

УДК 577 543.4 543.5

Визуализация G-квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов

Е. В. Дубровин^{1*}, Н. А. Баринов¹, Д. В. Клинов^{2,3}¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия³Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

*E-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 08.03.2022

Принята к печати 13.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11705

РЕФЕРАТ Образуемые G- или C-богатыми участками ДНК неканонические структуры, такие, как квадруплексы и i-мотивы, а также их ассоциаты, в последние годы привлекают все возрастающее внимание как из-за накопившихся аргументов в пользу их существования *in vivo*, так и возможности их потенциального использования в нанобиотехнологии. Важную роль в изучении структуры и свойств неканонических форм ДНК, а также в контроле искусственно создаваемых архитектур на их основе играет визуализация этих структур. В данном обзоре проанализированы методы, используемые для визуализации квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов с высоким пространственным разрешением, такие, как флуоресцентная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Представлены основные подходы к подготовке образцов для визуализации такого рода структур. Рассмотрены примеры визуализации неканонических структур ДНК различных морфологий, таких, как G-проволоки, G-петли, а также отдельных квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов. Продемонстрирован потенциал использования АСМ для визуализации неканонических структур ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА G-квадруплексы, i-мотивы, (иммуно)флуоресцентная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; БМВК – 3,6-бис(1-метил-4-винилпиридиний)карбазолдийодид; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; АСМ – атомно-силовая микроскопия; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; GM – N,N'-(декан-1,10-диил)-бис(тетраглицинамид); ThT – тиофлавин Т.

ВВЕДЕНИЕ

Хугстеновское спаривание нуклеотидных оснований в ДНК приводит к образованию ряда неканонических структур, включая G-квадруплексы и i-мотивы [1, 2]. За последние годы накопились доказательства существования G-квадруплексов и i-мотивов в живых клетках разных организмов, включая человека [3, 4]. Эти неканонические структуры ДНК могут быть ответственны за регуляцию молекулярных процессов внутри клетки, включая репликацию ДНК, транскрипцию и поддержание генома [5, 6]. Большое число G-богатых (а значит, согласно принципу комплементарности ДНК и C-богатых) последовательностей в промоторных и теломерных областях онкогенов делает G-квадруплексы (и i-мотивы) потенциальной мишенью для доставки противоопухолевых средств в клетку [7–10]. Кроме того, ДНК-архитектуры на основе G-квадруплексов

и i-мотивов востребованы в бионанотехнологии: для создания молекулярных машин, разработки биосенсоров, устройств молекулярной электроники, молекулярной диагностики и др. [11–16].

К традиционным методам выявления и анализа неканонических структур ДНК относятся круговой дихроизм, спектроскопия ядерного магнитного резонанса и абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой области при плавлении [17, 18]. Эти методы предоставляют усредненные по большому ансамблю молекул характеристики (например, такие, как абсорбция света или молярная эллиптичность на определенных длинах волн), позволяющие судить о структуре G-квадруплексов и i-мотивов. Не менее важным аспектом при изучении структуры и свойств неканонических форм ДНК является их визуализация. Кроме того, прямая визуализация необходима для контроля создаваемых

ДНК-архитектур. Однако нанометровые размеры гуанинового квартета квадруплекса или цитозин-цитозинового пары *i*-мотива значительно ограничивают число методов, способных справиться с этой задачей.

Одно из решений этой проблемы – использование флуоресцентных меток на антитела к неканоническим структурам ДНК (иммунофлуоресцентная микроскопия) или на сами неканонические структуры ДНК (флуоресцентная микроскопия). Такие метки позволяют установить наличие неканонических структур ДНК в исследуемом образце, например, внутри клетки, а также проанализировать их распределение. При таком способе неканонические структуры визуализируются по точечной метке, что не позволяет оценить морфологию самой структуры ДНК.

Достаточным для визуализации неканонических структур ДНК пространственным разрешением обладают методы электронной и сканирующей зондовой микроскопии. При этом сканирующая электронная микроскопия, в которой изображение формируется на основе обратно-рассеянных электронов, из-за ряда свойственных этому методу ограничений, таких, как необходимость исследования проводящих образцов и более низкое (по сравнению с просвечивающей электронной микроскопией) разрешение, практически не используется для целей визуализации структур ДНК. Напротив, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), которая основана на прохождении пучка электронов через ультратонкий (толщиной порядка 0.1 мкм) образец, широко распространена при изучении ДНК. В ПЭМ изображение, формируемое из электронов, прошедших сквозь образец, увеличивается электромагнитными линзами и фокусируется на матрице прибора с зарядовой связью.

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) представляет собой класс методов, получение изображения с помощью которых основано на локальном взаимодействии зонда с поверхностью образца в большом количестве точек. Наиболее распространенной разновидностью СЗМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ), в основе функционирования которой лежит обменное взаимодействие между атомами зонда и образца [19].

СЗМ значительно отличается от ПЭМ не только принципом работы, но и процедурой приготовления образцов. Так, типичная процедура приготовления ДНК для исследования с помощью ПЭМ включает в себя фиксацию образца с использованием глутарового альдегида или формальдегида, а также создание контраста напылением на образец ионов тяжелых металлов или его обработкой контрастирующим

веществом. Кроме того, исследование с помощью электронной микроскопии обычно проводят в вакууме (низковакуумные модели просвечивающих электронных микроскопов, позволяющие проводить исследование образцов в водных парах или растворах, характеризуются значительно меньшим пространственным разрешением, сложными пробоподготовкой и подбором параметров работы [20, 21]). Перечисленные условия, при которых ДНК находится в процессе приготовления образца и его исследования, далеки от физиологических, из-за чего структуры ДНК, визуализированные с помощью электронной микроскопии, могут сильно отличаться от нативных. Кроме того, контрастирование уменьшает разрешение получаемых ПЭМ-изображений. Методы сканирующей зондовой микроскопии представляют собой более гибкий инструмент в контексте условий приготовления и среды сканирования образца, позволяя наносить ДНК из водных растворов без дополнительных, чуждых нативной среде, компонентов и проводить исследование в воздушных и жидких средах [22]. Дополнительным отличительным признаком АСМ является возможность визуализации динамических процессов в режиме реального времени [23]. Благодаря перечисленным факторам, АСМ является широко распространенным методом визуализации различных структур ДНК и их ассоциатов на уровне отдельных молекул.

В данном обзоре систематизированы основные методы и подходы, используемые для визуализации G-квадруплексов, *i*-мотивов и их ассоциатов, а также проанализированы основные научные достижения, связанные с визуализацией этих неканонических структур ДНК. Рассмотрены методические аспекты приготовления образцов ДНК для АСМ.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

В последние годы интенсивно развивается направление, связанное с разработкой небольших флуоресцирующих молекул (зондов), специфически связывающихся с G-квадруплексами и *i*-мотивами и позволяющих локализовать их по свечению флуоресценции. В случае G-квадруплекса такое специфическое связывание может осуществляться за счет π -стэкингового взаимодействия флуоресцентного красителя с внешней тетрадой G-квадруплекса, за счет взаимодействия зонда с петлями или бороздками G-квадруплекса, а также путем интеркаляции красителя между двумя квадруплексами [24]. Зачастую такие лиганды используются одновременно со специфическими к ДНК-дуплексу флуорофорами (например, такими, как Хёхст или йодид пропидия), что позво-

ляет сопоставлять локализацию канонических и неканонических структур ДНК на одном изображении. Одним из квадруплексных лигандов является 3,6-бис(1-метил-4-винилпиридиний)-карбазолдйодид (БМВК). Так, с его использованием установлено формирование квадруплексов на проксимальных (теломерных) участках хромосом [25, 26]. Другой флуоресцентный краситель, тиазоловый оранжевый, также применяется для визуализации G-квадруплексов [27] и i-мотивов [28] благодаря высокоспецифичному связыванию с ними, сопровождающемуся сильным увеличением флуоресценции. Недостатком данного красителя в контексте визуализации G-квадруплексов и i-мотивов является его низкая селективность, обусловленная способностью связываться также с другими структурами нуклеиновых кислот, включая двухцепочечную ДНК, трехцепочечную ДНК и РНК [27, 29, 30]. Обнаружено, что еще один флуоресцентный краситель, тиофлавин Т (ThT), широко применяющийся для специфического окрашивания амилоидов, также связывается с различными структурами ДНК, при этом усиление флуоресценции при связывании с G-квадруплексами особенно велико (в ~2100 раз в видимой области) [31, 32]. За последние годы разработан и изучен ряд новых соединений для использования в качестве флуоресцентных зондов

на G-квадруплексы и i-мотивы [33], в частности, производные бензотиазола [34, 35].

В связи с предполагаемым участием G-квадруплексов в экспрессии генов и патогенезе болезней большой интерес вызывает внутриклеточная визуализация этих структур. Долгое время такие исследования проводили, в основном, на фиксированных клетках. Так, в работе [36] разработан новый квадруплексный флуорофор S1, который продемонстрировал высокую селективность связывания с G-квадруплексами в экспериментах *in vitro*, а также сильное свечение в ядрышке фиксированных клеток HeLa и слабое – в остальной части ядра. Добавленный одновременно ДНК-краситель 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) более равномерно окрашивал клеточное ядро. Это позволило предположить ядрышковую локализацию G-квадруплексов. С использованием флуоресцентного зонда диимида нафталина с удлинённым ядром (c_{ex} -NDI) выявлена локализация G-квадруплексов в ядрах раковых клеток линии MCF-7 (рис. 1) [37].

Наибольший интерес представляют зонды, позволяющие визуализировать квадруплексы в живых клетках. Такие зонды должны быть не только высокоспецифичными к G-квадруплексам, но также иметь низкую способность связываться с белками и другими биологическими молекулами, уметь про-

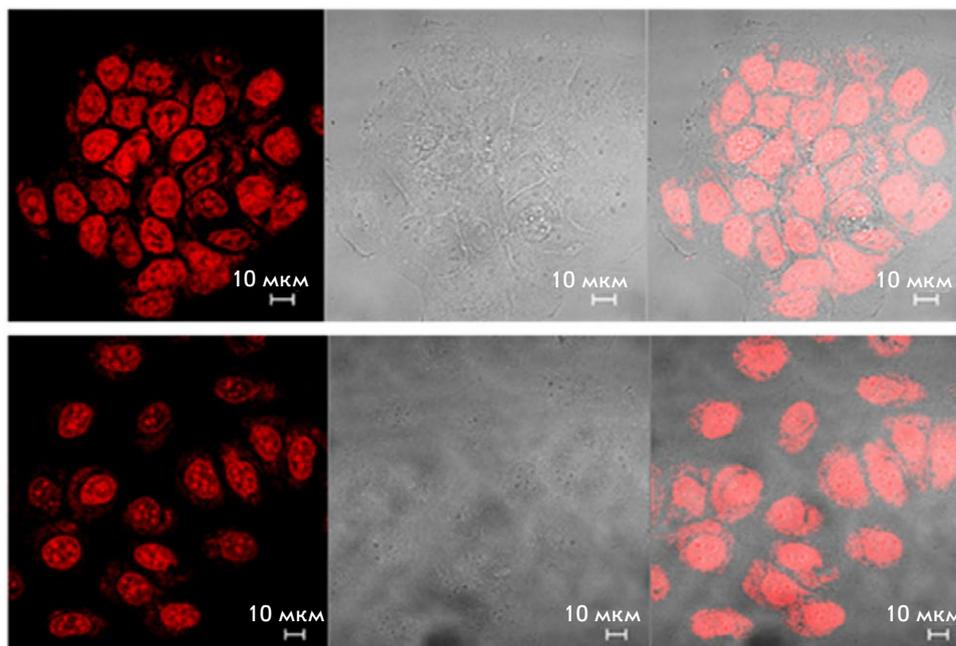


Рис. 1. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия фиксированных раковых клеток MCF-7, меченных (до фиксации) в течение 6 ч с помощью c_{ex} -NDI, демонстрирующая ядерную локализацию G-квадруплексов (слева – сигнал флуоресценции, в центре – наблюдение в светлом поле, справа – наложение двух сигналов). Воспроизведено из [37] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ходить через плазматическую и ядерную мембраны, а также иметь низкую цитотоксичность [38].

Один из квадруплексных зондов, используемых в флуоресцентной микроскопии живых клеток, – изомер БМВК – о-БМВК. На модельных объектах показано разное время затухания флуоресценции о-БМВК при взаимодействии с G-квадруплексами. С помощью этого флуорофора G-квадруплексы были локализованы как в цитоплазме, так и в ядре живых клеток линии CL1-0 (клетки рака легких человека) [39]. Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции позволила не только отличить дуплексы от G-квадруплексов, но и выявить G-квадруплексы разных видов, различающиеся по времени затухания флуоресценции связанного с ними лиганда. Аналогичным методом, но с использованием другого флуоресцентного зонда, DAOTA-M2, определена ядерная локализация и стабильность G-квадруплексов в живых клетках линии остеосаркомы U2OS (рис. 2) [40, 41]. Недавно с использованием ThT в качестве флуоресцентного зонда была подтверждена ядрышковая локализация G-квадруплексов в живых клетках MCF-7 [42].

В последнее время разработаны новые флуорофоры, характеризующиеся высокой селективностью к G-квадруплексам, при этом обладающие высокой стабильностью и возможностью использоваться в живых клетках. В качестве примера можно привести такие лиганды, как N-TASQ [43], 2,6-бис((E)-2-(1H-индол-3-ил)винил)-1-метилпиридина-1 йодид [44], производные карбазола (4a–4c) [45] и другие [46, 47]. Использование этих зондов показало ядрышковую локализацию G-квадруплексов в живых клетках. N-TASQ также применили для визуализации G-квадруплексов на основе РНК в цитоплазме [48]. Наконец, с помощью флуоресцентной микроскопии показано существование митохондриальных G-квадруплексов в живых клетках [35, 49].

Альтернативным подходом к визуализации G-квадруплексов и i-мотивов с помощью флуоресцентной микроскопии является использование специфических антител, усиленных вторичными антителами с пришитыми к ним флуоресцентными метками (иммунофлуоресцентная микроскопия). С этой целью были синтезированы различные антитела, специфичные к ДНК- и РНК-G-квадруплексам (например, 1H6 и BG4), которые позволили визуализировать G-квадруплексы в различных клетках и тканях [50–53]. Эти результаты являются важными аргументами в пользу существования G-квадруплексов в клетках млекопитающих, включая ядро, цитоплазму и митохондрии. Например, с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии на основе квадруплексных антител BG4 визуализи-

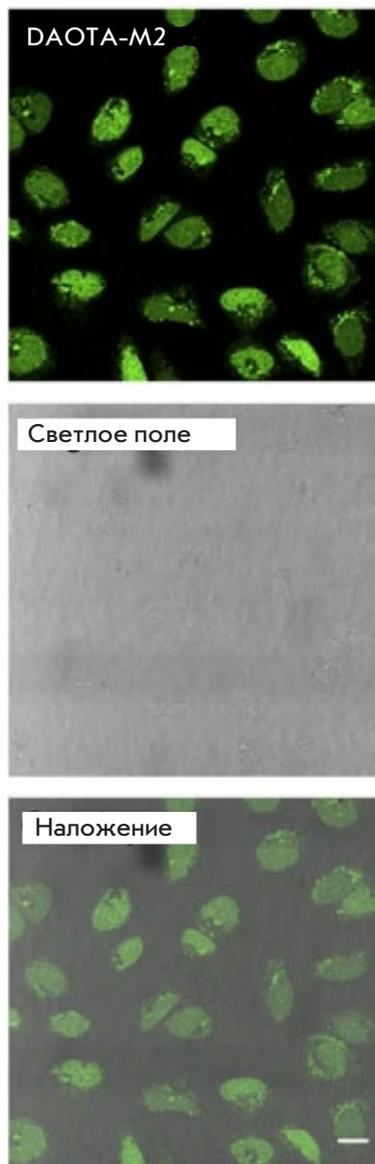


Рис. 2. Конфокальная микроскопия живых клеток линии U2OS, инкубированных с красителем DAOTA-M2, демонстрирующая ядерную локализацию G-квадруплексов (сверху – сигнал флуоресценции, в центре – наблюдение в светлом поле, снизу – наложение двух сигналов). Воспроизведено из [40] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ровано распределение G-квадруплексов в ядре плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток hESC, а также выявлено значительное уменьшение количества G-квадруплексов при дифференцировке клеток (рис. 3) [54].

Недавно с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителом, специфически распознающим эндогенный фактор транскрипции BmILF, высокоспецифичный к структуре i-мотивов, визуализированы i-мотивы *in vivo* в ядрах и хромосомах семенников гусениц тутового шелкопряда [55].

Вместе с тем, использование иммунофлуоресцентной микроскопии затрудняют такие факторы, как относительно высокая стоимость антител, их низкая стабильность и потенциальная иммуногенность [38]. Поэтому, разработка и применение специ-

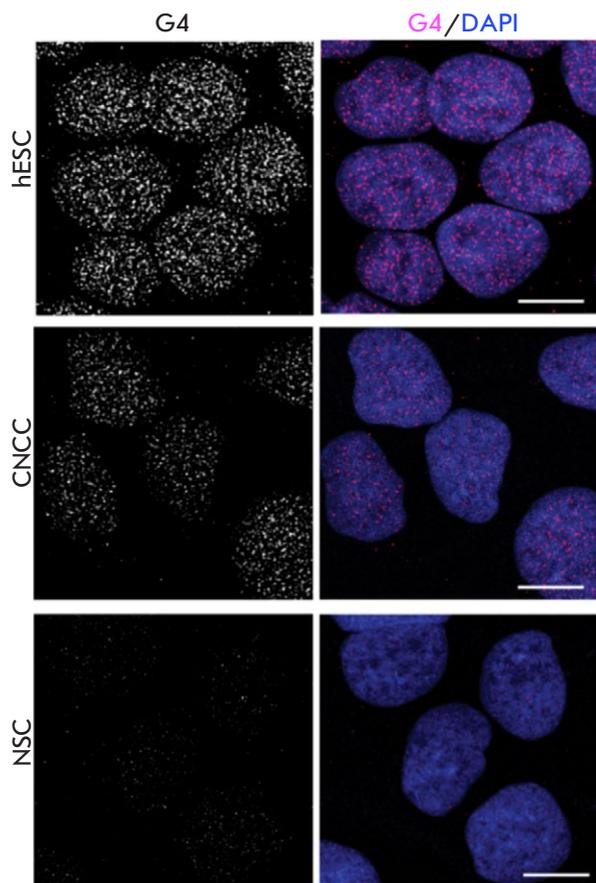


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная микроскопия фиксированных плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток hESC, клеток краниального нервного гребня (CNCC) и нейральных стволовых клеток (NSC), меченных специфическими к G-квадруплексам антителами BG4 после обработки РНКазой (вторичные антитела мечены флуоресцентным красителем AlexaFluor 488). Слева визуализированы только квадруплексы, справа ядра окрашены синим цветом из-за контрастирования ДНК-красителем DAPI. Масштабная метка 10 мкм. Воспроизведено из [54] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

фичных к G-квадруплексам флуорофоров остаются актуальными для визуализации этих структур в живых клетках.

ПЭМ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

Несмотря на широкое использование ПЭМ для изучения ДНК и ДНК-содержащих структур в целом, неканонические структуры ДНК визуализировали этим методом достаточно редко. Как правило, объектом такой визуализации служат молекулы ДНК, имеющие неканоническим образом сложенный фрагмент. В частности, с помощью ПЭМ визу-

ализированы различные петли на двухцепочечных молекулах ДНК, ассоциированные с образованием G-квадруплексов на одной из цепей ДНК.

Один из видов таких петель, возникающих после внутриклеточной транскрипции G-богатых участков, получил название G-петель [56]. G-петли формируются на плазмидном геноме *in vitro* или в *Escherichia coli* и состоят из G-квадруплекса на некодирующей цепи ДНК и стабильного гибрида РНК/ДНК – на кодирующей цепи ДНК. Кроме того, визуализировано образование специфического комплекса между G-квадруплексом G-петли и фактором репарации ошибочно спаренных оснований, гетеродимером MutSα, а также формирование опосредованного MutSα синапсиса между двумя цепями ДНК. Наблюдение таких синапсисов позволило предположить механизм работы MutSα при рекомбинации на этапе переключения. Структуру, похожую на G-петли, имеют и так называемые R-петли, гибриды РНК/ДНК, возникающие при транскрипции повторяющихся мотивов (CTG)_n, (CAG)_n, (CGG)_n, (CCG)_n и (GAA)_n и связанные с некоторыми заболеваниями человека. R-петли были визуализированы с помощью ПЭМ [57], однако не приведено доказательств образования G-квадруплексов на некодирующей цепи R-петель. Формирование петель на G-богатых участках гена инсулина после денатурации и ренатурации молекулы ДНК, визуализированных с помощью ПЭМ [58], также объяснено формированием квадруплексов на одной из цепей ДНК.

ПЭМ также использовали для визуализации квадруплексов, формирующихся контролируемым способом за счет несущих G-повторы параллельных дуплексов [59]. На ПЭМ-изображениях зафиксировано узкое распределение длин таких структур, согласующихся с ожидаемым размером. Кроме того, визуализированы одномерные содержащие квадруплексы наноструктуры в виде нанопроволок различной длины.

Анализ РНК-транскриптов C- и G-богатой теломерной ДНК млекопитающих, проведенный с помощью ПЭМ, выявил принципиальные различия в их морфологии. C-богатые РНК-транскрипты обладают более вытянутой структурой с толщиной, типичной для одноцепочечной РНК, тогда как G-богатые транскрипты представляют собой круглые частицы и короткие, толстые палочкообразные структуры, преобладающие при повышенной концентрации соли (рис. 4). Наблюдаемая морфология позволила предложить модель, согласно которой G-богатая теломерная РНК собирается в цепочки частиц, каждая из которых состоит из четырех повторов UUAGGG, стабилизированных параллельными G-квартетами и соединенных UUA-линкерами [60].

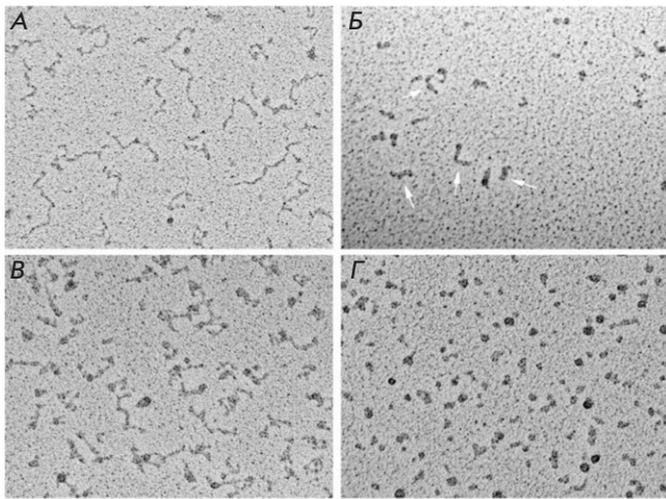


Рис. 4. Визуализация С- и G-богатых теломерных транскриптов. С-богатые (А) и G-богатые (Б) молекулы РНК в 100 мМ КСl наносили для ПЭМ на тонкие углеродные подложки, дегидратировали и оттеняли вольфрамом на вращающейся подложке. С-богатые РНК выглядят вытянутыми нитями с узлами. G-богатые РНК выглядят в виде смеси шариков и палочек (стрелки). Толщина палочек значительно больше, чем толщина С-богатых или дуплексных РНК. С-богатые (В) и G-богатые (Г) молекулы РНК нанесены из 10 мМ КСl таким же образом, как в (А) и (Б). С-богатая РНК выглядит расправленной с узлами, в то время как G-богатая РНК имеет, в основном, форму шариков. Масштабная метка составляет 100 нм. Воспроизведено из [60] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

С появлением антител на G-квадруплексы их стали изучать также с применением иммуноэлектронной микроскопии. В этом методе квадруплексы детектируют с помощью ПЭМ-визуализации меток (золотых наночастиц), конъюгированных с вторичными антителами к G-квадруплексам. Иммуноэлектронная микроскопия не достигает молекулярного разрешения самих квадруплексов, но позволяет наблюдать распределение G-квадруплексов внутри клетки, что важно для понимания роли квадруплексов во внутриклеточных процессах. Так, с помощью этого метода визуализировано образование G-квадруплексов в клетках, инфицированных вирусом простого герпеса типа 1. Образование G-квадруплексов зависело от стадии цикла инфицирования: вирусные G-квадруплексы, количество которых достигало максимума во время репликации вируса в ядре клетки, перемещались к ядерной мембране в момент выхода вируса из ядра (рис. 5) [61]. Похожим способом G-квадруплексы выявлены в гетерохроматине клеток млекопитающих [62]. Таким образом, накопленные с помощью имму-

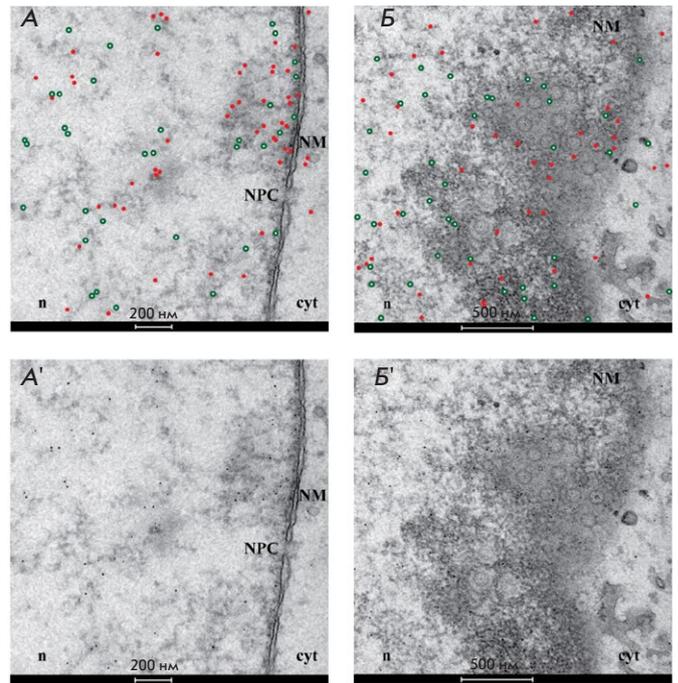


Рис. 5. Иммуноэлектронная микроскопия инфицированных вирусом простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) клеток, фиксированных через 15 ч после инфицирования и инкубированных с анти-G-квадруплексным антителом (1H6) и анти-IC8-сывороткой. Первичные антитела 1H6 и к IC8 детектированы с помощью золотых частиц диаметром 5 и 10 нм соответственно. Для улучшения четкости изображения золотые частицы подсвечены красными точками (показывающими G-квадруплексы) и зелеными кружками (показывающими IC8) на А и Б. Исходные изображения приведены на панелях А' и Б'. (А–А') G-квадруплексы и IC8 концентрируются вблизи ядерной мембраны (NM), где находится комплекс ядерной поры (NPC). Выход из ядра через комплекс ядерной поры является одним из путей, используемых капсидами ВПГ-1 для выхода из ядра (n) в цитоплазму (cyt). (Б–Б') G-квадруплексы и IC8 кластеризуются рядом с ядерной мембраной, где отпочковываются свежеформированные вирионы. Воспроизведено из [61] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ноэлектронной микроскопии результаты не только свидетельствуют о существовании G-квадруплексов в клетках, но и предполагают значимую роль G-квадруплексов в биологических процессах.

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К АСМ-ИССЛЕДОВАНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ключевым элементом атомно-силового микроскопа [19] является упругая пластина, называемая кантилевером, на которой расположено острие (зонд). Взаимодействие зонда с поверхностью вызывает

изгиб кантилевера, который детектируется с помощью высокопрецизионной оптической системы, состоящей из лазера, фотодиода и зеркальной поверхности кантилевера. Контактный режим сканирования, при котором изгиб кантилевера служит сигналом обратной связи и поддерживается постоянным, мало используется для исследования ДНК из-за больших сил взаимодействия кантилевера с образцом, приводящих к деформации биомолекулы и ухудшению пространственного разрешения изображения. Обычно АСМ-исследование биомолекул проводят в режиме прерывистого контакта [63], при котором кантилевер совершает колебания вблизи резонансной частоты, а взаимодействие зонда с образцом определяется по вызванному этим взаимодействием изменению амплитуды колебаний, которая обратной связью поддерживается постоянной. В режиме прерывистого контакта нормальные силы между кантилевером и образцом существенно ниже, чем в контактном режиме сканирования, а связанные с адгезией латеральные силы не оказывают существенного влияния на формирование АСМ-изображения, так как кантилевер циклически «отрывается» от поверхности образца при его перемещении вдоль поверхности в процессе сканирования. В последнее десятилетие стали широко использоваться режимы, основанные на периодическом подводе и отводе кантилевера к/от поверхности (режим пиковой силы, «прыгающий» режим и т.п.), которые позволяют значительно снизить силу взаимодействия кантилевера с поверхностью образца [64].

Основопологающим условием для исследования ДНК с помощью АСМ является иммобилизация молекулы на подложке. Иммобилизация биомолекулы взаимосвязана с рядом факторов, таких, как состав, рН, концентрация компонентов раствора, из которого осуществляют нанесение, температура, способ нанесения, время адсорбции, свойства подложки и т.д. Поэтому приготовление образца играет важную роль в АСМ. Гладкость (малая шероховатость) является одним из требований, предъявляемых к поверхности подложки для нанесения биополимеров. Две наиболее распространенные для АСМ подложки, обладающие участками с атомарной гладкостью, – слюда и высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ), имеющие кристаллическую природу. Однако нанесение на эти поверхности ДНК из водного раствора не приводит к адсорбции отдельных молекул в расправленном состоянии и, как следствие, к возможности их исследования с помощью АСМ.

Причиной, затрудняющей адсорбцию ДНК на свежежсколотую слюду, является одноименный отрицательный заряд фосфатных групп биополимера

и поверхности слюды, приводящий к электростатическому отталкиванию ДНК от поверхности. Для преодоления этого разработано несколько стратегий, успешно применяемых уже многие годы. Наиболее распространено использование двухвалентных катионов, таких, как Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} и др., которые служат электростатическими «мостиками» между атомной решеткой слюды и фосфатными группами ДНК [65, 66]. На практике для этого либо свежежсколотую слюду предварительно (до нанесения ДНК) модифицируют в соответствующем солевом растворе, либо небольшую его концентрацию (1–10 мМ) наносят на слюду одновременно с ДНК. Для нанесения ДНК на слюду используют и другой способ – предварительную модификацию ее поверхности аminosиланами, например, 3-аминопропилтриэтоксисиланом [67]. В этом случае к адсорбции ДНК на подложку приводит ее притяжение к положительно заряженным аминогруппам модификатора. Две описанные стратегии (с использованием двухвалентных катионов и аminosиланов) различаются между собой по силе адсорбции ДНК: опосредованная катионами двухвалентных металлов адсорбция молекул относительно слабая, что выражается в возможности теплового движения ДНК вблизи поверхности [68–71]. Напротив, слюда, модифицированная аminosиланами, как правило, представляет собой «кинетическую ловушку» для ДНК, т.е. адсорбированные молекулы ДНК оказываются неподвижными на поверхности, а их конформация отражает конформацию в растворе [72].

К настоящему времени накопилось большое количество доказательств образования карбоната калия на поверхности слюды при ее скалывании в лабораторных условиях [73]. При погружении в водный раствор образующаяся соль может формировать высокую ионную силу вблизи поверхности слюды, т.е. как раз в той области, в которой происходят основные взаимодействия биополимера с поверхностью при его адсорбции. Этот эффект, в частности, отмечен по интенсивной диссоциации ДНК-белковых комплексов, наносимых на слюду из раствора с низкой ионной силой [74]. Данная особенность слюды существенно затрудняет интерпретацию полученных на этой подложке результатов и, в частности, делает невозможным исследования на ее поверхности при низких ионных силах.

В отличие от слюды, ВОПГ электрически нейтрален, а также не формирует каких-либо солей на своей поверхности. Однако из-за слабого взаимодействия ДНК с графитом адсорбция молекул ДНК в расправленном состоянии на свежежсколотую поверхность графита также затруднительна: обычно ДНК адсорбируется на эту подложку лишь

в виде агрегатов или сетчатых структур [75, 76]. Для преодоления этой трудности разработан ряд подходов, основанных на модификации графита. Использование модифицированного графита позволяет исследовать ДНК при низкой или нулевой ионной силе, что немаловажно для изучения закономерностей образования неканонических структур ДНК.

Один из таких подходов – предварительная модификация графита в тлеющем разряде в присутствии паров пентиламина: модифицированная таким образом поверхность, насыщенная аминогруппами, приводит к адсорбции на нее отдельных расправленных молекул ДНК, причем измеряемые из АСМ-изображений размеры биополимера, такие, как высота и ширина на полувысоте, значительно ближе к нативным размерам ДНК по сравнению с размерами ДНК, адсорбированной на слюду [77, 78]. Позднее предложен методически более простой способ модификации ВОПГ – из водного раствора производной олигоглицина N,N' -(декан-1,10-диил)бис(тетраглицинамид) ($[Gly_4-NHCH_2]C_8H_{16}[CH_2NH-Gly_4]$), получившего название модификатор графита или GM [79]. Модификация поверхности ВОПГ GM, проводимая обычно с помощью дропкастинга, приводит к формированию однородного, самоупорядоченного слоя этих молекул толщиной меньше 1 нм [80, 81]. Как и в случае модификации пентиламином, аминогруппы GM делают возможным адсорбцию отдельных молекул ДНК на поверхность и их дальнейшее исследование с помощью АСМ [82].

Кроме того, в последние годы для нанесения ДНК на ВОПГ используют целый ряд других самоорганизующихся на поверхности графита органических наношаблонов. Такие наношаблоны формируются на кристаллических поверхностях многими производными алканов, включая стеариновую кислоту, додециламин, октадециламин, стеариловый спирт и др. [83–86]. Как правило, молекулы ДНК упорядочиваются вдоль формирующих наношаблон ламелей при адсорбции на такие поверхности [87, 88]. При этом химическая природа молекулы модификатора может значительно влиять на конформацию и свойства адсорбированной молекулы ДНК [89, 90].

Описанные подходы приготовления и нанесения образцов ДНК могут быть также применены и к неканоническим формам ДНК, включая G-квадруплексы и i-мотивы.

АСМ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

Как отмечалось выше, основным фактором, осложняющим прямую визуализацию неканонических структур ДНК без использования меток, является

их малый размер. Стоит отметить, что гуаниновая тетрада или двойной хугстенковский цитозинный димер имеют фиксированный размер, а количество таких G-тетрад или двойных цитозинных димеров в стеке может варьировать в достаточно широких пределах. Наиболее длинной неканонической структурой ДНК является G-нанопроволока: она образуется из G-богатых (например, поли(G)) нуклеотидных последовательностей за счет спонтанного формирования длинного тетраплекса ДНК и достигает микронных длин. Полученные из АСМ-изображений морфологические характеристики G-нанопроволок, такие, как диаметр, длина, форма контура, позволяют определить их структуру (например, количество молекул ДНК, участвующих в образовании G-проволоки), персистентную длину, а также могут использоваться в качестве обратной связи при разработке процедур синтеза этих структур для биотехнологических применений. G-нанопроволока может образовываться из большого количества олигонуклеотидов, «сцепляющихся» между собой в тетраплекс [91–94] из четырех параллельных гуаниновых последовательностей (тетрамолекулярная нанопроволока) [95], а также из одной длинной молекулы одноцепочечной ДНК, сложенной в 4 раза (мономолекулярная нанопроволока) [96, 97]. В первом случае G-нанопроволоки характеризуются широким распределением длины, тогда как в остальных двух – узким. Диаметр G-нанопроволоки, измеренный по ее высоте на АСМ-изображениях, обычно составляет около 2 нм [91, 95, 96], что с учетом эффекта занижения высоты, вызванного взаимодействием кантилевера с мягким образцом [98], согласуется с размером 2.8 нм, полученного из рентгеноструктурного анализа G-тетрады [99]. Примеры АСМ-изображений G-нанопроволок приведены на рис. 6.

Описаны и другие нанопроволоки на основе неканонических структур. Так, синтезированы гибридные нанопроволоки, состоящие из фрагментов G-нанопроволок и i-мотивов [100]. АСМ выявила полиморфизм таких структур, который зависел от используемых олигонуклеотидов и ионного окружения, в частности, визуализирована супрамолекулярная конформация гибридов, а также V-образная, кольцевая и линейная конфигурация гибридов. Визуализировано также образование фибрилл высотой от 0.45 до 4 нм и длиной до 2 мкм из двух видов олигонуклеотидов SQ1A (CAGTAGAGATGCTGCTGAGGGGGGGGTGTGCTTCAAGCG) и SQ1B (CTCTACGACGACTGGGGGGGGACACGAAGTTCGCTACTG), которое объясняется формированием многочисленных синапсисов на основе квадруплексов [101].

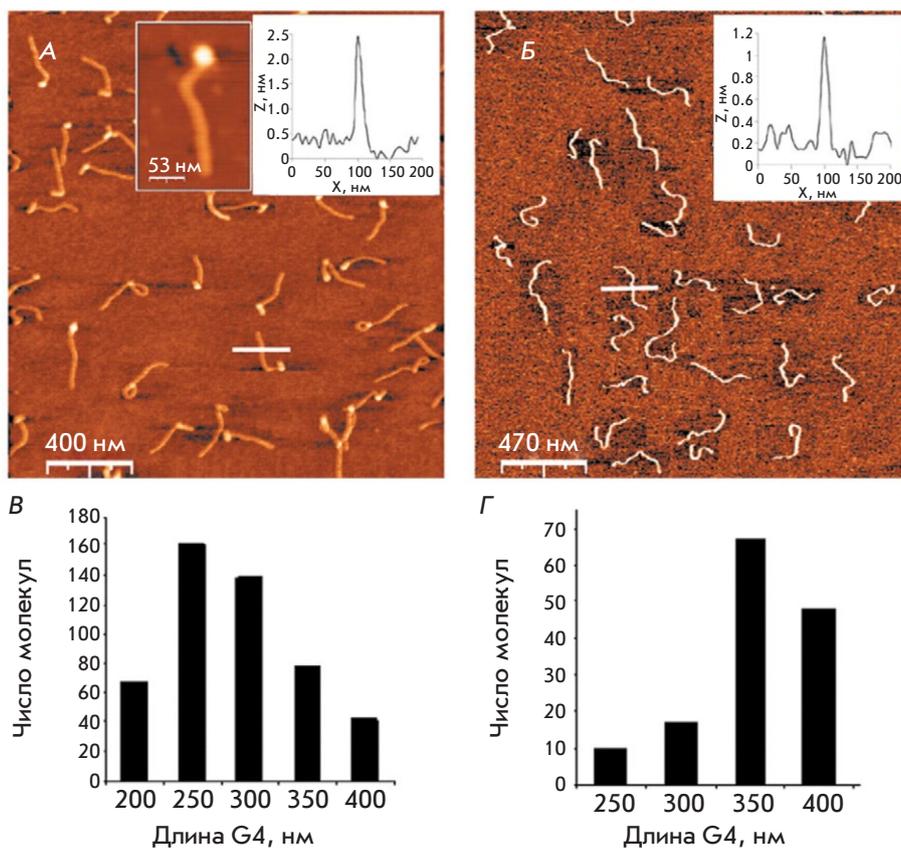


Рис. 6. Сравнение тетра- и мономолекулярных G-квадруплексов. АСМ-изображения тетрамолекулярных (вставка: увеличенный тетрамолекулярный комплекс) (А) и мономолекулярных (Б) G-квадруплексов. Тетрамолекулярные G-квадруплексы приготовлены с использованием комплекса четырех молекул 5'-биотин-поли(dG)-поли(dC) длиной 1400 п.н., связанных с авидином. Мономолекулярные G-квадруплексы приготовлены с использованием G-цепи длиной 5500 оснований. Молекулы обоих типов нанесены на слюду при одинаковых условиях. Статистический анализ контурных длин тетрамолекулярных (В) и мономолекулярных (Г) G-квадруплексов. Воспроизведено из [95] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Возможность подачи электрического потенциала на кантилевер атомно-силового микроскопа и измерения силы тока позволили также записать вольт-амперные характеристики отдельных G-нанопроволок. В частности, показано, что G-нанопроволока способна пропускать ток от десятков до сотен пикоампер [11].

В природе склонные к формированию неканонических структур G- или C-богатые нуклеотидные последовательности, как правило, встроены в более длинные молекулы ДНК, например, в теломерных участках хромосом или вблизи промотора. В двухцепочечной ДНК G- и C-богатые мотивы всегда находятся друг напротив друга из-за комплементарности. Так, с помощью АСМ визуализировано одновременное образование G-квадруплекса и i-мотива на двухцепочечной ДНК, содержащей G-богатый VNTR-мотив: $CGC(GGGGCGGG)_n$. Эти структуры имели разветвленную форму и наблю-

дались лишь в кислой среде и в присутствии ионов K^+ . Образование G-квадруплекса и i-мотива на VNTR-последовательности может реализовываться при транскрипции или репликации, когда двухцепочечная ДНК переходит в одноцепочечную форму, и таким образом влиять на экспрессию соответствующего гена [102].

Для исследования образования неканонических структур и их визуализации G- и C-богатые мотивы зачастую «встраивают» в молекулу ДНК или основанную на ДНК наноструктуру, имеющую гораздо больший размер, чем сама неканоническая структура. Это позволяет идентифицировать отдельные G-квадруплексы или i-мотивы по изменению морфологии соединенных с ними более крупных структур ДНК.

Так, одноцепочечный участок ДНК, содержащий два C-тракта, встраивали в двухцепочечную кольцевую ДНК с противоположных сторон «кольца»

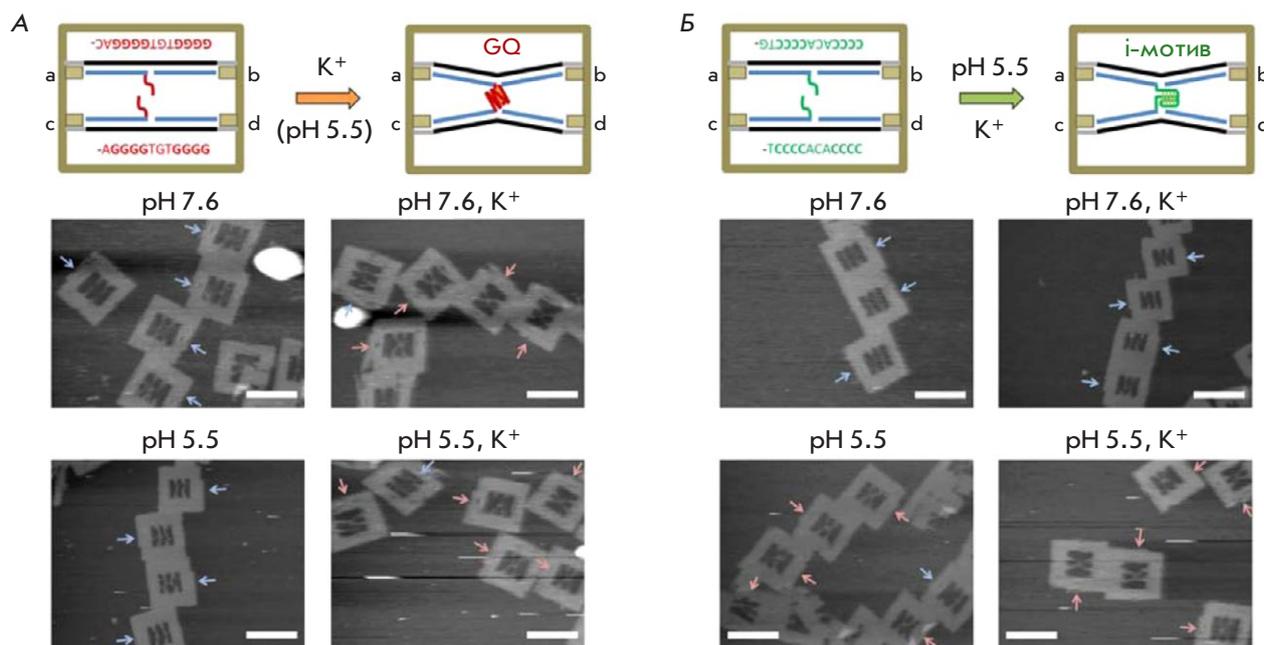


Рис. 7. А – наблюдение образования отдельного G-квадруплекса и i-мотива. АСМ-изображения ДНК-рамок, содержащих G-тракты, необходимые для образования межнитевого G-квадруплекса в присутствии K^+ . Б – АСМ-изображения ДНК-рамок, содержащих C-тракты, необходимые для образования межнитевого i-мотива в кислой среде. Голубые и красные стрелки показывают разъединенные и соединенные (X-образные) нити соответственно. Масштабные метки составляют 100 нм. Адаптировано с разрешения из [105].
Copyright (2015) American Chemical Society

[103]. Образование различных внутри- и межмолекулярных i-мотивов показано, в частности, с помощью АСМ-визуализации архитектуры ДНК-колец. Взаимное расположение этих колец позволило также определить роль длины C-повторов одноцепочечного участка ДНК в образовании внутри- или межмолекулярных i-мотивов: наличие двух трактов из шести или менее цитозинового оснований приводило к образованию межмолекулярного i-мотива, тогда как большее количество повторов цитозинового участка – к формированию внутримолекулярного i-мотива.

Для АСМ-визуализации образования отдельных неканонических структур ДНК предложено встраивать G- и C-богатые последовательности олигонуклеотидов в прямоугольную ДНК-рамку, созданную на основе ДНК-оригами. С помощью высокоскоростной АСМ визуализированы образование, а также диссоциация G-квадруплекса внутри такой рамки в режиме реального времени. При этом формирование и диссоциацию G-квадруплексов идентифицировали по изменению контуров двух молекул ДНК, несущих G-квадруплексную последовательность, с параллельной на X-образную (при образовании G-квадруплекса) и наоборот (при его диссоциации) [104]. Топологически контролируемые

G-квадруплексы и i-мотивы были сформированы на основе ДНК-нанорамки с помощью перемещения цепи ДНК, добавления или изъятия ионов K^+ и использования кислой среды. Диссоциация двухцепочечной ДНК с формированием G-квадруплекса и i-мотива была визуализирована высокоскоростной АСМ (рис. 7) [105].

Не меньший научно-практический интерес представляет исследование отдельных коротких G- или C-богатых олигонуклеотидов, способных образовывать неканонические ДНК-структуры, а также их взаимодействия между собой. АСМ-визуализация таких последовательностей позволяет дополнить результаты традиционных методов исследования квадруплексов, таких, как круговой дихроизм, температурное плавление, ЯМР и др., морфологическими параметрами отдельных структур и их статистическим распределением. Тем не менее, АСМ-исследования неканонических структур ДНК из коротких олигонуклеотидов встречаются достаточно редко.

АСМ-исследование адсорбированного на поверхность слюды синтетического олигонуклеотида, содержащего G-богатый CpG-мотив, выявило наличие гетерогенных структур с высотой от 1 до 6 нм, которые, скорее всего, представляют со-

бой G-квадруплексы и их агрегаты [106]. АСМ-визуализация олигонуклеотидов, состоящих из 16 теломерных повторов TTAGGG, позволила сделать вывод о том, что большинство таких олигонуклеотидов образуют лишь два квадруплекса из четырех возможных, которые выглядели на АСМ-изображениях в виде бусин на нити [107]. G-квадруплексы из олигонуклеотидов $d(G)_{10}$, $d(TG_9)$ и $d(TG_8T)$ образовывались лишь в Na^+ -содержащем растворе при большом времени инкубации или в K^+ -содержащем растворе и выглядели как сферические агрегаты высотой 1.5–3 нм или нанопроволок (для $d(G)_{10}$) [94].

АСМ-визуализация может также применяться для исследования взаимодействия отдельных неканонических структур ДНК с различными лигандами. Изучение такого взаимодействия имеет большую актуальность в связи с предполагаемой ролью G-квадруплексов во многих внутриклеточных процессах, а также с их потенциальным использованием в качестве мишеней для противоопухолевых препаратов.

Например, при изучении взаимодействия G-квадруплексов с полиаминами была визуализирована агрегация G-квадруплексов: высота наблюдаемых структур при этом увеличивалась с 3 до 4–11 нм в зависимости от вида полиамина [108]. В другой серии АСМ-экспериментов показано, что связывающийся с G-квадруплексами триазол-акридиновый лиганд GL15 стабилизирует и ускоряет формирование квадруплексов в Na^+ - и K^+ -содержащих растворах [109]. Показано также, что производные пролинамида могут селективно связываться и стабилизировать G-квадруплексы. АСМ-исследование показало, что производная триспролинамида Pro-4 может направлять формирование структур из G-квадруплексов на основе с-МУС [110].

Из небольшого количества АСМ-исследований отдельных G-квадруплексов, образующихся из олигонуклеотидов, и их ассоциатов можно сделать вывод о том, что основным осложняющим такие исследования обстоятельством является размер таких структур, находящийся вблизи предела разрешения АСМ на мягких объектах. Пространственное разрешение атомно-силового микроскопа зависит от ряда факторов, в числе которых радиус острия используемого кантилевера. Поэтому одним из способов увеличения разрешения на АСМ-изображениях является использование сверхострых кантилеверов. В настоящее время коммерчески доступны кантилеверы, имеющие радиус кривизны до 1 нм [79, 111]. Следует отметить, что природа подложки тоже может ограничивать разрешение атомно-силового

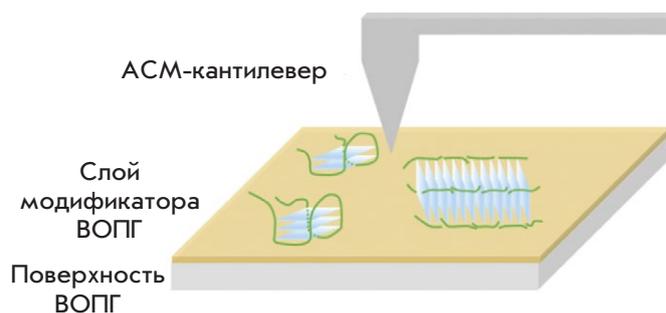


Рис. 8. Схематичное представление поверхности образца для АСМ-исследования квадруплексов и квадруплекссодержащих структур на поверхности ВОПГ, модифицированного GM

микроскопа: например, образование солевой пленки на поверхности слюды может приводить к уменьшению высоты адсорбированных структур ДНК на АСМ-изображениях и, как следствие, к ухудшению контраста и уменьшению пространственного разрешения.

Применение сверхострых кантилеверов и использование GM-модифицированной поверхности ВОПГ в качестве подложки зачастую позволяют улучшить качество структурного анализа биомолекул с помощью АСМ [79, 80]. Данный подход, проиллюстрированный на рис. 8, применен в нескольких исследованиях неканонических структур ДНК. С помощью АСМ проведен анализ полиморфизма квадруплексов, формирующихся в разных условиях из G-богатых олигонуклеотидов с разными длинами G-трактов и петель между ними [112]. Анализ морфологии и гистограмм распределения по высотам визуализированных структур позволил различить от одного до четырех видов квадруплексов, формируемых каждым из изучаемых олигонуклеотидов, и выявить закономерности формирования молекулярных ассоциатов (мультимеров G-квадруплексов) из внутримолекулярных G-квадруплексов (рис. 9).

На модельных олигонуклеотидах – фрагментах генома человека, содержащих посередине G/C-богатый участок, с помощью АСМ показано возникновение синаптических контактов между молекулами ДНК за счет образования межмолекулярных G-квадруплексов или i-мотивов [113]. Возникновением межмолекулярных i-мотивов объясняются структуры, формируемые одноцепочечными олигонуклеотидами C_nT_{25} ($n = 2, 5, 7, 9, 12, 25$) при pH 5.5, визуализированные с помощью АСМ (рис. 10) [114]. Такие структуры состоят из «ядра» (i-мотива) и выходящих из него «ножек». Эти структуры могут представлять интерес в биоинженерии для синтеза молекулярных архитектур на основе ДНК.

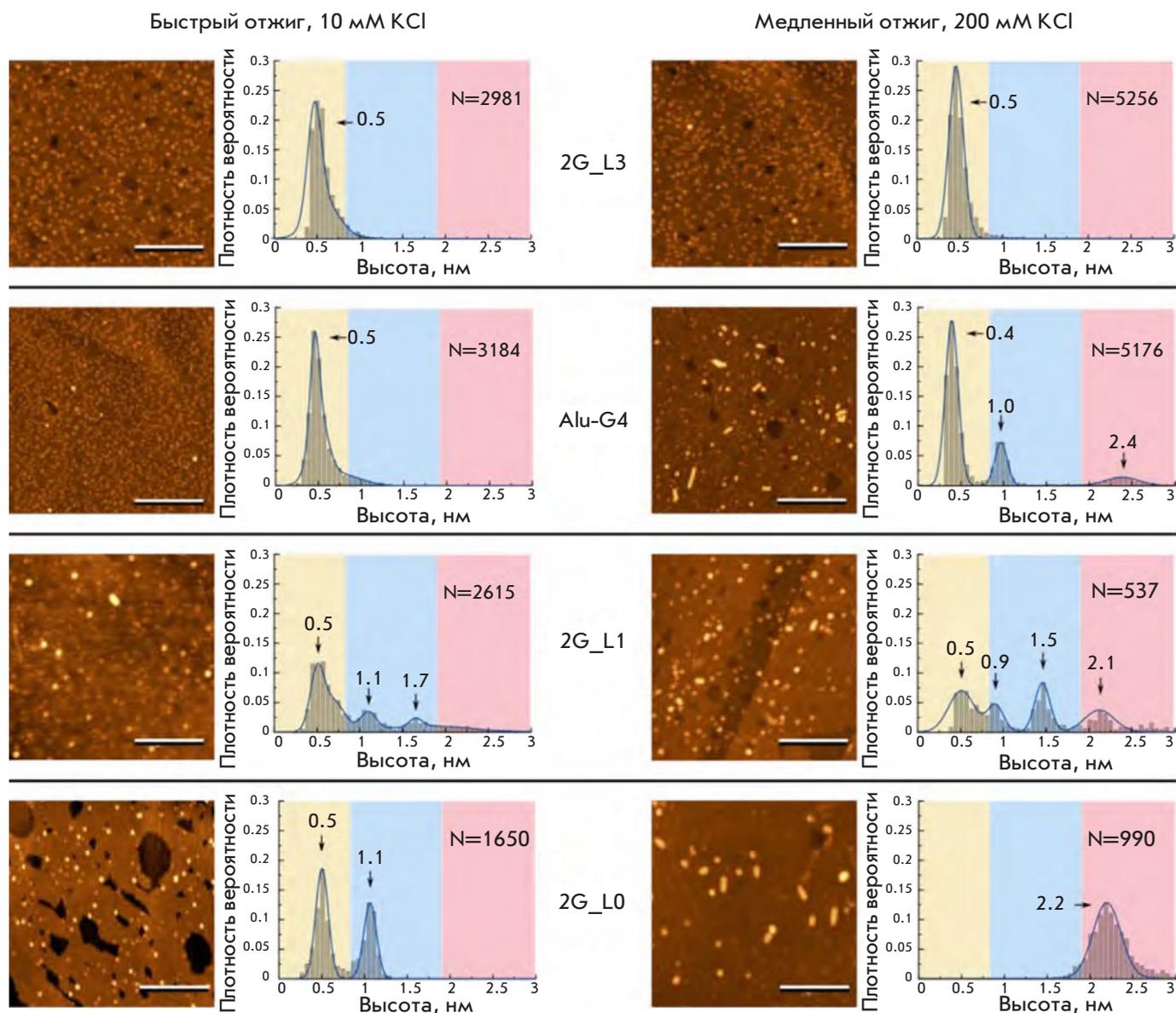


Рис. 9. АСМ-изображения и соответствующие гистограммы распределения по высотам двухтетрадных G-квадруплексов, сформированных после быстрого отжига в присутствии 10 мМ КСl (слева) и медленного отжига в присутствии 200 мМ КСl (справа). Масштабная метка 100 нм. Воспроизведено из [112] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для визуализации неканонических структур ДНК в основном используются такие методы, как флуоресцентная микроскопия, ПЭМ и АСМ. Флуоресцентная микроскопия позволяет визуализировать G-квадруплексы, в том числе и в живых клетках, при этом визуализация осуществляется за счет флуоресцентной метки, связывающейся с ДНК-квадруплексом. Поэтому большое внимание уделяется разработке флуорофоров, обладающих высокой селективностью

к G-квадруплексам и хорошими оптическими свойствами. Среди разновидностей флуоресцентной микроскопии, используемой для визуализации квадруплексов, стоит отметить микроскопию визуализации времени жизни флуоресценции и иммунофлуоресцентную микроскопию. В последнем случае используются антитела к G-квадруплексам, которые усиливаются вторичными антителами с пришитыми флуоресцентными метками. В последние несколько лет флуоресцентная микроскопия предоставила большое количество данных, доказывающих су-

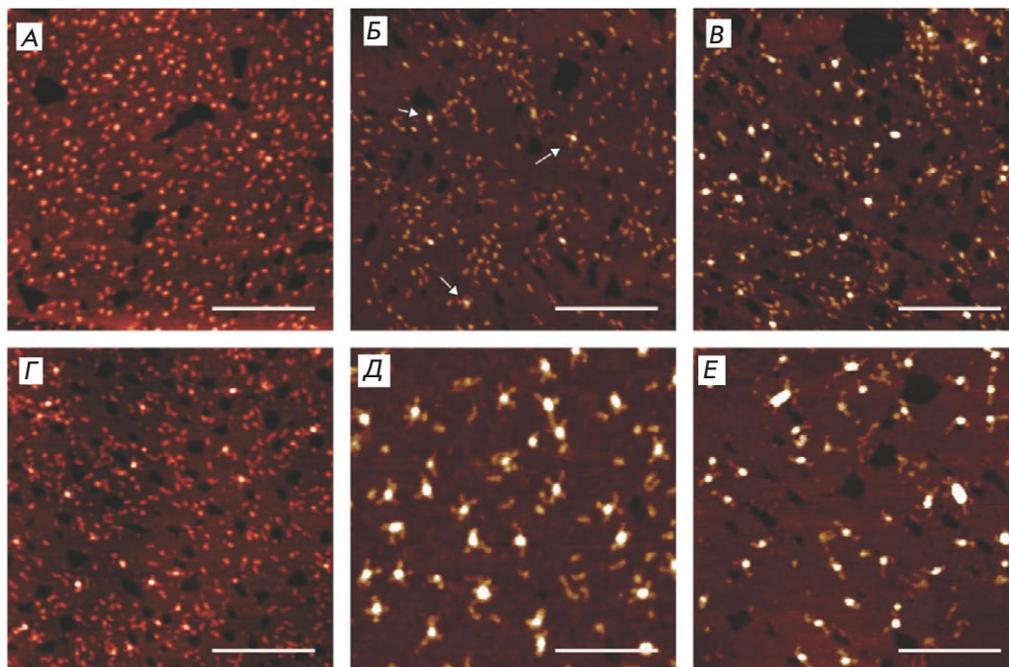


Рис. 10. АСМ-изображения наноструктур на основе *i*-мотивов, образованных следующими олигонуклеотидными последовательностями при pH 5.5: C_2T_{25} (А); C_5T_{25} (Б); C_7T_{25} (В); C_9T_{25} (Г); $C_{12}T_{25}$ (Д); $C_{25}T_{25}$ (Е). Масштабная метка 100 нм. Воспроизведено из [114] согласно лицензии CC BY-NC 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

ществование G-квадруплексов в живых клетках, при этом ДНК-квадруплексы локализованы в основном в ядрышке, а РНК-квадруплексы – в цитоплазме клетки.

В отличие от флуоресцентной микроскопии, ПЭМ и АСМ способны визуализировать неканонические структуры ДНК без использования меток. Оба метода имеют сравнимое латеральное разрешение, при этом АСМ, в отличие от ПЭМ, обладает высоким разрешением по высоте. С помощью ПЭМ и АСМ визуализирован ряд структур на основе неканонических структур, таких, как G- и R-петли, G-нанопроволоки. Для АСМ-визуализации образования и диссоциации отдельных квадруплексов и *i*-мотивов в режиме реального времени разработаны специальные подходы, использующие основанные на технологии ДНК-оригами ДНК-нанорамки, в которые встроены олигонуклеотиды, способные образовывать неканонические структуры ДНК. Эти исследования позволили лучше понять влияние условий, таких, как состав и концентрация ионов, pH,

расстояние между взаимодействующими фрагментами ДНК и пр., на образование G-квадруплексов или *i*-мотивов. АСМ- и ПЭМ-визуализация отдельных неканонических структур ДНК и их небольших ассоциатов являются наиболее сложной с методической точки зрения задачей, так как размер таких структур близок к разрешающей способности этих методов. Дальнейшее увеличение разрешающей способности АСМ в применении к исследованию неканонических структур ДНК представляется связанным с использованием специальных подложек (например, модифицированного графита), а также с применением сверхострых кантилеверов. С применением данного подхода визуализирован полиморфизм структур G-квадруплексов, а также обнаружено возникновение синаптического контакта олигонуклеотидов за счет образования межмолекулярных неканонических структур ДНК. ●

Данная работа поддержана Российским научным фондом (проект № 22-23-00395).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. № 12. P. 2013–2018.
- Gehring K., Leroy J.-L., Guéron M. // Nature. 1993. V. 363. № 6429. P. 561–565.
- Hänsel-Hertsch R., Di Antonio M., Balasubramanian S. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. № 5. P. 279–284.
- Abou Assi H., Garavís M., González C., Damha M.J. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № 16. P. 8038–8056.
- Brown S.L., Kendrick S. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. № 2. P. 96.
- Varshney D., Spiegel J., Zyner K., Tannahill D., Balasubramanian S. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. V. 21. № 8. P. 459–474.
- Drygin D., Siddiqui-Jain A., O'Brien S., Schwaebe M., Lin A., Bliesath J., Ho C.B., Proffitt C., Trent K., Whitten J.P., et al. // Cancer Res. 2009. V. 69. № 19. P. 7653–7661.
- Ohnmacht S.A., Marchetti C., Gunaratnam M., Besser R.J., Haider S.M., Di Vita G., Lowe H.L., Mellinas-Gomez M., Diocou S., Robson M., et al. // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 11385.
- Shu B., Cao J., Kuang G., Qiu J., Zhang M., Zhang Y., Wang

- M., Li X., Kang S., Ou T.-M., et al. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 16. P. 2036–2039.
10. Kuang G., Zhang M., Kang S., Hu D., Li X., Wei Z., Gong X., An L.-K., Huang Z.-S., Shu B., et al. // *J. Med. Chem.* 2020. V. 63. № 17. P. 9136–9153.
11. Livshits G.I., Stern A., Rotem D., Borovok N., Eidelstein G., Migliore A., Penzo E., Wind S.J., Di Felice R., Skourtis S.S., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 12. P. 1040–1046.
12. Xu J., Yan C., Wang X., Yao B., Lu J., Liu G., Chen W. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 15. P. 9747–9753.
13. Li C., Chen H., Chen Q., Shi H., Yang X., Wang K., Liu J. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 14. P. 10169–10176.
14. Alberti P., Mergny J.-L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 1569–1573.
15. Yang T., Peng S., Zeng R., Xu Q., Zheng X., Wang D., Zhou X., Shao Y. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. V. 270. P. 120845.
16. Huang J., Ying L., Yang X., Yang Y., Quan K., Wang H., Xie N., Ou M., Zhou Q., Wang K. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 17. P. 8724–8731.
17. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 19. P. 5402–5415.
18. Karsisiotis A.I., Hessari N.M., Novellino E., Spada G.P., Randazzo A., Webba da Silva M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. V. 50. № 45. P. 10645–10648.
19. Binnig G., Quate C., Gerber C. // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56. № 9. P. 930–933.
20. Mirsaidov U.M., Zheng H., Casana Y., Matsudaira P. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. № 4. P. L15–L17.
21. *Transmission Electron Microscopy: Diffraction, Imaging, and Spectrometry* / Eds Carter B., Williams D.B. Cham: Springer International Publ., 2016.
22. Alessandrini A., Facci P. // *Meas. Sci. Technol.* 2005. V. 16. № 6. P. R65–R92.
23. Lyubchenko Y.L. // *J. Phys. Appl. Phys.* 2018. V. 51. № 40. P. 403001.
24. Largy E., Granzhan A., Hamon F., Verga D., Teulade-Fichou M.-P. // *Quadruplex Nucleic Acids* / Eds Chaires J.B., Graves D. Berlin: Heidelberg Springer, 2013. P. 111–177.
25. Chang C.-C., Kuo I.-C., Ling I.-F., Chen C.-T., Chen H.-C., Lou P.-J., Lin J.-J., Chang T.-C. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 15. P. 4490–4494.
26. Chan Y.-C., Chen J.-W., Su S.-Y., Chang C.-C. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 47. P. 566–573.
27. Lubitz I., Zikich D., Kotlyar A. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 17. P. 3567–3574.
28. Xu L., Shen X., Hong S., Wang J., Zhou L., Chen X., Pei R. // *Asian J. Org. Chem.* 2015. V. 4. № 12. P. 1375–1378.
29. Nygren J., Svanvik N., Kubista M. // *Biopolymers.* 1998. V. 46. № 1. P. 39–51.
30. Lee L.G., Chen C.-H., Chiu L.A. // *Cytometry.* 1986. V. 7. № 6. P. 508–517.
31. Mohanty J., Barooah N., Dhamodharan V., Harikrishna S., Pradeepkumar P.L., Bhasikuttan A.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 1. P. 367–376.
32. Hanczyc P., Rajchel-Mieldzioc P., Feng B., Fita P. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. № 22. P. 5436–5442.
33. Barooah N., Mohanty J., Bhasikuttan A.C. // *J. Indian Chem. Soc.* 2021. V. 98. № 6. P. 100078.
34. Turaev A.V., Tsvetkov V.B., Tankevich M.V., Smirnov I.P., Aralov A.V., Pozmogova G.E., Varizhuk A.M. // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 216–228.
35. Yu K.-K., Li K., He H.-Z., Liu Y.-H., Bao J.-K., Yu X.-Q. // *Sens. Actuators B Chem.* 2020. V. 321. P. 128479.
36. Yan J., Tian Y., Tan J., Huang Z. // *Analyst.* 2015. V. 140. № 21. P. 7146–7149.
37. Platella C., Gaglione R., Napolitano E., Arciello A., Pirola V., Doria F., Musumeci D., Montesarchio D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 19. P. 10624.
38. Ma D.-L., Zhang Z., Wang M., Lu L., Zhong H.-J., Leung C.-H. // *Chem. Biol.* 2015. V. 22. № 7. P. 812–828.
39. Tseng T.-Y., Chien C.-H., Chu J.-F., Huang W.-C., Lin M.-Y., Chang C.-C., Chang T.-C. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 10. P. 101309.
40. Shivalingam A., Izquierdo M.A., Marois A.L., Vyšniauskas A., Suhling K., Kuimova M.K., Vilar R. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8178.
41. Summers P.A., Lewis B.W., Gonzalez-Garcia J., Porreca R.M., Lim A.H.M., Cadinu P., Martin-Pintado N., Mann D.J., Edel J.B., Vannier J.B., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 162.
42. Zhang S., Sun H., Chen H., Li Q., Guan A., Wang L., Shi Y., Xu S., Liu M., Tang Y. // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2018. V. 1862. № 5. P. 1101–1106.
43. Yang S.Y., Amor S., Laguerre A., Wong J.M.Y., Monchaud D. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gen. Subj.* 2017. V. 1861. № 5. Part B. P. 1312–1320.
44. Lu Y.-J., Hu D.-P., Zhang K., Wong W.-L., Chow C.-F. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 81. P. 373–381.
45. Kang Y., Wei C. // *Chem. Biodivers.* 2022. V. 19. № 3. e202101030.
46. Guo X., Chen H., Liu Y., Yang D., Li Q., Du H., Liu M., Tang Y., Sun H. // *J. Mater. Chem. B.* 2022. V. 10. № 3. P. 430–437.
47. Liu L.-Y., Liu W., Wang K.-N., Zhu B.-C., Xia X.-Y., Ji L.-N., Mao Z.-W. // *Angew. Chem.* 2020. V. 132. № 24. P. 9806–9813.
48. Laguerre A., Hukezalie K., Winckler P., Katranji F., Chanteloup G., Pirrotta M., Perrier-Cornet J.-M., Wong J.M.Y., Monchaud D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. № 26. P. 8521–8525.
49. Huang W.-C., Tseng T.-Y., Chen Y.-T., Chang C.-C., Wang Z.-F., Wang C.-L., Hsu T.-N., Li P.-T., Chen C.-T., Lin J.-J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 21. P. 10102–10113.
50. Biffi G., Di Antonio M., Tannahill D., Balasubramanian S. // *Nat. Chem.* 2014. V. 6. № 1. P. 75–80.
51. Biffi G., Tannahill D., Miller J., Howat W.J., Balasubramanian S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e102711.
52. Henderson A., Wu Y., Huang Y.C., Chavez E.A., Platt J., Johnson F.B., Brosh R.M., Sen D., Lansdorp P.M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 860–869.
53. Biffi G., Tannahill D., McCafferty J., Balasubramanian S. // *Nat. Chem.* 2013. V. 5. № 3. P. 182–186.
54. Zyner K.G., Simeone A., Flynn S.M., Doyle C., Marsico G., Adhikari S., Portella G., Tannahill D., Balasubramanian S. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 142.
55. Tang W., Niu K., Yu G., Jin Y., Zhang X., Peng Y., Chen S., Deng H., Li S., Wang J., et al. // *Epigenetics Chromatin.* 2020. V. 13. № 1. P. 12.
56. Duquette M.L., Handa P., Vincent J.A., Taylor A.F., Maizels N. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 13. P. 1618–1629.
57. Reddy K., Schmidt M.H.M., Geist J.M., Thakkar N.P., Panigrahi G.B., Wang Y.-H., Pearson C.E. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 16. P. 10473–10487.
58. Hammondkosack M., Dobrinski B., Lurz R., Docherty K., Kilpatrick M. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 2. P. 231–236.
59. Yatsunyk L.A., Piétrement O., Albrecht D., Tran P.L.T., Renčiuk D., Sugiyama H., Arbona J.-M., Aimé J.-P., Mergny J.-L. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 7. P. 5701–5710.
60. Randall A., Griffith J.D. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 21. P. 13980–13986.

61. Artusi S., Perrone R., Lago S., Raffa P., Di Iorio E., Palù G., Richter S.N. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 21. P. 10343–10353.
62. Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., de Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., Giepmans B.N.G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45970.
63. Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. // *Surf. Sci.* 1993. V. 290. № 1–2. P. L688–L692.
64. Xu K., Sun W., Shao Y., Wei F., Zhang X., Wang W., Li P. // *Nanotechnol. Rev.* 2018. V. 7. № 6. P. 605–621.
65. Vesenka J., Guthold M., Tang C., Keller D., Delaine E., Bustamante C. // *Ultramicroscopy.* 1992. V. 42. P. 1243–1249.
66. Bustamante C., Vesenka J., Tang C., Rees W., Guthold M., Keller R. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 1. P. 22–26.
67. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. // *Methods.* 2009. V. 47. № 3. P. 206–213.
68. Rivetti C., Guthold M., Bustamante C. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. № 5. P. 919–932.
69. Vanderlinden W., De Feyter S. // *Nanoscale.* 2013. V. 5. № 6. P. 2264–2268.
70. Bustamante C., Guthold M., Zhu X.S., Yang G.L. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 24. P. 16665–16668.
71. Suzuki Y., Higuchi Y., Hizume K., Yokokawa M., Yoshimura S.H., Yoshikawa K., Takeyasu K. // *Ultramicroscopy.* 2010. V. 110. № 6. P. 682–688.
72. Valle F., Favre M., De Los Rios P., Rosa A., Dietler G. // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 95. № 15. P. 158105.
73. Christenson H.K., Thomson N.H. // *Surf. Sci. Rep.* 2016. V. 71. № 2. P. 367–390.
74. Sorel I., Piétrement O., Hamon L., Baconnais S., Le Cam E., Pastré D. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 49. P. 14675–14682.
75. Brett A.M.O., Chiorcea A.M. // *Langmuir.* 2003. V. 19. № 9. P. 3830–3839.
76. Jiang X.H., Lin X.Q. // *Electrochem. Commun.* 2004. V. 6. № 9. P. 873–879.
77. Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. // *Phys. Low-Dimens. Struct.* 2003. V. 3–4. P. 119–124.
78. Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. // *AIP Conf. Proc.* 2003. V. 696. P. 452–456.
79. Klinov D., Dwir B., Kapon E., Borovok N., Molotsky T., Kotlyar A. // *Nanotechnology.* 2007. V. 18. № 22. P. 225102.
80. Klinov D.V., Protopopova A.D., Andrianov D.S., Litvinov R.I., Weisel J.W. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2020. V. 196. P. 111321.
81. Barinov N.A., Tolstova A.P., Bersenev E.A., Ivanov D.A., Dubrovin E.V., Klinov D.V. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2021. V. 206. P. 111921.
82. Dubrovin E.V., Klinov D.V. // *Polym. Sci. Ser. A.* 2021. V. 63. № 6. P. 601–622.
83. Rabe J., Buchholz S. // *Science.* 1991. V. 253. № 5018. P. 424–427.
84. Cincotti S., Rabe J.P. // *Appl. Phys. Lett.* 1993. V. 62. № 26. P. 3531–3533.
85. van Hameren R., Schön P., van Buul A.M., Hoogboom J., Lazarenko S.V., Gerritsen J.W., Engelkamp H., Christianen P.C.M., Heus H.A., Maan J.C., et al. // *Science.* 2006. V. 314. № 5804. P. 1433–1436.
86. De Feyter S., De Schryver F.C. // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. № 10. P. 4290–4302.
87. Adamcik J., Tobenas S., Di Santo G., Klinov D., Dietler G. // *Langmuir.* 2009. V. 25. № 5. P. 3159–3162.
88. Dubrovin E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010. V. 76. № 1. P. 63–69.
89. Dubrovin E.V., Speller S., Yaminsky I.V. // *Langmuir.* 2014. V. 30. № 51. P. 15423–15432.
90. Dubrovin E.V., Schächtele M., Schäffer T.E. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. № 83. P. 79584–79592.
91. Vesenka J., Marsh T., Miller R., Henderson E. // *J. Vac. Sci. Technol. B.* 1996. V. 14. № 2. P. 1413–1417.
92. Karimata H., Miyoshi D., Fujimoto T., Koumoto K., Wang Z.-M., Sugimoto N. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 2007. № 51. P. 251–252.
93. Ma'ani Hessari N., Spindler L., Troha T., Lam W.-C., Drevenšek-Olenik I., Webba da Silva M. // *Chem. – Eur. J.* 2014. V. 20. № 13. P. 3626–3630.
94. Chiorcea-Paquim A.-M., Santos P.V., Eritja R., Oliveira-Brett A.M. // *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP.* 2013. V. 15. № 23. P. 9117–9124.
95. Borovok N., Iram N., Zikich D., Ghabboun J., Livshits G.I., Porath D., Kotlyar A.B. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 15. P. 5050–5060.
96. Kotlyar A.B., Borovok N., Molotsky T., Cohen H., Shapir E., Porath D. // *Adv. Mater.* 2005. V. 17. № 15. P. 1901–1905.
97. Borovok N., Molotsky T., Ghabboun J., Porath D., Kotlyar A. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 374. № 1. P. 71–78.
98. Jiao Y., Schäffer T.E. // *Langmuir.* 2004. V. 20. № 23. P. 10038–10045.
99. Phillips K., Dauter Z., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J., Luisi B. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 1. P. 171–182.
100. Cao Y., Gao S., Yan Y., Bruist M.F., Wang B., Guo X. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 1. P. 26–38.
101. Mendez M.A., Szalai V.A. // *Nanoscale Res. Lett.* 2013. V. 8. № 1. P. 210.
102. Li Y., Syed J., Suzuki Y., Asamitsu S., Shioda N., Wada T., Sugiyama H. // *ChemBioChem.* 2016. V. 17. № 10. P. 928–935.
103. Li T., Famulok M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 4. P. 1593–1599.
104. Sannohe Y., Endo M., Katsuda Y., Hidaka K., Sugiyama H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 46. P. 16311–16313.
105. Endo M., Xing X., Zhou X., Emura T., Hidaka K., Tuesuwan B., Sugiyama H. // *ACS Nano.* 2015. V. 9. № 10. P. 9922–9929.
106. Costa L.T., Kerkmann M., Hartmann G., Endres S., Bisch P.M., Heckl W.M., Thalhammer S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 313. № 4. P. 1065–1072.
107. Wang H., Nora G.J., Ghodke H., Opresko P.L. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 9. P. 7479–7489.
108. Wen L.-N., Xie M.-X. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 6. P. 1185–1195.
109. Chiorcea-Paquim A.-M., Rodrigues Pontinha A.D., Eritja R., Lucarelli G., Sparapani S., Neidle S., Oliveira-Brett A.M. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 12. P. 6141–6149.
110. Chauhan A., Paladhi S., Debnath M., Dash J. // *Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. № 24. P. 5761–5767.
111. Obratsova E.A., Basmanov D.V., Barinov N.A., Klinov D.V. // *Ultramicroscopy.* 2019. V. 197. P. 11–15.
112. Varizhuk A.M., Protopopova A.D., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Podgorsky V.V., Tankevich M.V., Vlasenok M.A., Severov V.V., Smirnov I.P., Dubrovin E.V., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 17. P. 8978–8992.
113. Severov V.V., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Babenko V.V., Klinov D.V., Pozmogova G.E. // *Polymers.* 2022. V. 14(10). P. 2118.
114. Protopopova A.D., Tsvetkov V.B., Varizhuk A.M., Barinov N.A., Podgorsky V.V., Klinov D.V., Pozmogova G.E. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. № 5. P. 3543–3553.