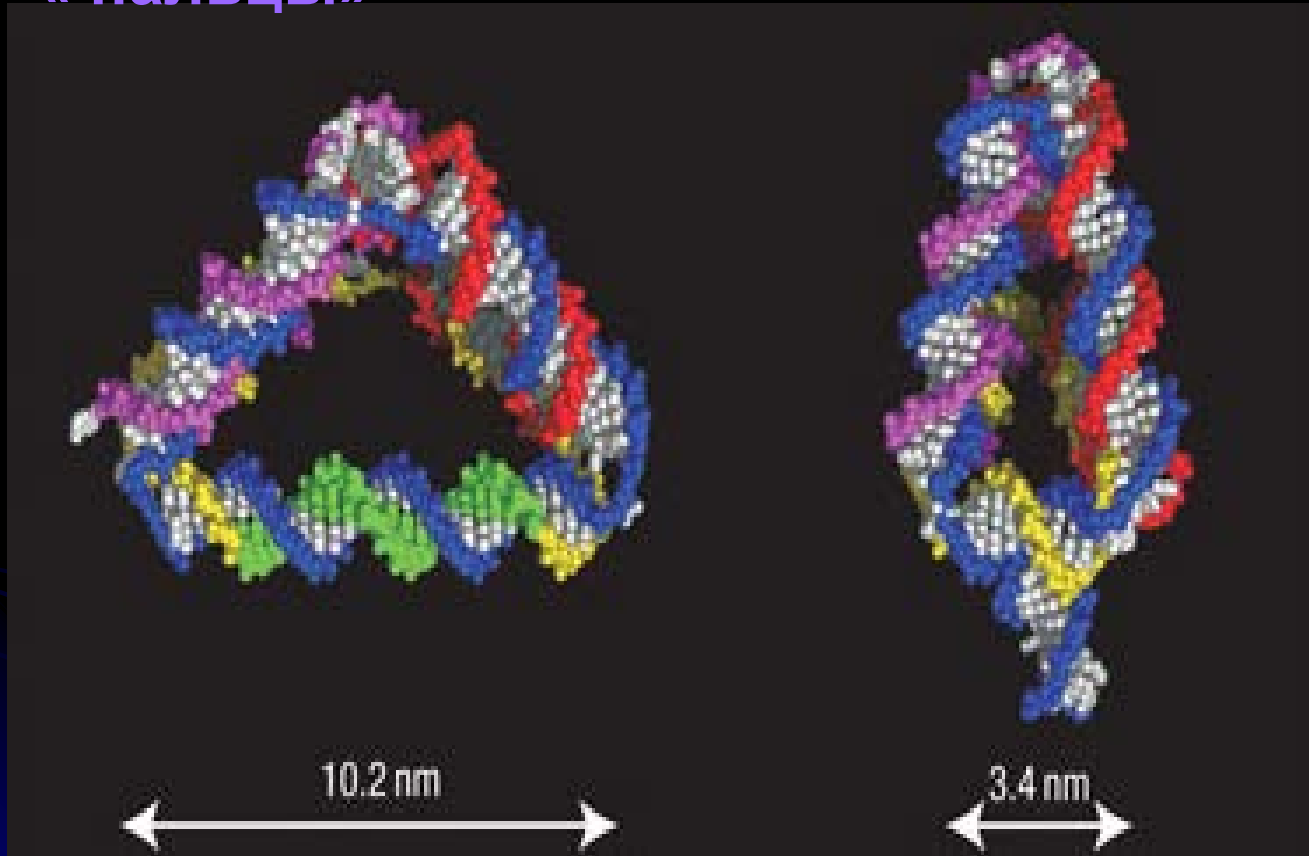


ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения



ДНК нанотехнология: 2.1. Материалы на основе ДНК
2.1.1. трехмерные материалы, реализация движения.
« пальцы »

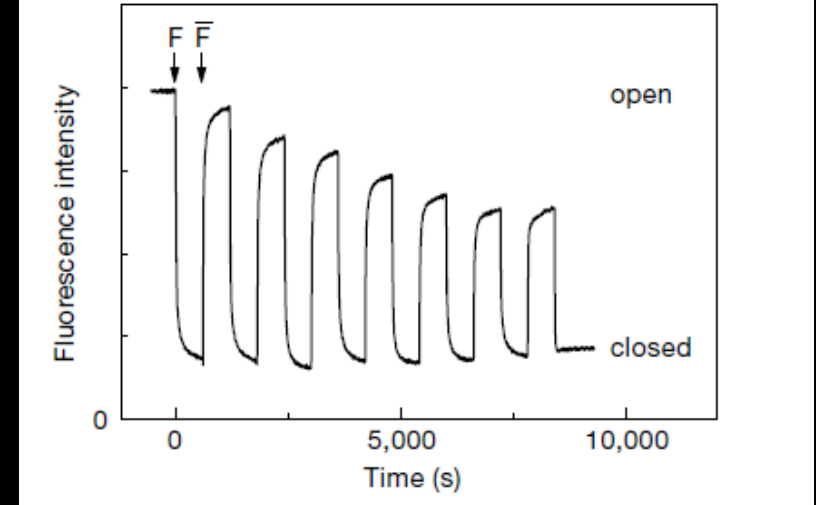
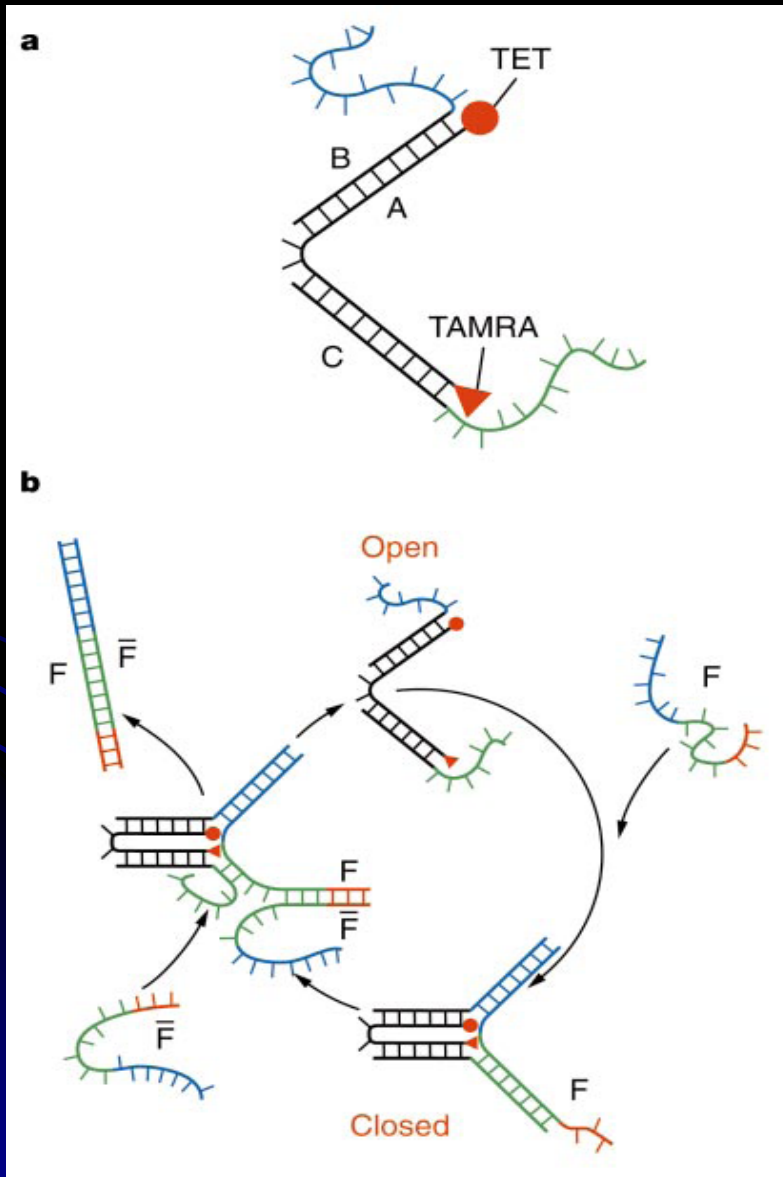


Nature Nanotechnology 3, 93 - 96 (2008)

ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения.

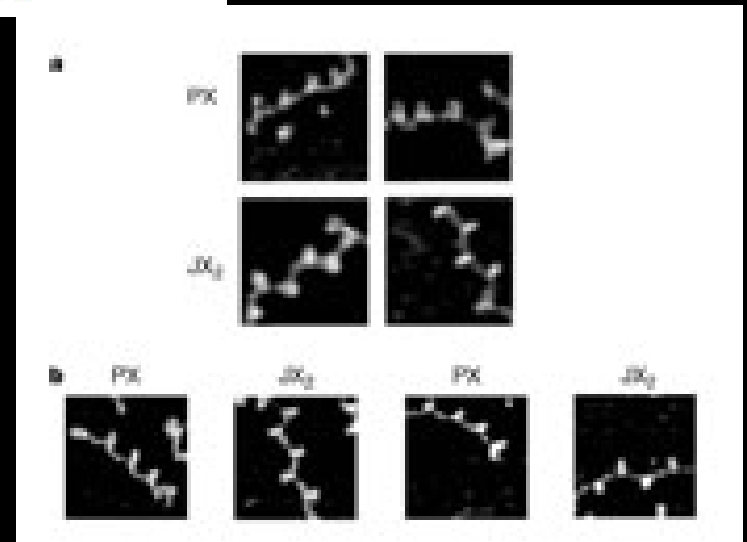
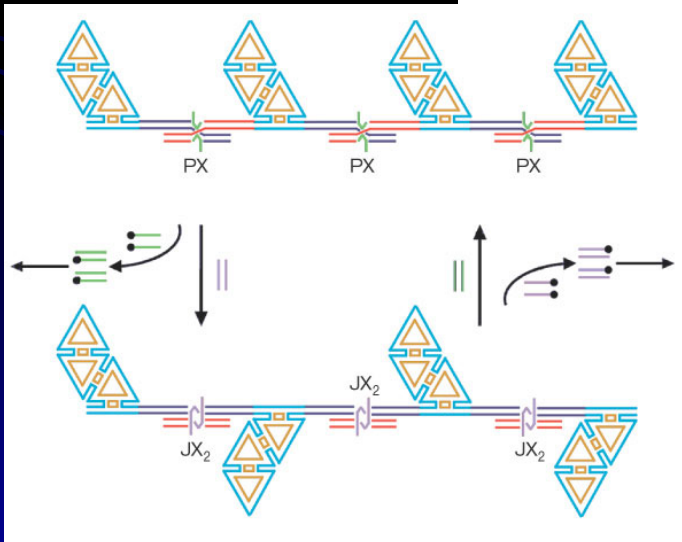
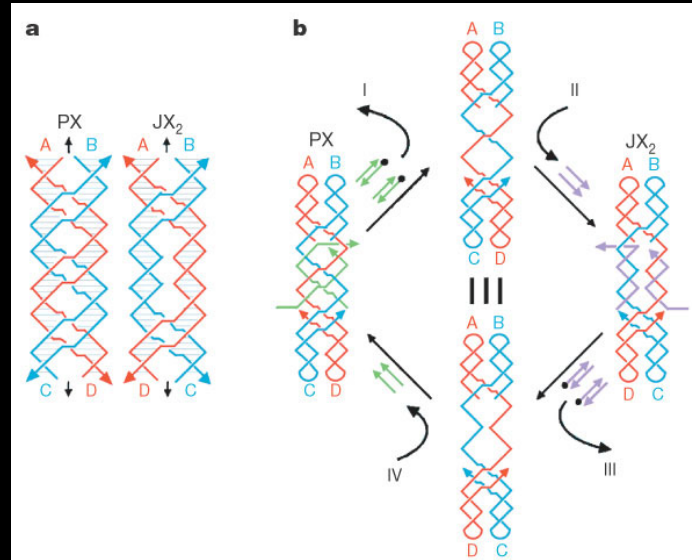
«Пинцет»



ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения.

Механическое устройство, управляемое скрещиванием

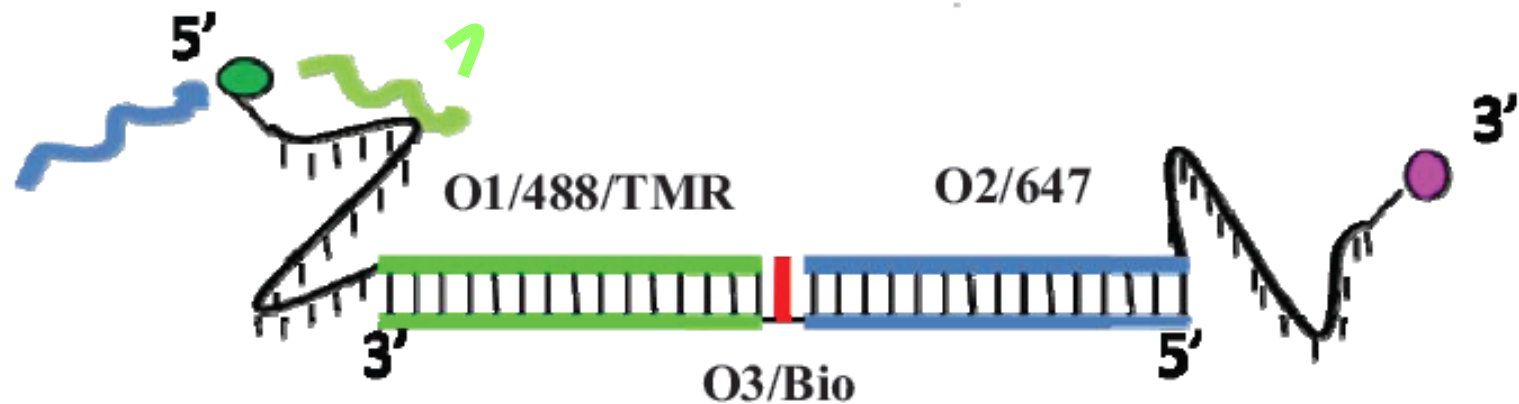


ДНК нанотехнология:

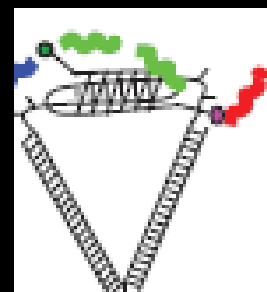
2.2. Реализация направленного движения: за счет изменения конформации под внешним воздействием (I-Switch)

Открытая конформация:

I-Switch



Закрытая конформация:

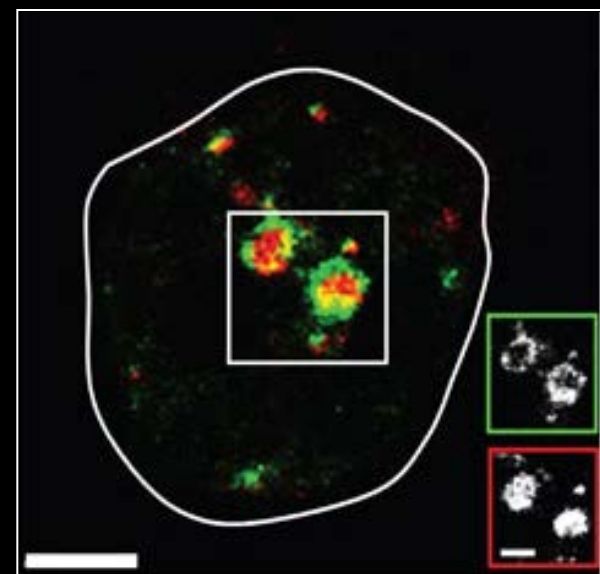
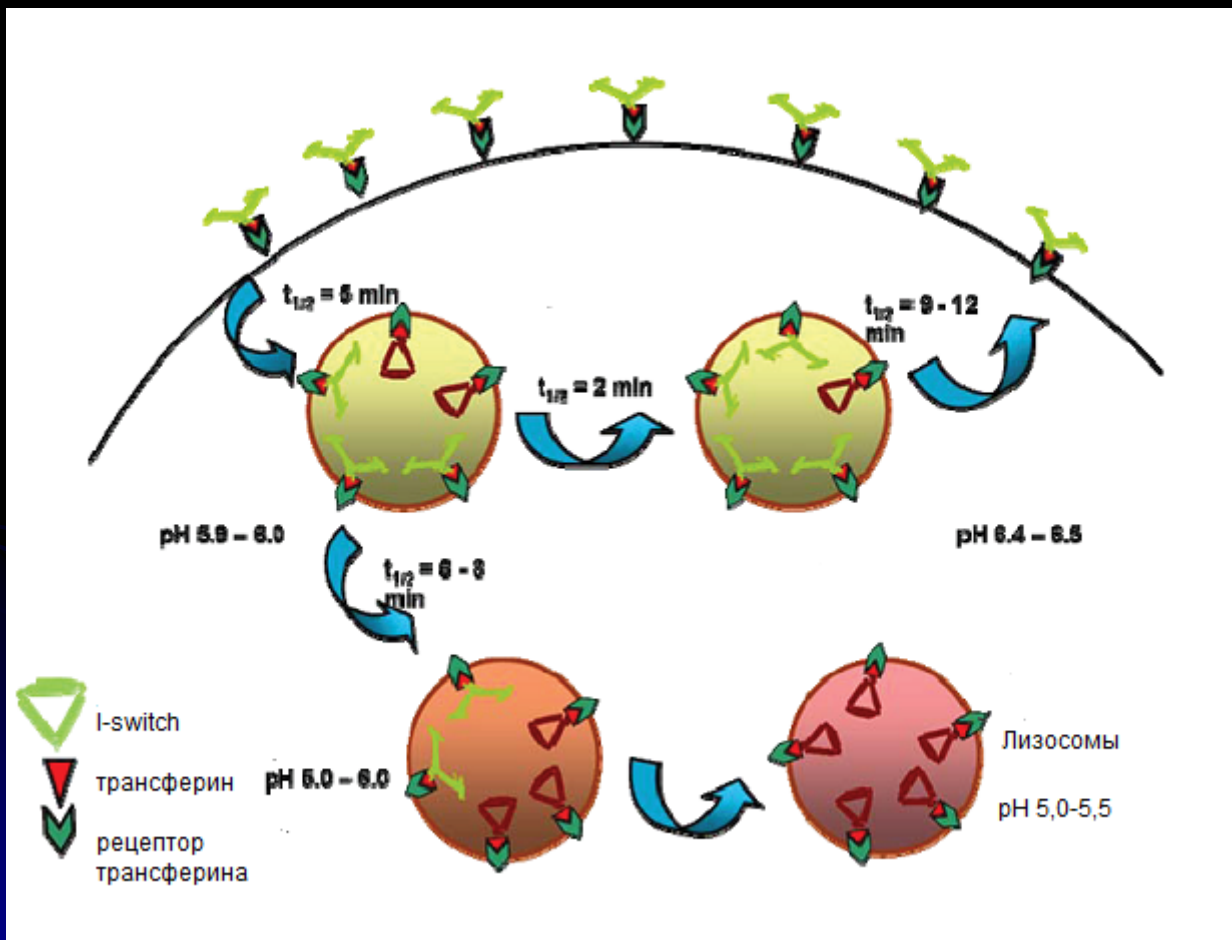


Nature Nanotechnology 4, 325 - 330 (2009)

ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения:

за счет изменения конформации под внешним воздействием

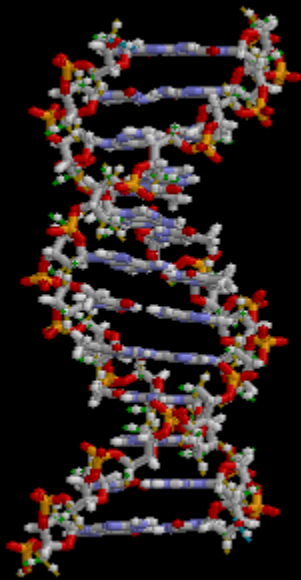


✓ Первый сенсор в живой клетке

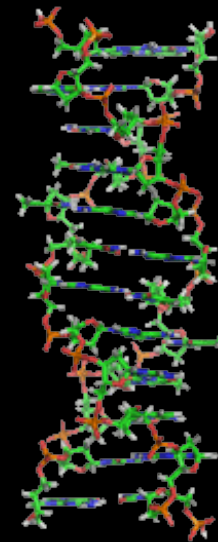
ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения:

Движение за счет переключения между В и Z- формами ДНК



В- форма



Z- форма

poly (dGC) 2
37°C, и pH,
низкая соль и
5-CH3 cytosine

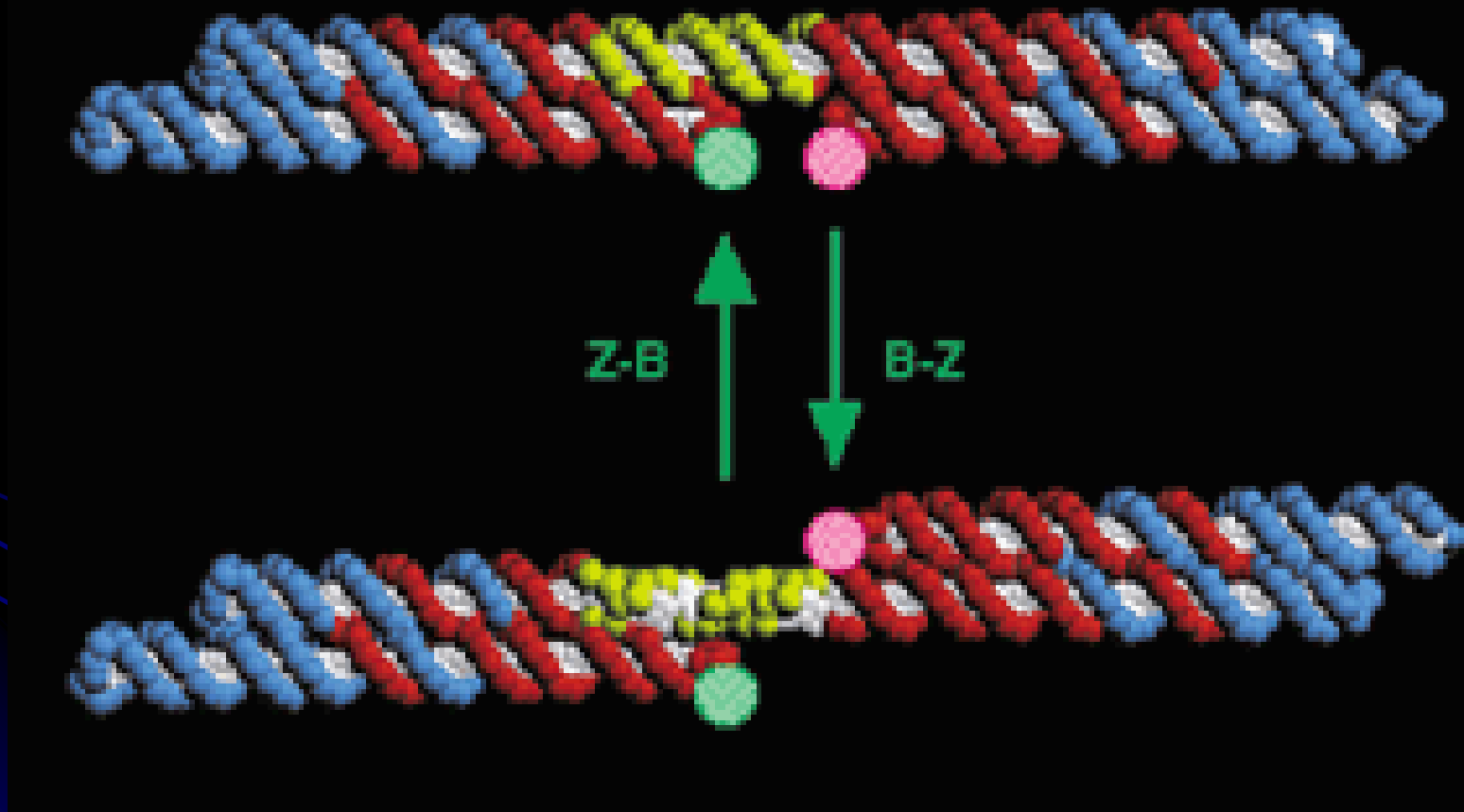
ДНК нанотехнология:

2.2. Реализация направленного движения:

Движение за счет переключения между В и Z- формами ДНК

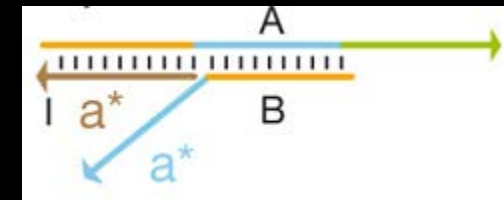
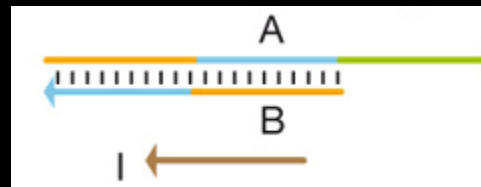
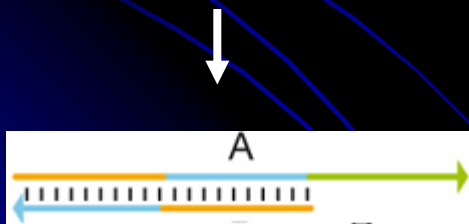
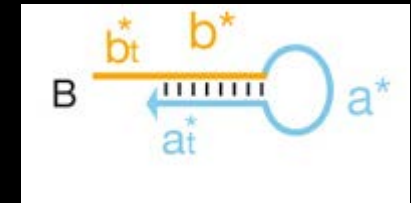
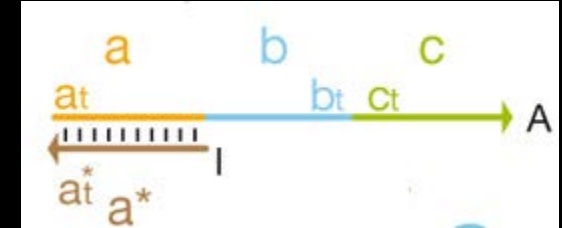
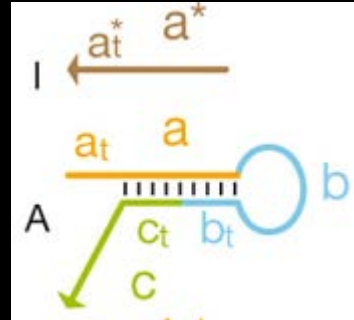
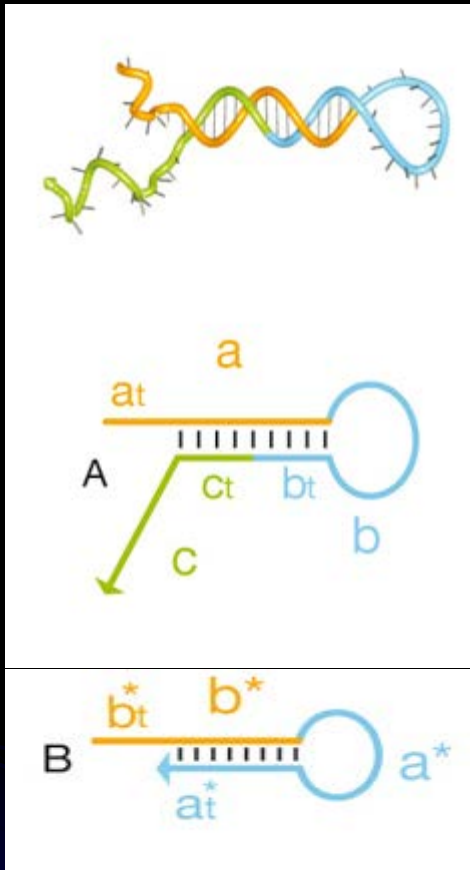
Изменение от В-ДНК до Z-ДНК

приблизительно- 128° для каждой d (CG) пары



Nature 397, 144-146, 1999 «A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA», N C. Seeman & др.

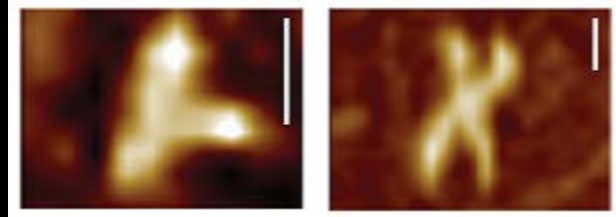
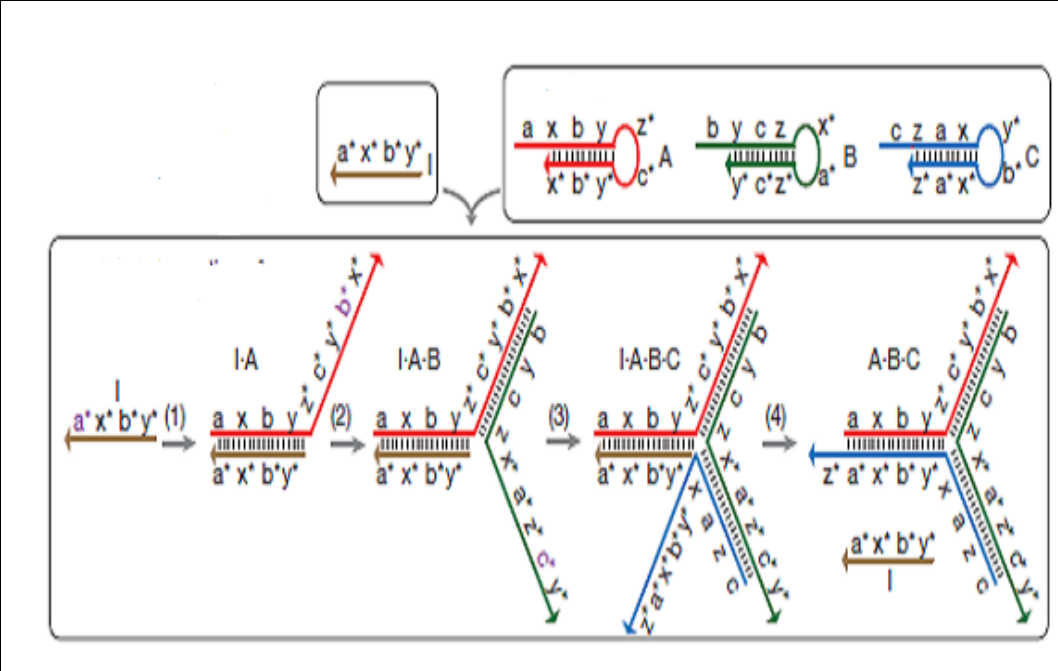
2.2. Реализация направленного движения: Программирование путей самосборки



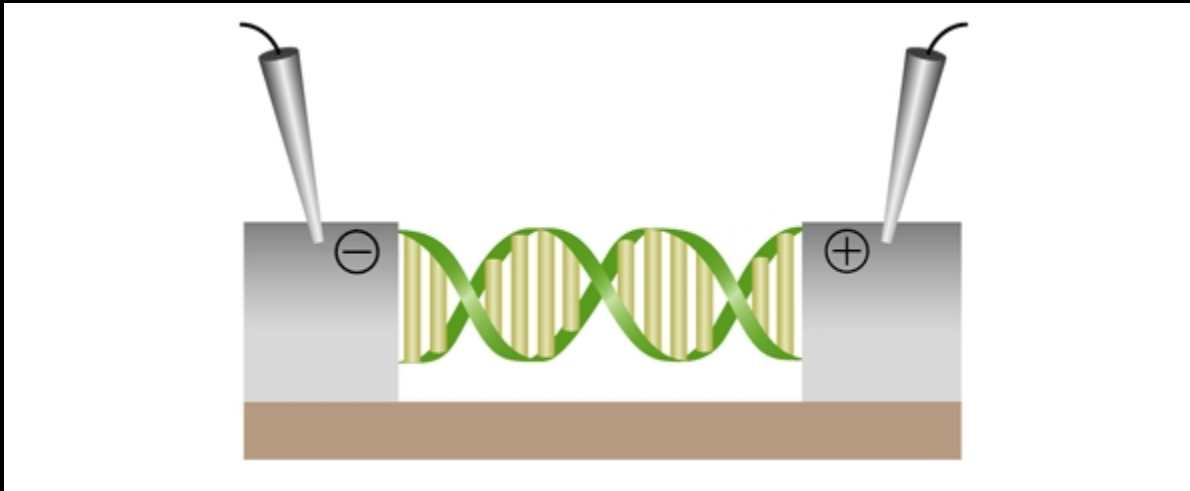
Программирование геометрии: каталитическая самосборка разветвленных соединений с четырьмя руками и с тремя руками

➤ **Возможность проектировать системы, которые выполняют различные функции в разный момент времени без человеческого вмешательства!**

➤ **Возможность упорядочивать направления самосборки.**



2.3. ДНК электроника

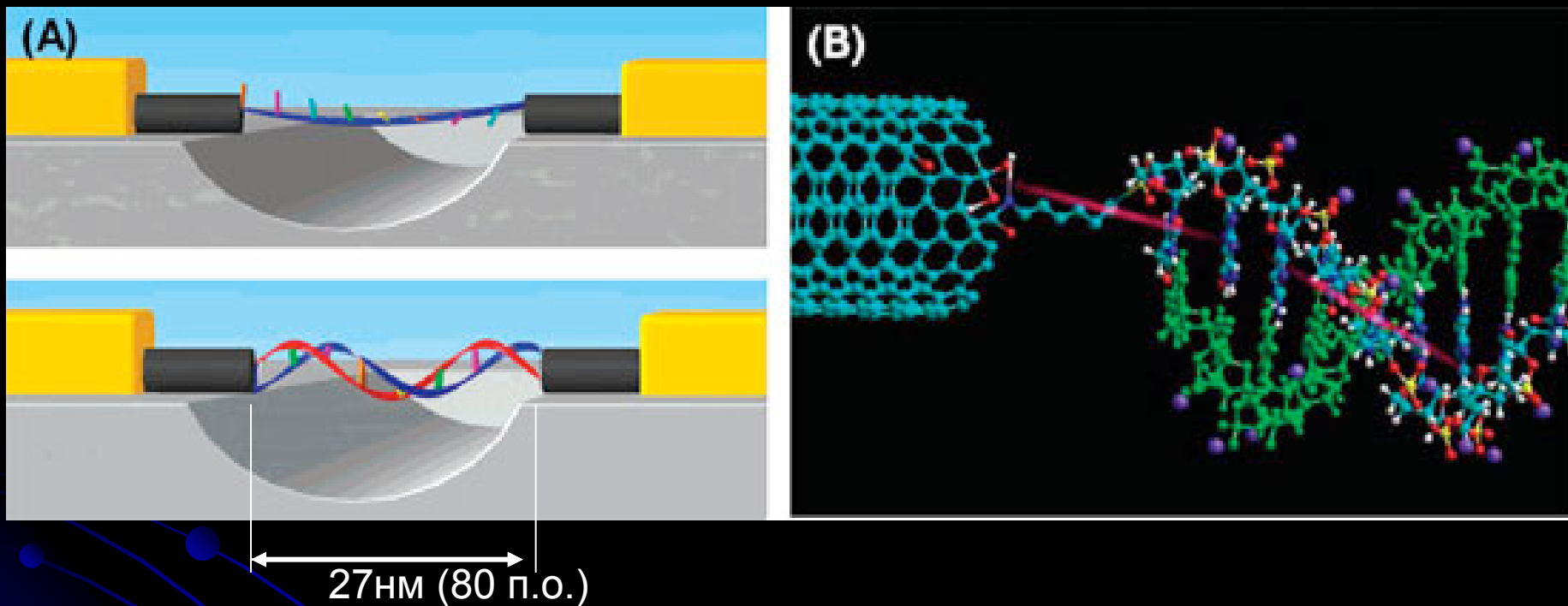


«Мир направляется к гибридной технологии, в которой транзистор будет сделан из молекул ДНК, которые связаны с углеродом нанотрубок, а другие части будут сделаны из кремния»

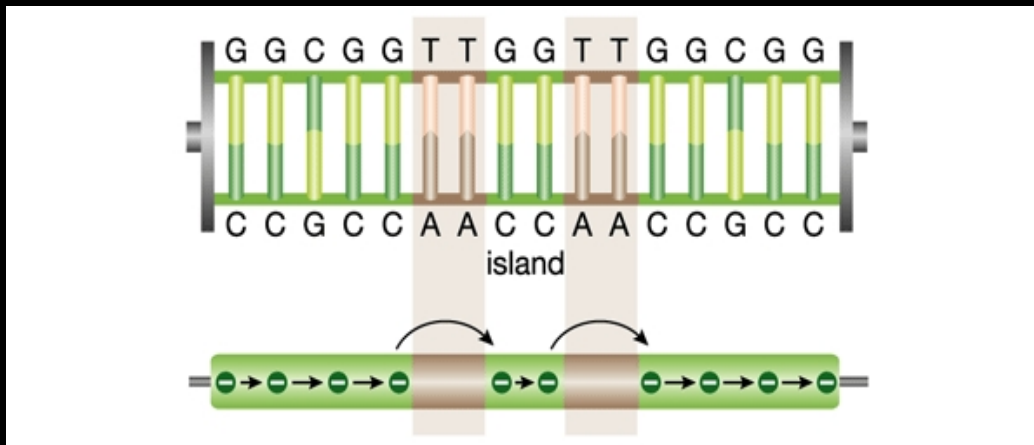
EMBO Rep. 2003 May; 4(5): 442–445.

*Книга: В.А. Карасев и В. В. Лучинин (каф. микроэлектроники СПбГЭТУ)
"Введение в конструирование бионических наносистем",*

Измерения проводимости индивидуальной ДНК



Nano Lett., 2008, 8 (1), pp 26–30



ДНК действовала как изолятор,
полупроводник,
проводник

в зависимости от последовательности, длины и ориентации

(*Nature* 398 407)

2.4. Вычисления на основе ДНК



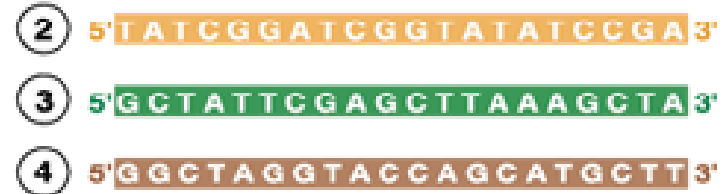
2.3. Вычисления на основе ДНК .

Задача коммивояжера (Adleman (1994), Science 266 (11)) .

Нужно выбрать самый короткий путь и побывать в каждом городе только один раз.



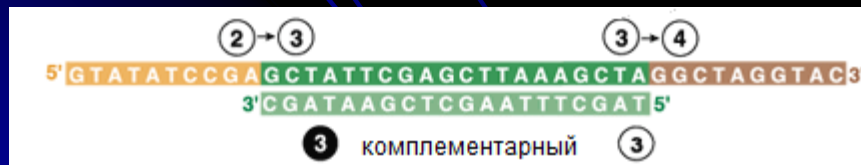
1. Каждому городу присвоим уникальную последовательность ДНК



2. Каждому пути присвоим свою уникальную последовательность, объединяя последовательности городов:



3. Мгновенная генерация всех решений добавлением последовательностей комплементарных последовательностям городов



4. Отбор правильного решения (физическими методами)

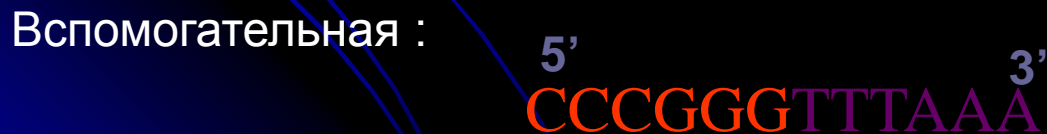
“Эти компьютеры не будут конкурировать с вычислением на основе кремния с точки зрения скорости. Их преимущество состоит в том, что они могут использоваться в жидкостях, таких как образец крови или в теле, и принимать решения на уровне единственной клетки.”

- Главная выгода использования компьютеров ДНК, чтобы решить сложные проблемы - то, что различные возможные решения созданы одновременно. Это известно как **параллельная обработка**. Люди и большинство электронно-вычислительных машин попытаются решить проблему - один процесс за один раз (линейная обработка).
- В перспективе больше чем 10 триллионов молекул ДНК могут вписаться в область, не большую чем 1 кубический сантиметр. Так компьютер ДНК мог бы держать 10 терабайт данных и выполнить 10 триллионов вычислений за один раз.

Универсальная ДНК система,
способная к выполнению простых логических операций.

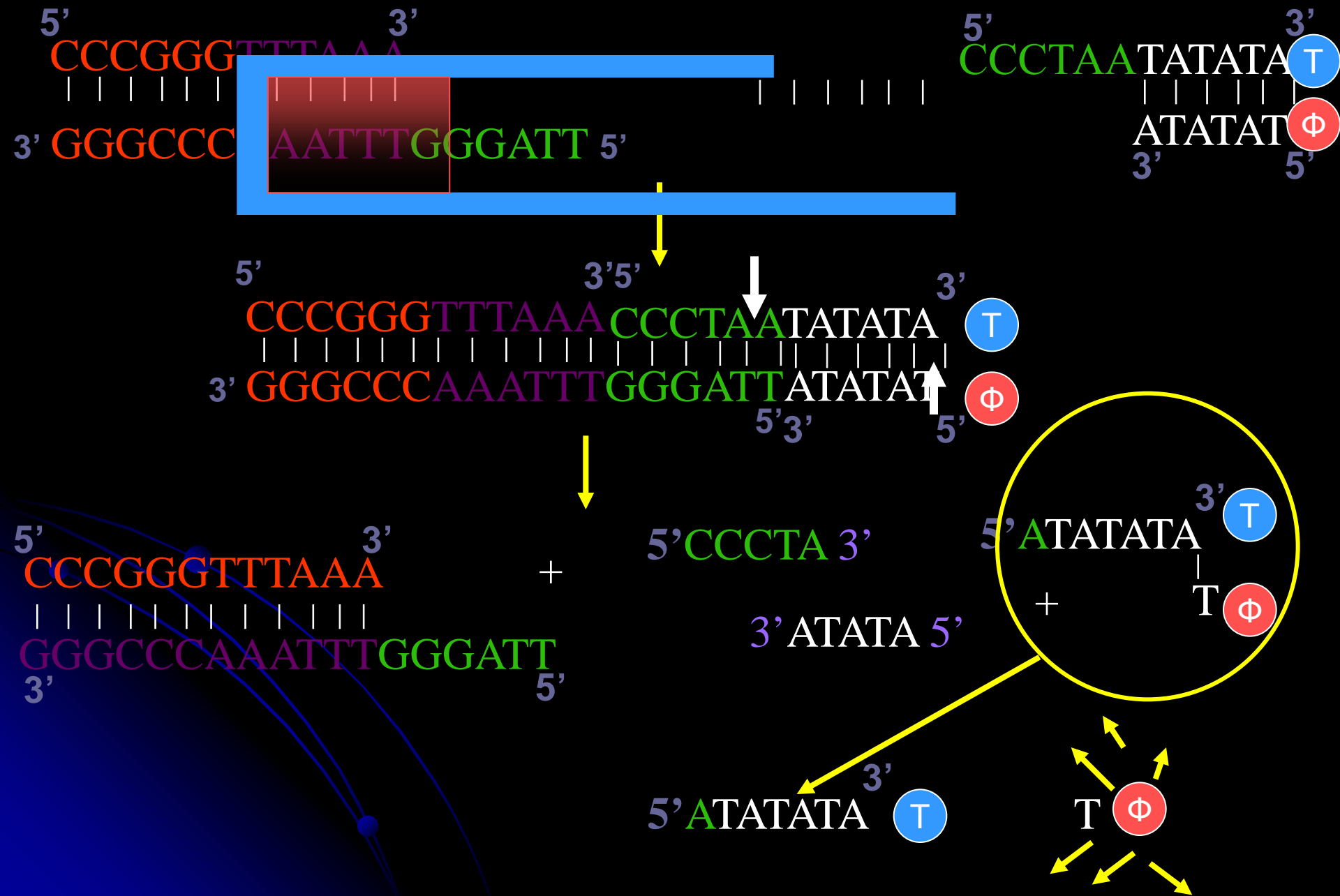
Задача о Сократе (*Nature Nanotechnology* 4, 642 - 648 (2009)):

Человек смертен. Сократ – человек. Смертен ли Сократ?



1. Сократ человек? Проверка:



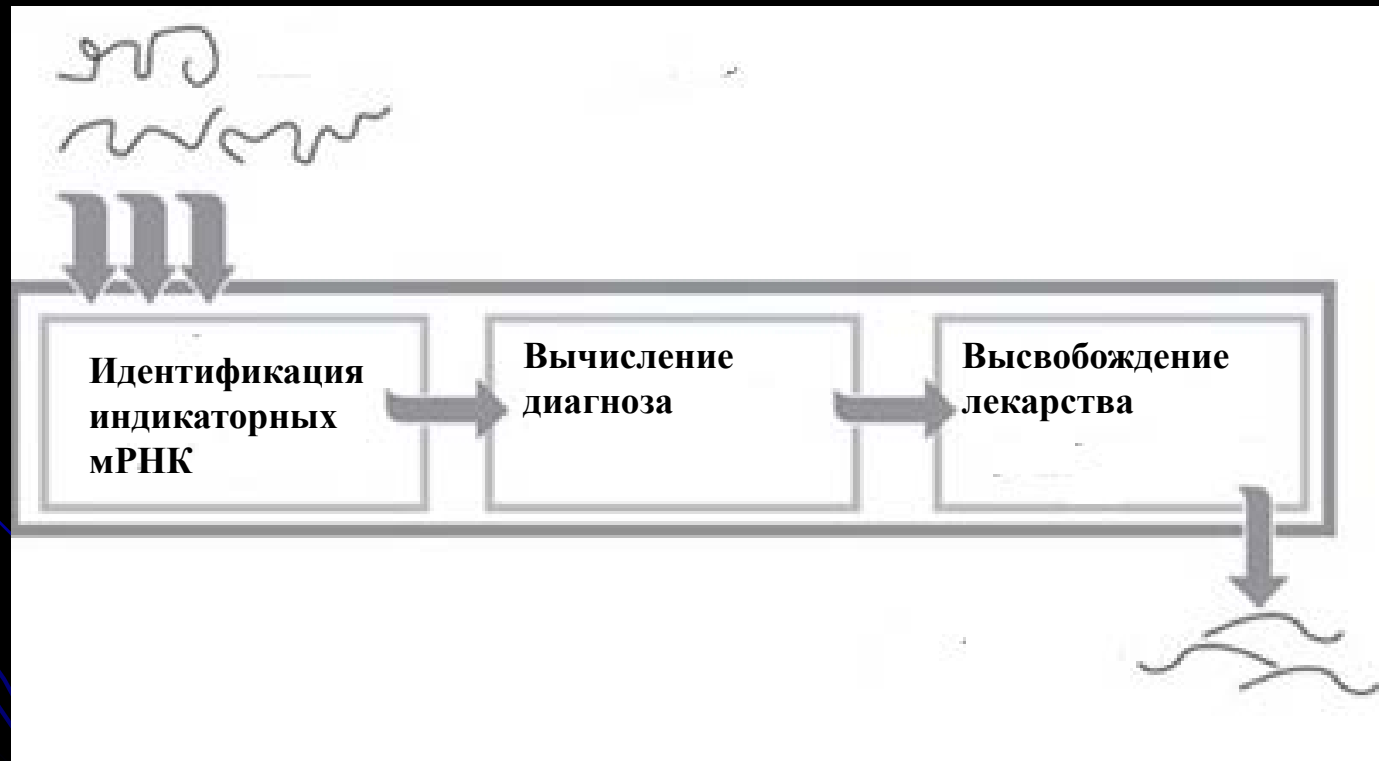


2.3. Вычисления на основе ДНК

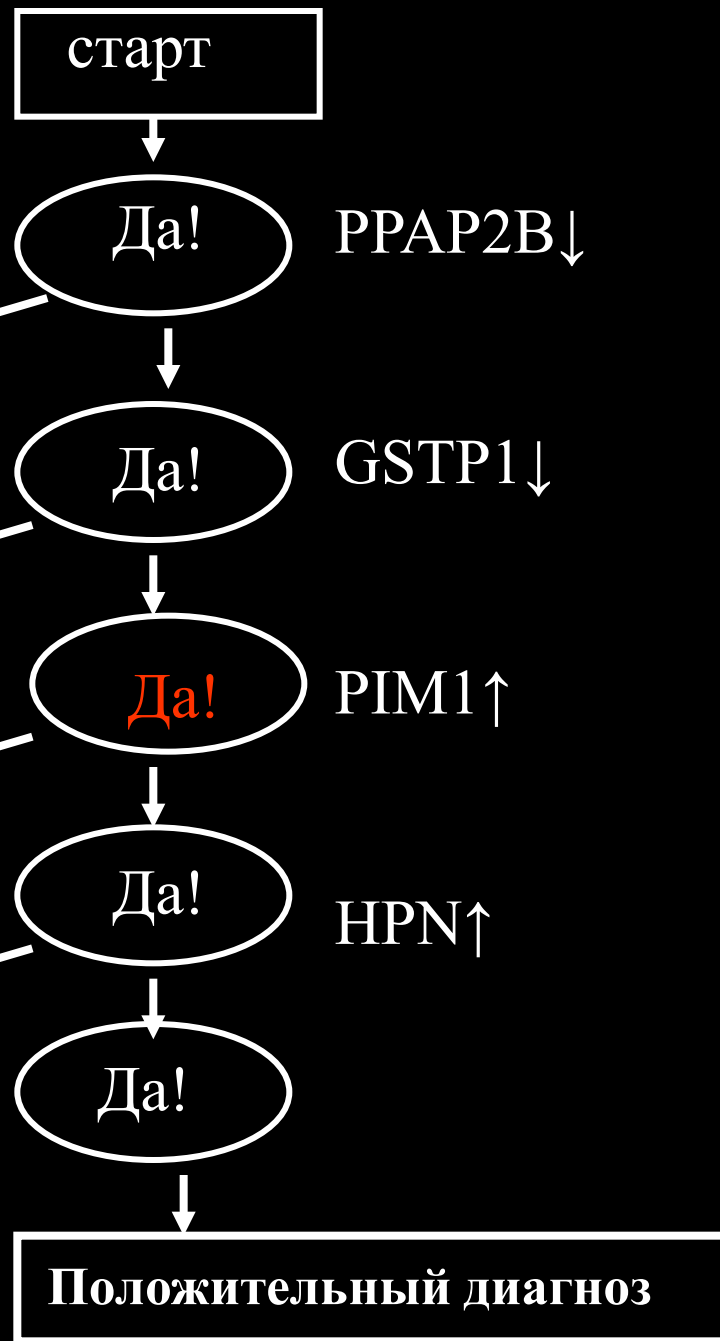
Пример применения:

Автономный молекулярный компьютер
для логического контроля экспрессии генов

мРНК,
изменяющиеся при
болезни

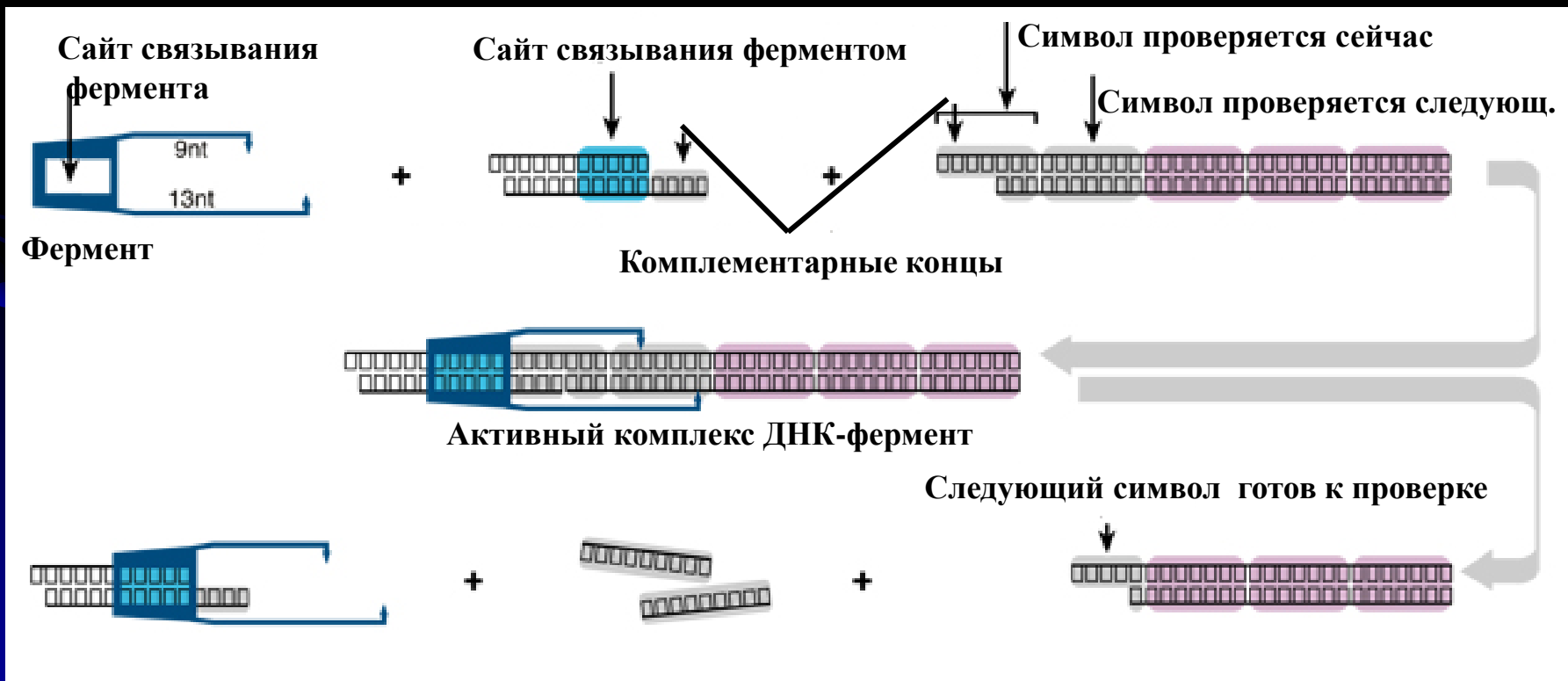
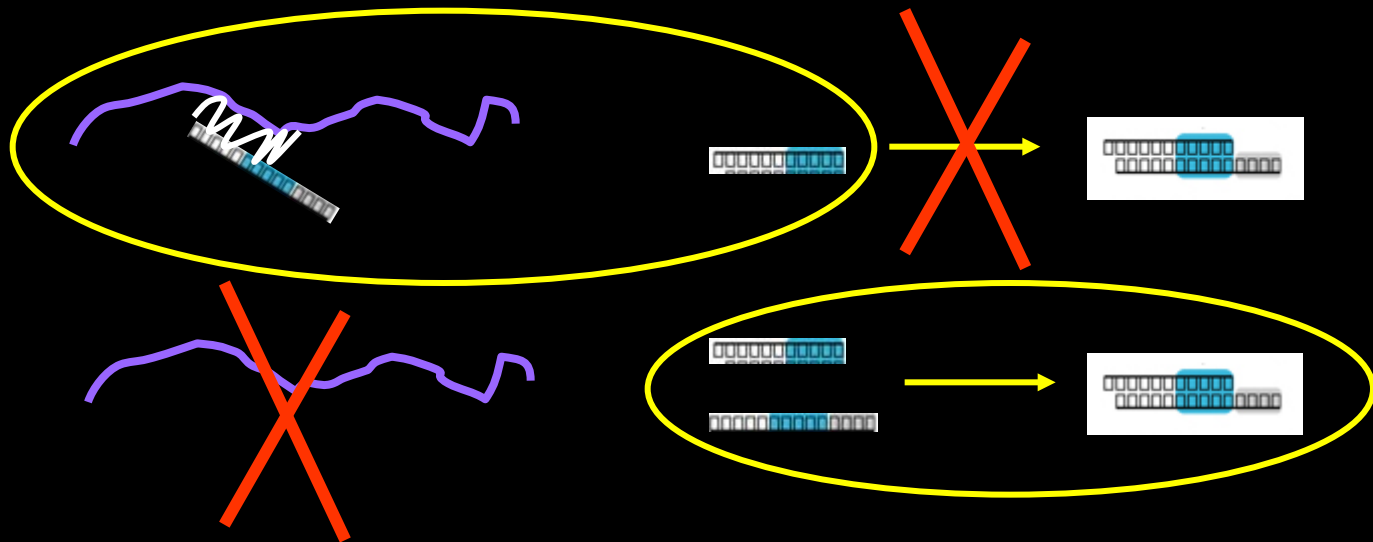


Рак простаты:
PPAP2B↓ и GSTP1↓ и
PIM1↑ и HPN↑



PPAP2B

PPAP2B↓



Подведение итогов: Что можно сделать и как использовать нуклеиновые кислоты в нанотехнологии?

- **основа новых материалов и механизмов наноразмеров**
 - **Направленно создать любую трехмерную структуру или поверхность**
 - **Реализовать движение**
 - **Использовать как маршрутизатор: для программируемого направления самосборки наноструктур**
 - **Использовать сортировщиком : для загрузки и разгрузки транспортируемых наночастиц**

- **основа вычислений и диагностикумов:**
 - **Параллельные вычисления**
 - **Тестирование одновременно нескольких параметров в биологических жидкостях на основе сборки участка узнавания эндонуклеазы рестрикции или ДНК с каталитической функцией**
 - **Лекарства : может быть запрограммировано высвобождение, как ответ на суперэкспрессию различных мРНК**

Контрольные вопросы

- 1. Какое в двуспиральной молекуле ДНК, отношение пурины: пиримидины?
- 2. Чем определяется первичная структура НК?
- 3. Чем обусловлено образование пространственных структур, образуемых НК?
- 4. Какие факторы влияют на устойчивость двойной спирали?
- 5. Что такое молекулярная самосборка?
- 6. Что определяет размер ячейки сетки из материала на основе ДНК?
- 7. Что такое и что позволяет реализовать ДНК-оригами?
- 8. Что позволяет реализовать запрограммированное движение в пространстве для ДНК-материала?
- 9. Что лежит в основе построения логических ворот на основе ДНК?
- 10. Как получают НК для вычислений на основе ДНК?
- 11. В чем преимущество компьютеров на основе по сравнению с классическими кремниевыми вычислениями?

Спасибо!

